



***Actividad antifúngica in vitro de péptidos análogos derivados de LL-37  
contra levaduras del género Candida***

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad Ciencias de la Salud**

**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo de grado**

**Bogotá 2019**



***Actividad antifúngica in vitro de péptidos análogos derivados de LL-37  
contra levaduras del género Candida***

**Estudiantes:**

**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 2019**

## **DEDICATORIA**

Es nuestro deseo dedicar el presente trabajo de grado a nuestros núcleos familiares, por su apoyo moral, económico y participación directa en nuestra formación como personas y profesionales, resaltando su compañía e incondicionalidad en cada etapa experimentada de nuestras vidas. También a nuestro cuerpo de asesores Julián Esteban Muñoz Henao y Gladys Pinilla Bermúdez, que bajo su profesionalidad, acompañamiento y conocimientos hicieron posible el desarrollo y culminación del mismo.

**Gabriel Chaves Alfonso, Yenifer Coronado Ladino.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por abrir sus puertas y ser el cimiento de la construcción de individuos integrales y profesionales, a su equipo de docentes por direccionar y acompañar nuestra formación académica promoviendo en nosotros un perfil de bacteriólogos y laboratoristas clínicos de calidad y servicio para la salud. También agradecemos a cada compañero y amigo que brindó un aporte durante las distintas etapas de nuestra vida universitaria, por su compañía, afecto y motivación dentro de la carrera.

Quiero agradecer a Dios por ser el partícipe de cada una de las metas y objetivos propuestos durante estos años de carrera universitaria, por darme sabiduría, paciencia y entendimiento para poder culminar con éxito este trabajo. A mis padres Doris Ladino Vega, Luis Orlando Coronado a mi hermano Julián Coronado y a mi tía Elisa Ladino por ser fuente de apoyo emocional, económico y por tanto esfuerzo reflejado para poder lograr tan anhelado sueño, a mis amigos que serán colegas toda una vida gracias por tantos momentos compartidos, a mis asesores por estar dispuestos y regalarnos de su tiempo y orientación

**Yenifer Coronado Ladino.**

Agradezco principalmente a Dios por bendecir y acompañar incondicionalmente todo propósito impuesto en mi vida personal y académica, por estructurar los conocimientos, valores, principios y talentos necesarios para construir un perfil profesional responsable y confiable; a mis padres Germán Chaves Jurado y Dora Inés Alfonso, hermanos y pareja por su apoyo constante en la ejecución de este trabajo de grado. Reconocer la importancia del compañerismo dado por las distintas amistades cosechadas en mi vida universitaria y por último deseo agradecer y destacar la labor y compromiso de mi compañera de trabajo, amiga y colega Yenifer Coronado Ladino.

## Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	18
2.	OBJETIVOS.....	22
2.1)	OBJETIVO GENERAL.....	22
2.2)	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3.	JUSTIFICACIÓN .....	23
4.	ANTECEDENTES .....	25
4.1)	ESTADO DEL ARTE .....	25
5.	MARCO CONCEPTUAL.....	27
5.1)	GENERALIDADES DE LEVADURAS DEL GÉNERO <i>Candida</i> .....	27
	PATOLOGÍAS OCASIONADAS POR <i>Candida spp</i> .....	28
5.2)	OTROS TIPOS DE CANDIDIASIS.....	30
5.3)	CANDIDIASIS VULVOVAGINAL.....	30
5.4)	CANDIDIASIS ORAL Y MUCOCUTANEA CRONICA.....	31
5.5)	ANTIFÚNGICOS CONTRA LAS CANDIDIASIS .....	32
5.5.1)	Azoles .....	32
5.5.2)	Equinocandinas .....	33
5.5.3)	Polienos.....	33
5.6)	RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS DE <i>Candida spp</i> .....	34
5.7)	PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS .....	35
5.8)	BIOPELÍCULAS EN LEVADURAS DEL GÉNERO <i>Candida</i> .....	40
6.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	43
6.1)	UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA .....	43

6.2)	MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
6.3)	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
6.4)	DETERMINACIÓN DE FASES DE CRECIMIENTO PARA <i>C. albicans</i> 256, <i>Candida</i> FVF, <i>C. albicans</i> SC5314. ....	44
6.5)	CURVAS DE CRECIMIENTO UTILIZANDO LOS PÉPTIDOS (AC-1, LL-37-1, AC-2 Y D). ....	44
6.6)	CONTROL PARA <i>C. albicans</i> 256, <i>C. albicans</i> SC5314 y <i>Candida</i> FVF. ....	45
7.	RESULTADOS .....	47
7.1)	FASES DE CRECIMIENTO.....	47
7.2)	CURVAS DE CRECIMIENTO UTILIZANDO LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	49
8.	DISCUSIÓN .....	57
9.	CONCLUSIONES.....	62
10.	REFERENCIAS.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Distribución de la infección fúngica invasora.	28
<b>Figura 2</b> Figura tridimensional del péptido LL-37.	38
<b>Figura 3</b> Esquema montaje experimental.	45
<b>Figura 4</b> Curva de crecimiento basal de <i>Candida albicans</i> 256, en un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.	46
<b>Figura 5</b> Curva de crecimiento basal cepa <i>Candida</i> FVF, en un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.	47
<b>Figura 6</b> Curva de crecimiento basal cepa <i>Candida albicans</i> SC 5314, en un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.	47
<b>Figura 7</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> 256 frente a distintas concentraciones del péptido AC-1.	49
<b>Figura 8</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> FVF frente a varias concentraciones del péptido AC-1.	49
<b>Figura 9</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> SC 5314 frente a varias concentraciones del péptido AC-1.	49
<b>Figura 10</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> 256 frente a varias concentraciones del péptido D.	50
<b>Figura 11</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> FVF frente a varias concentraciones de Péptido D.	51
<b>Figura 12</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> albicans SC 5314 frente a varias concentraciones del péptido D.	51
<b>Figura 13</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> albicans 256 frente a varias concentraciones del péptido LL-37-1.	52
<b>Figura 14</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> FVF frente a varias concentraciones del péptido LL-37,1	52

<b>Figura 15</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> SC 5314 frente a varias concentraciones del péptido LL-37,1.	52
<b>Figura 16</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> 256 frente a varias concentraciones del péptido AC-2.	53
<b>Figura 17</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> FVF frente a varias concentraciones del péptido AC-2.	53
<b>Figura 18</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> SC5314 frente a varias concentraciones del péptido AC-2.	54
<b>Figura 19</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> 256 frente a varias concentraciones de Anfotericina B.	55
<b>Figura 20</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida</i> FVF frente a varias concentraciones de Anfotericina B.	55
<b>Figura 21.</b> Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> SC5314 frente a varias concentraciones de Anfotericina B.	55



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de péptidos antimicrobianos. (43).....	37
Tabla 2 Factores que influyen en la expresión de LL-37(45).....	38

## **INDICE DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Protocolo para preparación de Agar Sabouraud.

**Anexo 2:** Protocolo para preparar concentraciones de péptidos AC-1, LL-37-1, AC-2 y D.

**Anexo 3:** Protocolo para preparar concentraciones de Anfotericina B.



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad Ciencias de la Salud**

**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.**

**Actividad antifúngica *in vitro* de péptidos análogos derivados de LL-37  
contra levaduras del género *Candida***

## **RESUMEN**

La candidiasis es una de las infecciones más frecuentes en pacientes hospitalizados o con alteraciones en su sistema inmunológico, actualmente se ha convertido en una problemática creciente debido a la resistencia adquirida por las levaduras del género *Candida* a diferentes antifúngicos utilizados en el tratamiento de esta micosis. Como alternativa terapéutica han sido estudiados en las últimas décadas varios péptidos antimicrobianos con el fin de investigar nuevos tratamientos de amplio espectro, especialmente para levaduras productoras de biopelículas.

Este es el caso de *Candida albicans*, una levadura comensal que hace parte del microbiota del ser humano, pero que en pacientes inmunosuprimidos puede causar infecciones cutáneas, subcutáneas y sistémicas, con el agravante de presentar resistencia en algunos casos a la terapia convencionalmente usada para su tratamiento. Los péptidos antimicrobianos están presentes en animales, plantas y

otros microorganismos, haciendo parte del sistema inmune innato. La catelicidina humana LL37, péptido antimicrobiano catiónico, es una molécula que contiene tanto un dominio catelina como un dominio C-terminal antimicrobiano.

Basados en lo anterior, se realizó un estudio de tipo cuantitativo; estudios descriptivos y explicativos en donde se utilizaron tres cepas, dos de ellas correspondientes a *Candida albicans* y una correspondiente a una cepa proveniente de candidiasis recurrente, probando en cada una de ellas cinco concentraciones distintas de péptidos análogos de LL-37 como: AC-1, LL-37,1, AC-2 y D, evidenciando su poder inhibitorio mediante las curvas de crecimiento obtenidas en el equipo BioScreen C.

Teniendo en cuenta los cuatro péptidos utilizados, se demostró que los péptidos AC-1 y D evidenciaron una actividad inhibitoria significativa en las tres cepas incluidas en el estudio; con respecto a los otros péptidos, cabe resaltar que LL-37,1 tuvo una excelente capacidad inhibitoria en la cepa *Candida albicans* 256.

**Palabras clave:** *Candida albicans*, péptido antimicrobiano, curvas de crecimiento, catelicidina humana LL37.

**Estudiantes:** Gabriel German Chaves Alfonso, Yenifer Tatiana Coronado Ladino.

**Docentes:** Julián Esteban Muñoz Henao PhD, Gladys Pinilla Bermúdez Bac. M.Sc

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas son un grupo de enfermedades en aumento progresivo en las últimas décadas, con una morbimortalidad considerable, en algunos casos la profilaxis de pacientes inmunosuprimidos o críticos han convertido la resistencia en un problema serio y creciente, se estima que en Colombia en el 2017

hubo 753.000 casos de infecciones fúngicas, de los cuales aproximadamente 600.000 casos fueron de Candidiasis, 130.000 casos de Aspergilosis y 16.000 casos de infecciones oportunistas asociadas a pacientes con HIV (1).

El género de levaduras *Candida* cuenta con aproximadamente 200 especies algunas de ellas se encuentran normalmente como organismos comensales en las superficies mucosas y cutáneas de todo el cuerpo humano. Sin embargo, un subconjunto de especies se asocia con enfermedades, que incluyen a *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitania*, *C. haemulonii* y *C. dubliniensis* (2) (3).

Las infecciones mucocutáneas de *Candida* a menudo son leves o auto limitantes, como la candidiasis oral y vaginal. Sin embargo, estas infecciones superficiales pueden asociarse con una morbilidad significativa, como en las candidiasis mucocutáneas crónicas (CMC) y la candidiasis vaginal recurrente, además las especies de *Candida* causan daños potencialmente fatales en la infección sistémica, donde las tasas de mortalidad se informan hasta en un 80%. (4)

Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie más frecuentemente aislada, la prevalencia de especies de *Candida* no *albicans* (NAC) está en aumento. Los factores de riesgo para la candidiasis varían según la especie. Por ejemplo, *C. glabrata* está particularmente asociada con la candidiasis bucal en ancianos y usuarios de dentaduras postizas, mientras que *C. dubliniensis* se aísla con frecuencia en individuos VIH + / SIDA y con muguet oral. Los neonatos, los

receptores de trasplantes y los pacientes que reciben nutrición parenteral tienen un mayor riesgo de infección por *C. parapsilosis* en comparación con otras especies de *Candida*. Además, las diferencias geográficas en la prevalencia de las especies de *Candida* son evidentes. *C. albicans* y *C. glabrata* son prominentes en América del Norte y Europa, mientras que *C. tropicalis* es típicamente la especie de *Candida* más frecuentemente aislada en India y América Latina (5).

El aumento mundial de las infecciones por hongos conlleva un incremento proporcional a la resistencia contra los medicamentos antimicóticos (6). De forma preocupante, se ha detectado resistencia a los fármacos antimicóticos para todas las especies de *Candida* clínicamente relevantes hasta cierto punto. Además, el patrón de resistencia a los fármacos antimicóticos difiere entre las especies de *Candida*, lo que dificulta el tratamiento eficaz con fármacos antifúngicos apropiados. *C. glabrata* presenta resistencia a las clases más comunes de drogas, azoles y equinocandinas y *Candida krusei* que presenta una resistencia intrínseca a los azoles (7).

Las razones que subyacen a las diferencias en la prevalencia de las especies de *Candida* y la resistencia a los medicamentos antimicóticos no están claras. Sin embargo, las especies de *Candida* son heterogéneas, por lo que la comprensión de sus diferencias filogenéticas puede ayudar a explicar, y finalmente abordar, estas disparidades. (4)

La resistencia presentada por las levaduras del género *Candida* frente a un gran número de antimicóticos, aumenta la necesidad de implementar nuevas alternativas de terapia antifúngica que permitan dar solución a esta problemática, una de estas alternativas es el uso de péptidos antimicrobianos que puedan poseer un efecto fungicida contra esta levadura de importancia clínica.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son moléculas encontradas en microorganismos, virus, plantas y animales de diversas jerarquías taxonómicas, se caracterizan por afectar diferentes estructuras de microorganismos patogénicos,

entre ellos bacterias, hongos y parásitos, poseen propiedades inmunomoduladoras directas o indirectas, estas últimas se dan cuando el péptido antimicrobiano lisa o rompe la estructura de determinado microorganismo liberando antígenos presentes en los mismos, los cuales inducen una respuesta inmunológica o proinflamatoria contra dicho microorganismo (8).

Hasta el momento, se han identificado más de 2.500 péptidos de este tipo, con una gama de estructuras primarias y secundarias. No obstante, estos péptidos comparten ciertos puntos en común, tales como su carga positiva global debido a un exceso en residuos de aminoácidos Arg y Lys, y la presencia de ~ 50% de aminoácidos hidrófobos dentro de su secuencia que permiten interacciones con membranas y posterior translocación en células. Recientemente se ha encontrado que un subconjunto de estos péptidos y sus derivados sintéticos actúan como potentes inhibidores de biofilms microbianos que están asociados con la mayoría (aproximadamente dos tercios) de las infecciones en seres humanos. (9)

LL-37 es el único miembro de la familia de catelicidina humana de AMPs, se almacena en los gránulos de los neutrófilos como un propéptido inactivo, que se escinde extracelularmente para producir el péptido maduro activo. Además de exhibir un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, LL-37 tiene otras actividades relacionadas con la defensa del huésped, incluida la migración quimiotáctica, la neutralización de endotoxinas, la angiogénesis y la curación de heridas.(10)

Una de las funciones del péptido LL-37 en las que se ven destacadas sus características intrínsecas antimicrobianas y su rol en la modulación de la respuesta inmune innata es el caso de los pacientes con psoriasis, donde los agregados de ADN autólogo junto con péptidos antimicrobianos como catelicidina LL37 favorecen la activación de las células dendríticas plasmocitoides y la producción de IFN-gamma, importante citocina proinflamatoria que participa en la activación de macrófagos. De este modo, la catelicidina LL37 liberada desde los queratinocitos

desempeña un papel fundamental en la ruptura de la tolerancia innata y puede ser un elemento relevante en el proceso inflamatorio psoriásico. (11)

Todas las características mencionadas hacen del LL-37 un péptido ideal para su utilización como plantilla en el diseño de péptidos miméticos bio informáticamente optimizados que podrían ser empleados como estrategia para inhibir la conglomeración de microorganismos dispuestos en estructuras rígidas como biopelículas. El grupo de investigación REMA, dentro del cual se realiza esta investigación, en estudios previos, diseño mediante herramientas de bioinformática un péptido análogo al LL-37. Por lo cual, en el presente trabajo se planteó el análisis del efecto antifúngico *In vitro* de los péptidos análogos derivados de LL-37 en levaduras del género *Candida*.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1) OBJETIVO GENERAL

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

### 2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la actividad *in vitro* de los péptidos análogos derivados de LL-37 a través de curvas de crecimiento en levaduras del género *Candida*.

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.

Identificar la respuesta de la cepa resistente *Candida albicans* 256 frente a Anfotericina B, antifúngico de amplio espectro utilizado como tratamiento contra micosis.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La candidiasis invasiva (IC) es una de las patologías que se informa entre la cuarta y séptima causa más frecuente de infecciones del torrente sanguíneo (BSI) en EE. UU. y Europa; se asocia a una alta tasa de mortalidad, hospitalizaciones prolongadas y altos costos de atención en salud.(12) Frecuentemente los pacientes más afectados por este tipo de infección son pacientes inmunosuprimidos, neutropénicos y pacientes de la UCI los cuales presentan colonización de levaduras del género *Candida* formadoras de biopelícula en catéteres, dispositivos para trasplantes entre otros (13).

La formación de biopelícula emerge actualmente como un grave problema de control hospitalario, ya que la biopelícula constituye un modo de protección y supervivencia en un ambiente hostil. La vida de los microorganismos dentro del biofilm proporciona una serie de beneficios en comparación con los que se encuentran en un modo de vida libre. Dentro de las especies de *Candida*; *C. albicans* posee una excelente capacidad para formar biopelículas en dispositivos médicos y superficies de tejidos los cuales son extremadamente difíciles de erradicar, debido a la capacidad de supervivencia a ambientes extremos otorgándoles cierto grado de resistencia a los distintos antimicóticos utilizados para eliminar su formación, generando consecuencias nefastas a los pacientes. (14)

La presente investigación tuvo por objetivo determinar la actividad antimicrobiana del péptido LL-37 contra levaduras del género *Candida*. Esta investigación, se realizó con el apoyo del grupo REMA y complementará las temáticas planteadas por este, con respecto al aporte de nueva información acerca de nuevas alternativas terapéuticas que podrían ser utilizadas en pacientes con candidiasis sistémica, siendo esta una enfermedad cosmopolita la cual ha generado grandes problemáticas al causar un alto número de casos de morbilidad y mortalidad en la población mundial. Los péptidos análogos a la catelicidina LL-37 se evaluaron con

el propósito de ser observados en levaduras del género *Candida* promoviendo la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra una de las principales micosis humanas.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1) ESTADO DEL ARTE

Numerosos estudios han evaluado la capacidad que tienen los péptidos contra levaduras del género *Candida*, debido a las innumerables cifras que se han descrito acerca de la resistencia frente a los antifúngicos utilizados como terapéuticos tales como los azoles, polienos, equinocandinas y otros antifúngicos convencionales para estos microorganismos, a partir de allí se genera gran expectativa por explorar nuevas opciones de terapia antimicrobiana contra *Candida spp.*

Marie Kodedová y Hana Sychrová, en el año 2017 compararon en un estudio la potencia antifúngica de cuatro péptidos relacionados estructuralmente derivados del péptido halitínico HAL-2, aislado del veneno de la abeja silvestre *Halictus sexcinctus* contra seis especies de *Candida*. HAL-2 y sus análogos se clasificaron como péptidos antibacterianos eficaces contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y de alta potencia contra células cancerosas *in vitro*, pero en este estudio se demostró que el péptido VII tuvo un efecto inhibitorio en la mayoría de las cepas de *Candida*, permeabilizando rápidamente las membranas celulares y causando la fuga de componentes citosólicos. (15)

Scarsini M y colaboradores en el año 2015 investigaron acerca de la actividad antifúngica *in vitro* de los péptidos Catelicidina LL-37 y BMAP-28 contra *Candida spp* patógena, incluyendo *C. albicans* aislada de infecciones vaginales y *C. albicans* SC5314 como cepa de referencia. La actividad antimicrobiana fue evaluada en células planctónicas y biofilm de *Candida spp* utilizando técnicas como la susceptibilidad en microdilución y XTT (sal de tetrazol, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido) , en el caso de los biofilms establecidos, se utilizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y la microscopía de fluorescencia, evidenciando la eficacia del péptido BMAP-28 en levaduras cultivadas en estado planctónico y contra los aislados de *C. albicans* y *C.*

*krusei* en fluido sintético vaginal , demostrando también una disminución en la formación de biofilm en un 70-90% a una concentración de 16 uM. Respecto al péptido LL-37 evitó el desarrollo de la biopelícula en *Candida* a una concentración de 64 uM, inhibiendo así la adhesión celular a superficies de poliestireno y silicona. (16)

Maurya I.K y colaboradores, en el año 2013 relacionan el potencial antifúngico de tres péptidos catiónicos de bajo peso molecular diseñados de *novo* (IJ2, IJ3 e IJ4) que contenían un aminoácido no natural  $\alpha$ ,  $\beta$ -dideshidrofénilalanina, frente a los aislados clínicos sensibles y resistentes al fluconazol (FLC) de *C. albicans* como *no albicans* y otros hongos patógenos levaduriformes y filamentosos, utilizando métodos como la microdilución en caldo, generación de Oxígeno Reactivo (ROS) por fluorimetría, apoptosis y necrosis mediante citometría de flujo y daño a la pared celular usando scanning y microscopía de transmisión de electrones, en este caso los tres péptidos mostraron resultados favorables tales como: un efecto en *C. albicans*, incluyendo la alteración de las estructuras de la pared celular, pérdida de la permeabilidad de la membrana celular, así como la acumulación de ROS y la inducción de la apoptosis (17)

Hao-Teng CHANG y colaboradores en el año 2012 aportan acerca del mecanismo de inhibición de los péptidos LL 37 y hBD-3 ( $\beta$ -defensina-3 humana) frente a la viabilidad de *C. albicans* y su adhesión a superficies de plástico. En este estudio se utilizó la  $\beta$ -1,3-exoglucanasa Xog1p enzima de la pared celular de la levadura, que está involucrada en el metabolismo del  $\beta$ -glucano, y en consecuencia la unión de LL37 o hBD-3 a Xog1p podría causar la disminución de la capacidad de adhesión de la *C. albicans*; los análisis enzimáticos mostraron que LL37 y hBD-3 aumentaron la actividad  $\beta$ -1,3-exoglucanasa de Xog1p aproximadamente 2 veces. Por lo tanto, la actividad elevada de Xog 1p podría comprometer la integridad de la pared celular y disminuir la adhesión de *C. albicans*. (18)

## 5. MARCO CONCEPTUAL

### 5.1) GENERALIDADES DE LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida*

*Candida spp* es un grupo de microorganismos eucarióticos con una capacidad extraordinaria para adaptarse a diferentes ambientes y hospederos. Una de las especies más relevantes del género *Candida* es *C. albicans*, la cual posee propiedades únicas que le permiten un estilo de vida dual como un patógeno comensal y oportunista para los seres humanos y otros mamíferos (19)

Esta dualidad le confiere la capacidad de un cambio morfogenético de una célula de levadura típica predominantemente asociada con el comensalismo, encontrándose en gran medida en el intestino y la vagina de hospederos asintomáticos, a un organismo con formación de pseudohifas asociada con patogenicidad y hallada en muestras de tejidos invadidos incluidos los de mujeres con candidiasis vulvovaginal (20).

A nivel estructural, el componente esquelético de la pared celular de la mayoría de los patógenos fúngicos, incluyendo *C. albicans*, se basa en una estructura central de  $\beta$ - (1,3) -glucano unida covalentemente a  $\beta$ - (1,6) -glucano y a quitina un polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) de enlace  $\beta$ - (1,4). Estos polímeros forman enlaces de hidrógeno entre las cadenas de polisacáridos adyacentes para formar una red tridimensional resistente de microfibrillas (21). La capa externa de la pared celular de especies de *Candida* consiste en manoproteínas que contienen oligosacárido O-glicosilado y polisacáridos N- glicosilado. Ambos restos de carbohidratos han demostrado ser importantes en las interacciones patógeno-huésped y virulencia. El polisacárido N-glicosilado, manano, tiene una estructura en forma de peine unido  $\alpha$  -1,6 y muchas cadenas laterales de oligomanosilo con un número bajo de grupos fosfato. (22)

En *C. albicans*, se sabe que la formación de hifas promueve varios mecanismos de virulencia, tales como: la producción de una serie de enzimas hidrolíticas dañinas

para los tejidos tales como proteinasas y fosfolipasas. Sin embargo, muchas especies de *Candida* distintas de *C. albicans* tales como, *C. Tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata* y *C. guilliermondii*, también existen en el huésped humano y pueden causar infecciones oportunistas (23), las diferentes especies de *Candida* poseen la capacidad de adherirse a tejidos y prótesis del huésped, algunas más que otras promoviendo la formación de biopelícula la cual implica un fenómeno secuencial formado por la adhesión, que es cuando la levadura se adhiere al tejido y comienza el proceso de invasión (24).

Este fenómeno se desarrolla en cuatro etapas: 1. Adhesión y colonización de células en forma de levadura (casi esféricas) a una superficie biótica o abiótica, 2. Crecimiento y proliferación de células en forma de levadura para permitir la formación de una célula basal, 3. Crecimiento de pseudohifas (células elipsoides unidas de extremo a extremo) e hifas extensas (cadenas de células cilíndricas) concomitantes con la producción de la matriz extracelular, y 4. Dispersión de células en forma de levadura del biofilm a nuevos sitios(25). El papel de la matriz es proteger las células de *Candida* de células fagocíticas y actuar como una barrera para los fármacos y las sustancias tóxicas (26).

### **PATOLOGÍAS OCASIONADAS POR *Candida spp***

Las especies de *Candida* son la causa más común de infecciones fúngicas invasivas debido a que es una levadura que hace parte de la microbiota del hospedero y en casos de inmunosupresión esta puede diseminarse para diferentes órganos y tejidos, la infección fúngica invasiva por *Candida spp* se puede presentar en diferentes condiciones, como por ejemplo en pacientes internados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), pacientes con malignidad hematológica, pacientes trasplantados, pacientes con tumores sólidos, pacientes postquirúrgicos entre otros, como puede ser observado en la Figura 1.

## Distribución Infección Fúngicas Invasora (IFI)

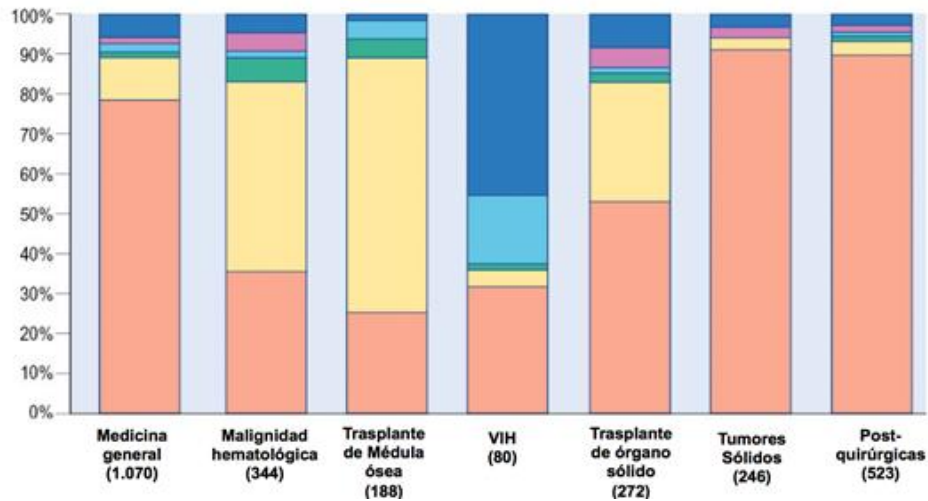


Figura 1 Distribución de la infección fúngica invasora(27)

Dentro de los factores de riesgo asociados a la candidiasis invasiva están presentes aquellas personas hospitalizadas, principalmente aquellos en UCI. Los neonatos prematuros de bajo peso al nacer tienen un riesgo extraordinariamente alto de candidemia y la incidencia más alta de candidemia ocurre en la UCI neonatal, en estos pacientes los factores de riesgo más comunes incluyen la presencia de un catéter venoso central (CVC) permanente, estancia prolongada en UCI con o sin ventilación asistida (mayor de 3 días), cirugía mayor reciente, pancreatitis necrotizante, cualquier tipo de hemodiálisis y la inmunosupresión (28).

La candidiasis invasiva en muchas ocasiones tiende a ser mortal a menos que se diagnostique y trate rápidamente con agentes antifúngicos activos contra las especies de *Candida* infecciosas. Para ello se utilizan distintos métodos diagnósticos como los cultivos de sangre (Hemocultivos), técnica apropiada para levaduras viables, estos poseen un porcentaje de rendimiento entre un 50-70% y tienden a ser negativos cuando existe poca concentración de *Candida* viable en el torrente circulatorio, lo que impide que pueda ser detectada en el hemocultivo (29) (30).



Existen métodos diagnósticos como el PNAFISH, el CHROMagar y el 1,3 b glucano, aunque desafortunadamente, no suelen estar disponibles en la mayoría de los centros hospitalarios y detectan un número limitado de especies, comparado con otras técnicas. La biopsia cutánea puede ser de gran ayuda, observándose agregados de hifas y esporas en la dermis, cercanos a los vasos sanguíneos. También aparece necrosis dérmica focal, extravasación hemática, infiltrados linfocíticos perivasculares y ocasionalmente eliminación transepidérmica de *Candida* (31).

Uno de los métodos más recientes de diagnóstico es la herramienta de MALDI-TOF, la cual permite la identificación de microorganismos a nivel de especie mediante la determinación de las masas moleculares de las proteínas, muchas de las cuales son proteínas ribosomales. Esta técnica se basa en la generación de espectros de masas a partir de células completas y su comparación con los espectros de referencia. Una vez que las muestras están listas, la determinación de la especie toma solo unos minutos (32).

## **5.2) OTROS TIPOS DE CANDIDIASIS**

### **5.3) CANDIDIASIS VULVOVAGINAL**

Dentro de los tipos de Candidiasis encontramos que la candidiasis vulvovaginal (VVC) es una afección común caracterizada por la inflamación vulvovaginal en combinación con la detección de una o más especies de *Candida*. Después de la vaginosis bacteriana, VVC es la segunda causa más común de vulvovaginitis. Casi el 75% de las mujeres tienen al menos un episodio de VVC en su vida y de estos un 5% a 10% se tornan recurrentes (33). *C. albicans* representa la mayoría de los casos de VVC (63-90%), siendo el resto atribuido a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. famata* y *C. tropicalis*. Existen varios factores de riesgo para casos de VVC esporádicos incluyendo la actividad sexual, uso de anticonceptivos, uso de antibióticos, ingesta de carbohidratos y diabetes (34).

Es así como los síntomas más frecuentes en las mujeres afectadas son: micción frecuente, disuria, dispareunia, leucorrea, ardor vaginal y en la vulva, picazón, etc. Las mujeres embarazadas infectadas con VVC también pueden terminar con resultados adversos del embarazo como aborto, parto prematuro, rotura prematura de membranas e Infecciones neonatales, lo que conduce a un enorme dolor físico y psicológico para la mayoría de los pacientes (35). Dada la sintomatología de VVC (picazón, inflamación y secreción) estas se superponen con las de otras infecciones vaginales comunes, y *Candida* se puede encontrar incluso cuando no es la causa de los síntomas. Por ejemplo, la *Candida* se puede aislar de la cavidad vaginal de un 20 a 30% de las mujeres con vaginosis bacteriana. Por otra parte, un estimado del 12-30% de mujeres no embarazadas y 9-20% de las mujeres embarazadas llevan *C. albicans* asintómicamente en la cavidad vaginal (36).

#### **5.4) CANDIDIASIS ORAL Y MUCOCUTANEA CRONICA**

Otra patología causada por *Candida spp* es la candidiasis oral, que se desarrolla debido a características fisiológicas propias de *Candida* como lo son su capacidad de adherencia y sus altos niveles de patogenicidad, lo cual le permite pasar de ser un microorganismo comensal habitual en la flora bucal de individuos sanos a uno patógeno (37) este tipo de patologías se debe a el uso de dentaduras postizas, inhaladores de corticosteroides y xerostomía y la inmunosupresión, causando variedad en su presentación clínica como: las candidiasis pseudomembranosas y candidiasis hiperplásicas, y eritematosas que se caracteriza por lesiones rojas e incluyen candidiasis atrófica aguda y crónica, glositis romboidea media, queilitis angular y eritema gingival lineal (38)

En la candidiasis mucocutánea crónica (CMC) se incluyen un grupo heterogéneo de síndromes caracterizados por infecciones sintomáticas no invasivas recurrentes o crónicas de la piel, uñas y membranas mucosas, usualmente causadas por *C. albicans*. varios son los factores del huésped que generan una mayor susceptibilidad a las infecciones como lo son el síndrome hiper-IgE autosómico-

dominante, defectos STAT1, defectos de la CARD9 entre otras mutaciones o alteraciones que causan en los individuos una inmunosupresión o falta de producción de determinada molécula fundamental en la respuesta contra el hongo (39).

## **5.5) ANTIFÚNGICOS CONTRA LAS CANDIDIASIS**

Tradicionalmente, el tratamiento de la candidemia se ha basado principalmente en antifúngicos que ahora incluyen tres clases principales de medicamentos: 1) Azoles los cuales se dividen en: Triazoles (fluconazol, voriconazol, Itraconazol) e Imidazol (miconazol, clotrimazol), 2) Equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) y 3) Polienos (anfotericina B desoxicolato [AmB-d], anfotericina B liposomal [L-AmB], complejo lipídico anfotericina B [ABLC] y dispersión coloidal de anfotericina B [ABCD]) y nistatina (40).

### **5.5.1) Azoles**

Durante las últimas décadas, se han logrado progresos considerables en el tratamiento de la infección fúngica mediante el desarrollo de antifúngicos azólicos. En general, los antifúngicos azólicos con imidazol N-sustituido o la estructura 1, 2,4-triazol presentan una actividad de amplio espectro contra levaduras, dermatofitos y hongos filamentosos. Los azoles actúan en la vía biosintética del ergosterol mediante la inhibición del citocromo P450-esterol dependiente de la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa, por coordinación del átomo de nitrógeno N3 o N4 (en el anillo de imidazol o triazol, respectivamente) y con el hierro de la enzima CYP51 como sexto ligando axial (41). Además de la coordinación con el hierro, los estudios de acoplamiento molecular y cristalográfico demostraron que otras partes de la molécula en los fármacos azoles interactúan con los residuos de aminoácidos de la enzima principalmente por fuerzas de van der Waals, interacciones de apilamiento hidrofóbicas y aromáticas (42).

### **5.5.2) Equinocandinas**

Las equinocandinas inhiben la síntesis de un componente fundamental de la pared del hongo, el beta-1,3- glucano. De forma específica, se fijan a la enzima que participa en la síntesis de este componente que es la 1-3 glucano sintetasa, impidiendo su función, lo que causa una pérdida de integridad de la pared del hongo. Esta circunstancia genera una lisis osmótica de las células del hongo, y produce un efecto fungicida contra cepas de *Candida* (43).

### **5.5.3) Polienos**

Son moléculas circulares que exhiben actividad antimicrobiana e incluyen de 3 a 8 dobles enlaces conjugados en su estructura; dos de sus ejemplos son la nistatina y la anfotericina B, las cuales ejercen una actividad antifúngica interactuando con el ergosterol en la membrana celular de hongos y a su vez creando poros y la salida de componentes celulares. Sin embargo, estos tipos de antimicóticos en su uso para humanos desencadenan una serie de efectos secundarios graves como la disfunción renal, el desequilibrio electrolítico y la hipotensión, lo que ha llevado a utilizar la formulación de Anfotericina B liposomal que presenta menor toxicidad debido a la relación que existe con la presencia de colesterol y de fosfolípidos poco termolábiles (44). De este modo el fármaco una vez presente en la sangre del paciente, pasaría a ser transportado en el interior de células con las que terminaría accediendo a los diferentes tejidos corporales alcanzado en ellos, incluso en el parénquima cerebral, concentraciones adecuadas. La presencia de inhibición en la actividad de una proteína de transferencia facilita que la parte que no ha penetrado en el interior de las células sea transportada por HDL. La ausencia de receptores para esta lipoproteína en la membrana de células renales junto con la escasa cantidad de fármaco libre en el plasma (<1%), facilita la consecución de concentraciones reducidas en el parénquima renal y con ello la menor nefrotoxicidad (45).

La anfotericina B es uno de los antifúngicos más utilizados en los casos graves de infecciones fúngicas, cabe resaltar que es un antifúngico de amplio espectro y generalmente los pacientes responden de forma adecuada al tratamiento. Sin embargo, hay especies de *Candida* como la *C. lusitania* y *C. guilliermondii* que presentan resistencia innata a esta droga, lo que torna fundamental el diagnóstico de especie para tener un resultado promisorio en el control de la enfermedad (46).

#### **5.6) RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS DE *Candida* spp.**

La resistencia microbiana y su evolución frente a los antimicrobianos comúnmente utilizados, ha evidenciado en los últimos cambios a nivel fisiológico y genético de los microorganismos frente a los distintos modos de combatir su supervivencia, no obstante el uso inadecuado y descontrolado respecto a: fallas en la dosificación, tratamientos no terminados para un tiempo establecido y uso recurrente de ellos a pacientes afectados por *Candida*, implica que se genere un problema en salud pública diariamente con un aumento en las tasas de resistencia y una limitación de opciones terapéuticas (47)

Es bien sabido que uno de los principales mecanismos de resistencia de *Candida* spp, es a los compuestos azólicos, esto debido a que es altamente utilizado en las terapias antifúngicas, este mecanismo se desarrolla debido a la actividad aumentada de las bombas de eflujo, conferida por los genes CDR1 y CDR2 los cuales confieren resistencia a casi todos los azoles, pertenecientes a la superfamilia del casete de unión al ATP, y MDR1 el cual proporciona resistencia al fluconazol, la sobreexpresión de estos genes y el subsiguiente aumento de la actividad de estas bombas impiden la acumulación del fármaco dentro de la célula en el sitio de acción perjudicando así la eficacia del mismo (48).

La resistencia a las equinocandinas se debe principalmente a mutaciones en los genes FKS (FKS1, FKS2 y FKS3) que se correlacionan con las sustituciones de

aminoácidos en la posición 1,3-  $\beta$  glucano sintasa, el blanco principal de las equinocandinas, la aparición de mutaciones puntuales en el gen FKS1, frecuentemente asociado con la sustitución de aminoácidos en dos regiones de la proteína, se correlaciona con la resistencia adquirida en *C. albicans* y especies relacionadas (49), respecto a la resistencia frente a los polienos especialmente a la Anfotericina B, donde se ha evidenciado la resistencia que ha habido en especies de *Candida* en la formación del Biofilm donde se ha encontrado que la presencia de altos contenido proteicos y de carbohidratos en la matriz extracelular del Biofilm confiere alta resistencia a este antifúngico (50).

### **5.7) PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

La situación actual de resistencia de los microorganismos al tratamiento quimioterápico convencional ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Los péptidos antimicrobianos han surgido en los últimos 25 años como una familia de sustancias con gran potencial para uso clínico, debido a sus múltiples mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia (51). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son generalmente cortos (10 a 50 residuos de aminoácidos), cargados positivamente (generalmente +2 a +9), y contienen más del 30% de residuos hidrofóbicos.

En los seres humanos, los diferentes tipos de AMPs son sintetizados y secretados por varias células y tejidos, incluyendo la piel, las superficies mucosas, los neutrófilos y los epitelios (10), siendo estos componentes del sistema inmune innato de vertebrados como animales, plantas y microorganismos, desempeñando un papel fundamental en el control de microorganismos potencialmente patógenos y también con una activación indirecta del sistema inmunológico (52).

Cuando se pliegan, muchos de estos péptidos exhiben estructuras helicoidales anfifílicas y pueden formar poros en las membranas microbianas, lo que causa ruptura de membrana y muerte celular eventual (10), dichos AMPs tienen un amplio

espectro de organismos dirigidos tales como bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), hongos, virus, parásitos o incluso células cancerígenas , también suelen tener una estructura anfipática. Por tanto, aunque las cargas positivas de los aminoácidos básicos facilitan la interacción con las cargas negativas de los fosfolípidos de las membranas biológicas, los aminoácidos hidrófobos facilitan la inserción de AMPs en la membrana, lo que conducirá eventualmente a la lisis de los microorganismos (53).

Algunos AMPs pueden actuar sobre objetivos internos, como la inhibición de ácido nucleico y / o síntesis de proteínas, además algunos AMPs aumentan selectivamente la respuesta inmune del huésped a través de la regulación de la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y promoviendo la quimiotaxis de células T, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. También pueden afectar la diferenciación de las células dendríticas y estimular la angiogénesis (52). Estos péptidos antimicrobianos pueden clasificarse según su estructura secundaria y su composición, como lineales, de hélice alfa (tales como cecropinas, magaininas y melli- tinas), caracterizados por el enriquecimiento de uno o dos aminoácidos, que contienen puentes disulfuro de hojas beta (defensinas, protegrinas) y fragmentos de otras proteínas más grandes con actividad antibacteriana (Tabla 1). (10)

Tipos de PAM	Ejemplos y origen
<b>Péptidos aniónicos</b>	Maximin de anfibios (1) Pequeños péptidos aniónicos ricos en ácido glutámico y aspártico, provenientes de ovejas, ganado y humanos
<b>Péptidos catiónicos lineales de hélice alfa</b>	Cecropinas (A), andropín (2), moricín, ceratotoxina y mellitín de insectos Cecropín P1 de nematodos <i>Ascaris</i> spp. (3) Magainín (4), dermaseptín, bombinin (5), brevinín-1, esculentinas y buforín II de anfibios Pleurocidín de la secreción mucosa de la piel de peces Plasmina seminal, BMAP, SMAP (SMAP29, ovispirín), PMAP del ganado, ovejas y cerdos (6) LL37 de humanos (7)
<b>Péptidos catiónicos enriquecidos para aminoácidos específicos</b>	Péptidos que contienen prolina, incluyendo la abaecina de las abejas (8) Péptidos que contienen prolina y arginina, incluyendo apidaecinas de las abejas, drosocin de <i>Drosophila</i> sp., picrocoricín del chupasavia europeo, bactenicinas del ganado (Bac7), ovejas y cabras, y PR-39 de cerdos (9) Péptidos que contiene prolina y fenilalanina, incluyendo profenina del cerdo (10) Péptidos que contienen glicina, incluyendo a himenoptaecina de las abejas (11) Péptidos que contienen glicina y prolina, incluyendo coleopterín y holotripcina de escarabajos (12) Polipéptidos salivales pequeños ricos en histidina, incluyendo histatinas del hombre y algunos primates mayores (13)
<b>Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro</b>	Péptidos que contienen un puente disulfuro, incluyendo brevinina (14) Péptidos con dos puentes disulfuro, incluyendo protegrinas del cerdo y taquiplesinas del cangrejo cacerola (15) Péptidos con 3 puentes disulfuro incluyendo alfa defensinas de humanos (HBD1, DEFB118), ganado, ratón, rata, cabra y aves de corral; y la 0-defensina rhesus del mono rhesus (16)
<b>Péptidos aniónicos catiónicos que son fragmentos de proteínas mayores</b>	Lactoferricina de la lactoferrina I (17) Casodicina I de la caseína humana Dominios antimicrobianos de la alfa lactoalbúmina bovina, hemoglobina humana, lisosima y ovoalbúmina

Tabla 1 Clasificación de péptidos antimicrobianos. (8)

Las catelicidinas son una familia (con más de 30 miembros) de AMPs catiónicos ampliamente encontrados en mamíferos (humanos, ganado, caballos, cerdos, ovejas, cabras, pollos, conejos). El AMP LL-37 catiónico también conocido como hCAP-18 debido a una estrecha relación con CAP18, una proteína antimicrobiana catiónica porcina de 18 KDa, FALL-39 o CAMP, es la única Catelicidina encontrada en seres humanos, monos Rhesus, ratones, ratas y cobayas. LL-37 es activo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, en particular contra *L. monocytogenes* (MIC 0,3  $\mu$ M), *E. coli* (MIC 0,1  $\mu$ M), *E. faecium* (MIC 0,1  $\mu$ M) y *S. enterica subsp. Enterica serovar Typhimurium* (MIC 0,4  $\mu$ M). (54).

Todas las catelicidinas (o péptidos antimicrobianos de catelicidina, CAMP) comparten un patrón de expresión similar. Se sintetizan como pre-proteínas con dominio N-terminal altamente conservado y dominio antimicrobiano C-terminal. El dominio N-terminal consta habitualmente de 94 a 114 aminoácidos y comparte



homología de secuencia con cathelin, un inhibidor de cisteína proteasa derivado de neutrófilos porcinos (por lo tanto, el nombre: dominio similar a catelina (CLD) (55).

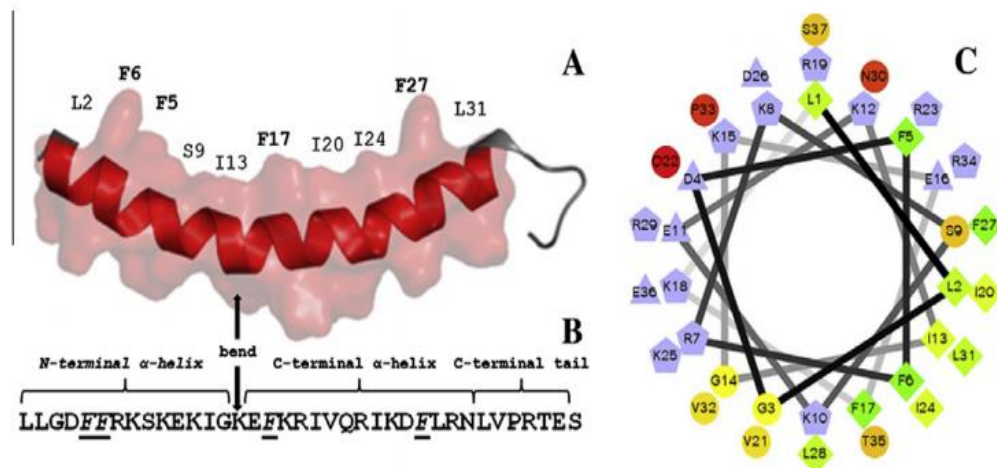
LL-37 es un péptido antimicrobiano catiónico purificado; llamado así debido a que empieza por dos leucinas y compuesto por 37 aminoácidos (LLGDFFRKSKE-KIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES), se almacena en gránulos de neutrófilos y células epiteliales específicos como un propéptido inactivo que se codifica en el cromosoma 3p21.3, y escinde extracelularmente por la proteinasa-3 para producir el péptido activo maduro; la expresión es constitutiva o inducida por contacto con bacterias o componentes de la pared celular bacteriana tales como LPS, alteración de la barrera de las células epiteliales, estrés del retículo endoplásmico (ER), infecciones y heridas (56).

Este péptido además de exhibir amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, LL-37 tiene otras actividades relacionadas con la defensa del huésped, incluida la migración quimiotáctica, la neutralización de endotoxinas, la angiogénesis y la cicatrización de heridas (10) (55).

<b>Regulación Positiva</b>	<b>Regulación negativa</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>. La citoquina IL - 17A (en sinergia con la vitamina D3)</li> <li>. Estrés del retículo endoplásmico</li> <li>. Lesión, herida</li> <li>. Fenilbutirato</li> <li>. Butirato sódico</li> <li>. TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Exotoxinas bacterianas</li> <li>. Calcipotriol</li> <li>. Estrés psicológico</li> <li>. IL-6</li> <li>. Infección con <i>Shigella</i></li> <li>. Transmigración a través del endotelio activado</li> </ul>

Tabla 2 Factores que influyen en la expresión de LL-37(55)

La estructura química de LL-37 en presencia de membranas o soluciones con concentraciones mM de sales, LL-37 forma una estructura  $\alpha$ -helicoidal anfipática catiónica, constituida por 3 partes: Una  $\alpha$ -hélice N-terminal seguida de una  $\alpha$ -hélice C-terminal y una cola C-terminal. Las dos hélices están separadas por una curva o ruptura, la superficie hidrofóbica cóncava de LL-37 está bordeada por residuos predominantemente cargados positivamente, permitiendo la interacción con moléculas o estructuras cargadas negativamente, tales como LPS, material genético y paredes celulares bacterianas. La superficie hidrofóbica de LL-37 está formada por las cuatro cadenas laterales de fenilalanina aromáticas que apuntan todas en la misma dirección (Fig 1) (56) (57).



**Figura 2** Figura tridimensional del péptido LL-37(56)

LL-37, junto con otros AMPs ejercen una actividad citotóxica efectuando la disrupción de la membrana microbiana por la creación de poros toroidales en la superficie de esta causando flujo de moléculas en la célula y en *Candida albicans* se ha evidenciado la inhibición de la adhesión a células blanco por interacción con los componentes celulares y alteración de la pared celular (58). cabe resaltar que LL-37 al actuar sobre la membrana del microorganismo en estado helicoidal, está expuesto a serias amenazas inhibitorias que lo neutralizan, incluyendo ciertas proteasas del huésped o compuestos microbianos lo que puede ser evitado por la

presencia de formas monoméricas que este posee (55). TEXTO RESUMIDO Y REDACTADO

Respecto al efecto antifúngico contra *C. albicans*, este es causado principalmente, por la inducción que produce LL-37 en la separación rápida de fases y la desintegración de la membrana en vesículas discretas, dando lugar a la formación de grandes poros o canales en la membrana citoplasmática permitiendo así la difusión exterior de moléculas menores de 40 kDa (56), junto con la inducción de la actividad ROS es eliminada eficazmente la viabilidad celular de *C. albicans* (59) .

Los péptidos utilizados en el presente estudio contienen diferencias o cambios a nivel de su estructura química, se obtuvieron a partir del péptido de referencia **LL-37-1 (LL-37)**, que posee una longitud de 24 aminoácidos y está amidado en la posición carboxilo terminal, el péptido **ACL 37-1 (AC-1)** posee una longitud de 23 aminoácidos, en el amino terminal hay acetilación, y amidación en el carboxilo-terminal, el péptido **ACL 37-2 (AC-2)** posee una longitud de 24 aminoácidos iniciando con el aminoácido glicina, en el amino terminal hay acetilación, y amidación en el carboxilo-terminal, el péptido **DL 37-2 (D)** posee una longitud de 25 aminoácidos y una modificación en la posición amino terminal que lo convierte en un enantiómero D.

### **5.8) BIOPELÍCULAS EN LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida***

Las biopelículas son el estado de crecimiento predominante de muchos microorganismos, conformado por una comunidad de células adherentes con propiedades distintas a las de las células planctónicas. Aunque los biofilms a menudo se adhieren a las superficies sólidas, también pueden formarse en otros entornos, como por ejemplo interfaces líquido-aire; una característica casi universal de los biofilms, en comparación con sus homólogos planctónicos poseen mayor resistencia a los ataques químicos y físicos (60).

La formación de biofilm es un potente factor de virulencia para una serie de especies de *Candida*, ya que confiere una tolerancia antifúngica, principalmente limitando la penetración de sustancias antimicóticas a través de la matriz extracelular. Los biofilms de *Candida* se han estudiado principalmente en superficies abióticas de dispositivos médicos tales como stents, shunts, prótesis dentales e implantes, marcapasos, tubos endotraqueales y otros tipos de catéteres (61) . Unos de los microorganismos expertos en la formación de biofilm son *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* y su presencia durante la infección se ha asociado a mayores tasas de mortalidad en comparación con los aislados incapaces de formar biofilms.

El desarrollo de la biopelícula depende generalmente de la cepa y las condiciones ambientales en las que se pueda desarrollar como la composición del medio, pH y oxígeno. Se ha demostrado que *C. glabrata* produce mayor biomasa de biopelícula en dispositivos de silicona en presencia de orina, en comparación con *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Por el contrario, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* producen una mayor biomasa de biopelícula en caldo de Sabouraud dextrosa (SDB) en comparación con *C. glabrata* (62).

*C. albicans* produce biopelículas compuestas de múltiples tipos de células en las que se encuentran células redondas; pseudohifas ovaladas e hifas cilíndricas alargadas) encerradas en una matriz extracelular con un alto contenido proteico (63) *C. albicans* posee una gran red transcripcional que controla el desarrollo de biofilms, esta red consta de seis reguladores transcripcionales principales (Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1 y Rob1), cada uno de los cuales es necesario para el desarrollo de biopelículas en modelos *in vitro* e *in vivo* (60). Otras de las proteínas identificadas en el desarrollo de la matriz del biofilm de *Candida* son las enzimas hidrolizantes como las aspartil proteinasas tal es el caso de la proteasa S-aspartil que se ha relacionado directamente con el número de genes SAP en especies patógenas de *Candida*. La enzima no sólo implica la adquisición de nitrógeno esencial para el crecimiento, sino que también proporciona medios para la colonización mejorada de

otros hongos. Además, las proteinasas fúngicas pueden ayudar a evadir las defensas del huésped a través de la degradación directa de las moléculas del huésped asociadas con una enzima lisosomal intracelular y la activación del sistema del complemento (61).

## 6. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo engloba un método de tipo cuantitativo; estudios descriptivos y explicativos; enfocado en la capacidad de la actividad antifúngica *In vitro* de los péptidos análogos derivados de LL-37 contra levaduras del género *Candida*, mediante la implementación de técnicas como las curvas de crecimiento con el fin de determinar la eficacia de los péptidos en levaduras del género *Candida*.

### 6.1) 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 sp*, proveniente de un aislamiento clínico de candidiasis recurrente *FVF* y *Candida albicans* SC 5314 cepa utilizada como cepa de referencia).

### 6.2) MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las cepas se mantuvieron criopreservadas a -80 °C, 24 horas antes de los experimentos fueron cultivadas en medio agar sabouraud dextrosa a temperatura  $\pm 35^{\circ}$  C.

### 6.3) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se analizaron 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 tendrá una diferencia significativa estadística con un p valor <0,05.

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

Las curvas de crecimiento se realizaron utilizando inóculos de las cepas *C. albicans* 256, *C. albicans* SC5314 y *Candida* FVF, resuspendidas en medio RPMI 1640 (BiowHITTAKER®, Lonza, Belgium) suplementado con MOPS a escala 0.5 McFarland obtenida con una densidad óptica de 0.08 a 0.1, que representa  $1 \times 10^8$  UFC/mL, haciendo uso del espectrofotómetro Genesys 10 UV/VIS, realizando lecturas a una longitud de onda de 600 nm.

Luego de obtener cada uno de los inóculos de las cepas *C. albicans* 256, *C. albicans* SC5314 y *Candida* FVF, a escala MacFarland se procedió a inocular en la placa 150  $\mu$ l de medio RPMI suplementado con MOPS y 150  $\mu$ l del inóculo. Para determinar la reproducibilidad en cada ensayo, cada uno fue montado por triplicado.

Para la determinación de las curvas de crecimiento y curvas de crecimiento utilizando los péptidos antimicrobianos, se utilizó el equipo BioScreen C a una temperatura constante de 36°C, una agitación continua el cual permite que los microorganismos se mantengan suspendidos uniformemente y durante 48 horas se realizaron intervalos de medición cada hora en forma de densidades ópticas a través de la presencia de turbidez a una longitud de onda de 600nm.

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

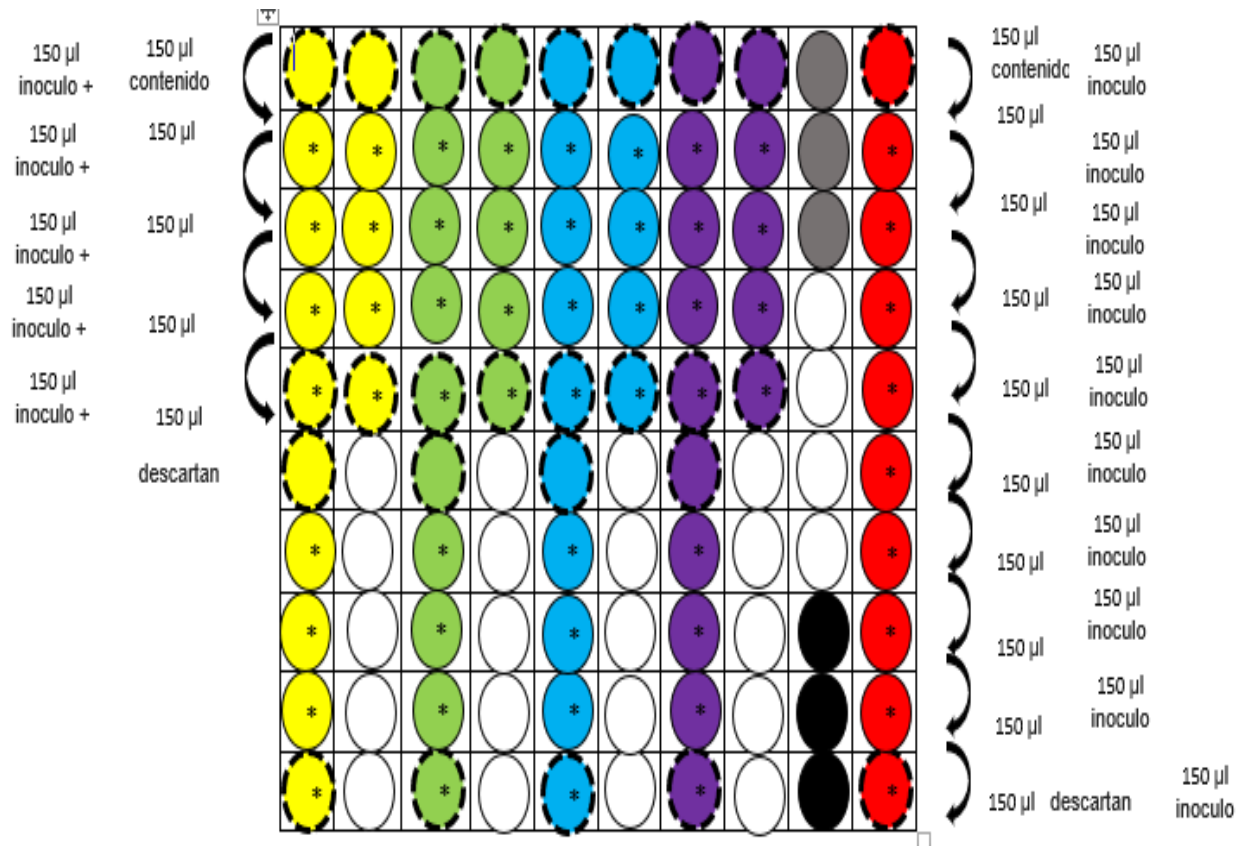
Para determinar la eficacia de los péptidos (AC-1, LL-37-1, AC-2 y D), en las tres cepas utilizadas en el experimento, se utilizaron cinco concentraciones diferentes de los péptidos: 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, 1.25  $\mu$ M, 0.62  $\mu$ M, las cuales se realizaron haciendo diluciones seriadas en base 2. Para cada péptido en el primer pozo de la placa se añadió 6 $\mu$ l de péptido concentrado a 1.000  $\mu$ M y 294  $\mu$ l medio RPMI suplementado con MOPS; en los siguientes 4 pozos se añadieron 150  $\mu$ l medio RPMI y a partir del primer pozo se extraen 150  $\mu$ l del contenido y se realizan las

diluciones seriadas en base dos, finalizando en el pozo 5, a continuación, a cada pozo se le añaden 150 µl inóculo (Cepa resuspendida en medio RPMI) (Fig. 2). Para aumentar la reproducibilidad de cada ensayo, cada uno fue montado por triplicado.

#### **6.6) CONTROL PARA *C. albicans* 256, *C. albicans* SC5314 y *Candida* FVF.**

Como control se utilizó Anfotericina B (Bristol Myers Squibb, Fungizone, Brooklyn, Nueva York), esta fue probada en las tres cepas *C. albicans* 256, *C. albicans* SC5314 y *Candida* FVF, a 10 concentraciones distintas: 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0.625 µg/mL, 0.312 µg/mL, 0.156 µg/mL, 0.07 µg/mL, fueron realizadas haciendo diluciones seriadas en base 2, en el primer pozo se añadió 200 µl de Anfotericina B (concentrada a 120 µg/mL) y 100 µl de medio RPMI suplementado con MOPS, en los siguientes pozos se añadió 150 µl de medio, y a partir del primer pozo se extraen 150 µl del contenido y se realizan las diluciones seriadas finalizando en el pozo 10, como puede ser observado en la Figura 2, a continuación a cada pozo se le añaden 150 µl inóculo (Cepa resuspendida en medio RPMI) (Fig. 2). Para aumentar la reproducibilidad de cada ensayo, cada uno fue montado por triplicado, como se muestra en el siguiente esquema.





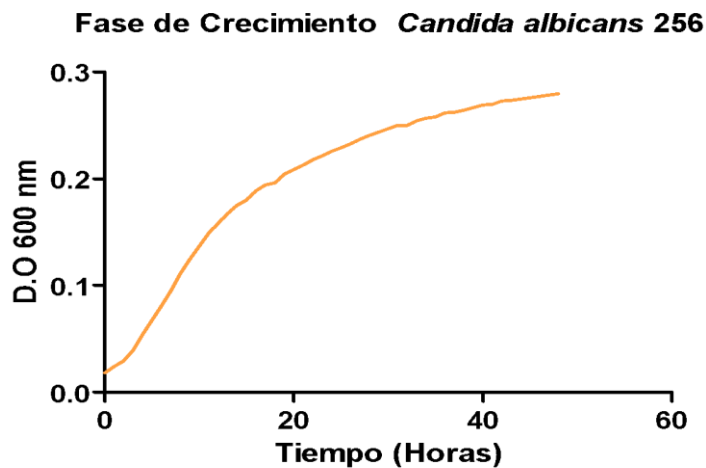
**Figura 3** Esquema montaje experimental.

Esquema de montaje experimental para cada cepa junto con péptido antimicrobiano análogo de LL-37, realizando diluciones seriadas en base 2. El \* presente en cada pozo indicada que previamente a la realización de las diluciones seriadas con los péptidos, a cada pozo se le añadieron 150 µl de medio RPMI suplementado con MOPS. El color amarillo representa el péptido **AC-1**, el color verde **LL-37-1**, el color azul **AC-2**, y el color morado **D**. El color rojo representa el control (Anfotericina B). El color gris representa el control de medio y el color negro el control de crecimiento de la levadura. Los círculos con línea punteada indican el inicio de la concentración 10 µM, seguido de 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM y el final con una concentración de 0.62 µM de cada réplica para cada péptido y para Anfotericina B iniciando con una concentración de 40 µg/mL y terminando con 0.07 µg/mL.

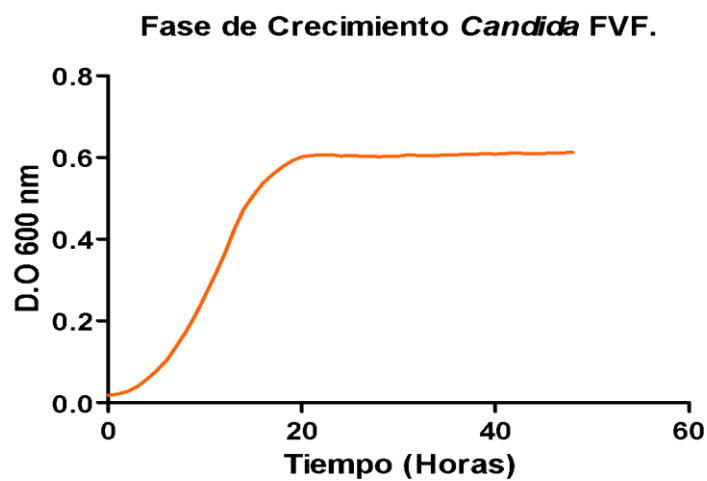
## 7. RESULTADOS

### 7.1) FASES DE CRECIMIENTO

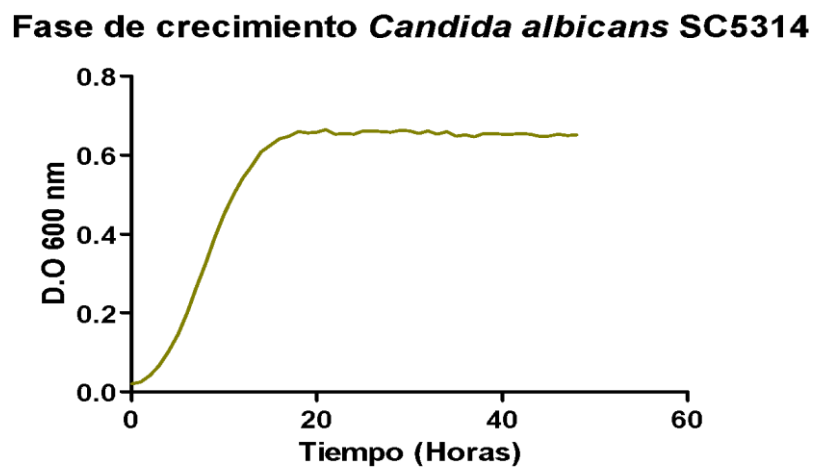
Obtenidas mediante el análisis automatizado de mediciones de densidad óptica de células en función del tiempo por el equipo BioScreen C en un periodo de 48 horas, como puede ser observado en la **figura 4**, un crecimiento en fase logarítmico de la levadura *C. albicans* 256 alcanzando una D.O de 0.3 con 48 horas de crecimiento. En la **figura 5**, se observa el crecimiento de la *Candida* FVF por un periodo de 48 horas y destacamos un crecimiento mayor de esta levadura alcanzando una D.O de 0.6. En *Candida albicans* SC5314 se observa el crecimiento por un periodo de 48 horas alcanzando una D.O de 0.6 en la **figura 6**.



**Figura 4** Curva de crecimiento basal de *Candida albicans* 256, en un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.



**Figura 5** Curva de crecimiento basal cepa *Cándida* FVF, en un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.



**Figura 6** Curva de crecimiento basal cepa *Candida albicans* SC 5314, en un periodo de 48 horas, utilizando medio RPMI suplementado con MOPS.

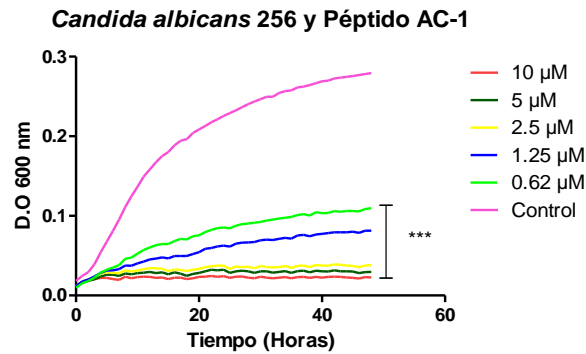
## 7.2) CURVAS DE CRECIMIENTO UTILIZANDO LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Con el objetivo de probar el posible efecto inhibitorio de los péptidos análogos de LL-37 en el crecimiento *in vitro* de las levaduras del género *Candida*, se realizaron curvas de crecimiento. Los resultados se discriminan como la disminución en el crecimiento de la levadura en presencia de péptido en comparación con crecimiento basal en ausencia de péptido.

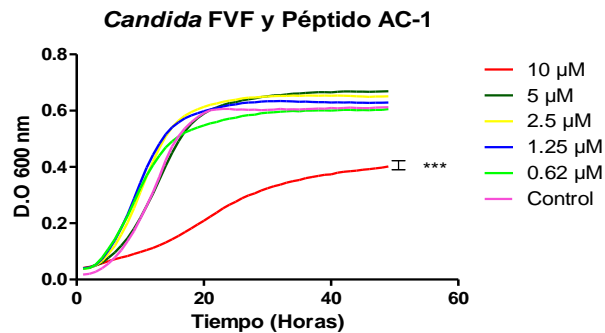
### Análisis de resultados

- **Péptido AC-1 actividad antimicrobiana.**

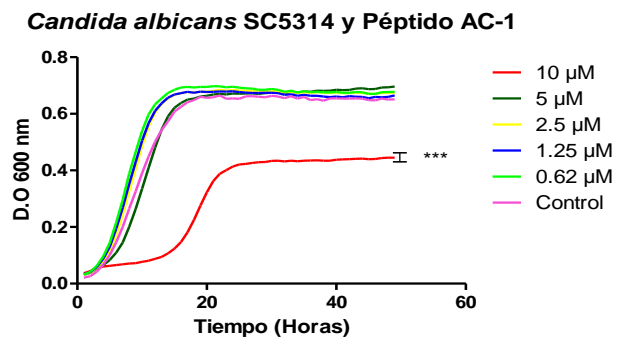
El uso del péptido AC-1 como péptido antimicrobiano en las levaduras, muestra como resultados referentes a la cepa *Candida albicans* 256 donde se obtuvo un efecto inhibitorio significativo con un  $p < 0.001$ , en todas las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$  y 0.625  $\mu\text{M}$ , (**Figura 7**). El efecto de AC-1 en las cepas *Candida* FVF (**Figura 8**) y *Candida albicans* SC5314 (**Figura 9**) muestra como resultados un comportamiento general inhibitorio significativo con un  $p < 0.001$  a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Todas las cepas comparadas con el grupo control (crecimiento basal durante 48 horas sin exposición al péptido).



**Figura 7** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 256 frente a distintas concentraciones del péptido AC-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$  en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



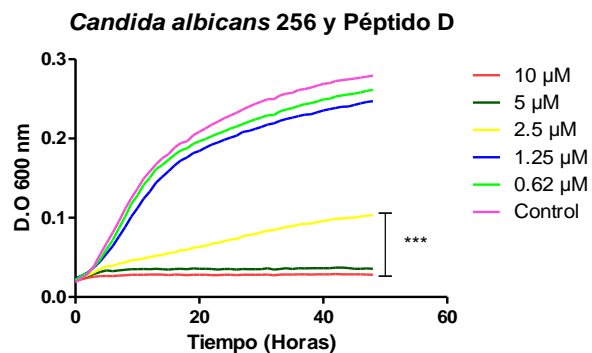
**Figura 8** Curva de crecimiento de la levadura *Candida* FVF frente a varias concentraciones del péptido AC-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



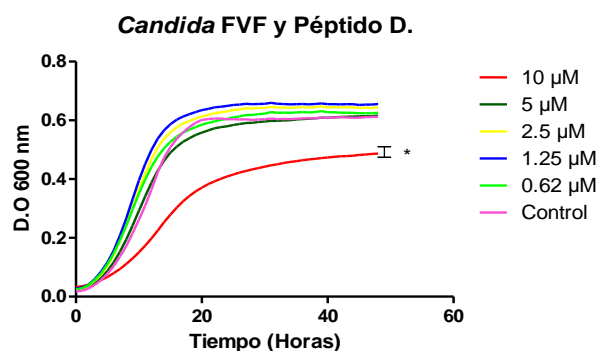
**Figura 9** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido AC-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

- **Péptido D actividad antimicrobiana**

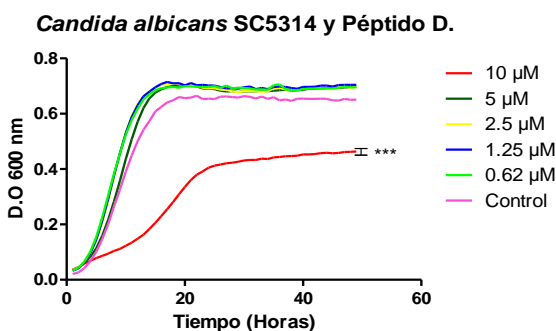
El péptido D exhibe resultados significativos con un  $p < 0.001$  en la inhibición de la cepa *Candida albicans* 256 a las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{M}$  (**Figura 10**), y en la cepa *Candida* FVF se evidenció un efecto inhibitorio significativo con un  $p < 0.05$  en la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 11**) y en la cepa *Candida albicans* SC5314 se demostró una inhibición significativa de  $p < 0.001$  en la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 12**). Todas las cepas comparadas con el grupo control (crecimiento basal durante 48 horas sin exposición al péptido).



**Figura 10** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 256 frente a varias concentraciones del péptido D. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



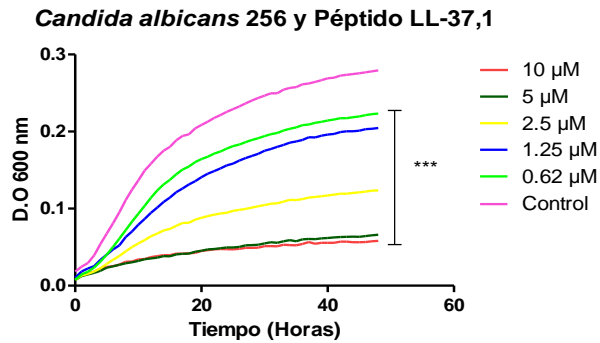
**Figura 11** Curva de crecimiento de la levadura *Candida* FVF frente a varias concentraciones del péptido D. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*  $p < 0.05$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



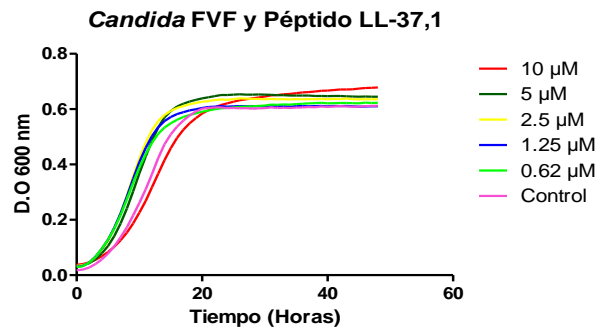
**Figura 12** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido D. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

- **Péptido LL-37-1 actividad antimicrobiana.**

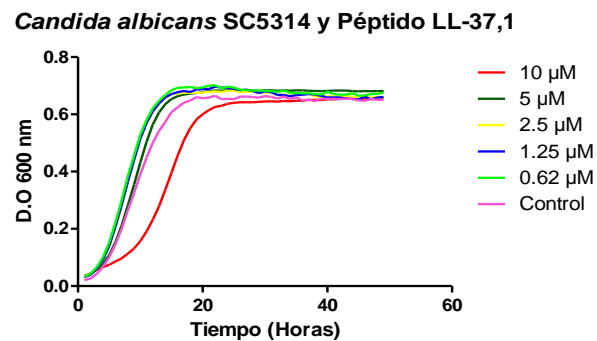
Los resultados del uso del péptido LL-37-1, demuestra en la cepa *Candida albicans* 256 un efecto inhibitorio significativo con un  $p < 0.001$  en todas las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$ , 0.62  $\mu\text{M}$  (**Figura 13**). En las cepas *Candida* FVF (**Figura 14**) y *Candida albicans* SC5314 (**Figura 15**), no se evidenció un efecto inhibitorio significativo con un  $p < 0.05$ . Todas las cepas comparadas con el grupo control (crecimiento basal durante 48 horas sin exposición al péptido).



**Figura 13** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 256 frente a varias concentraciones del péptido LL-37-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



**Figura 14** Curva de crecimiento de la levadura *Candida* FVF frente a varias concentraciones del péptido LL-37-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). No se evidenció una significancia estadística  $p < 0.05$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

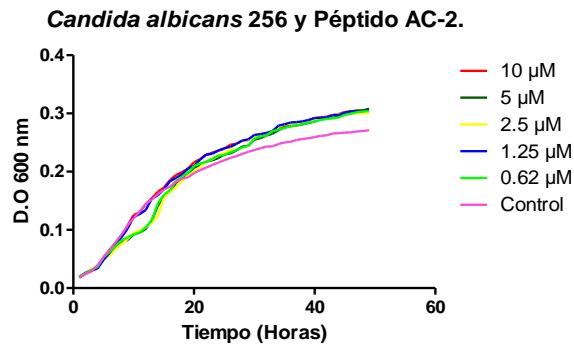


**Figura 15** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido LL-37-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). No se evidenció una significancia estadística  $p < 0.05$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

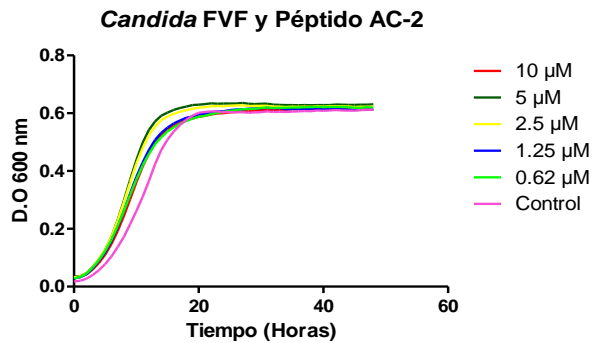


- **Péptido AC-2 actividad antimicrobiana**

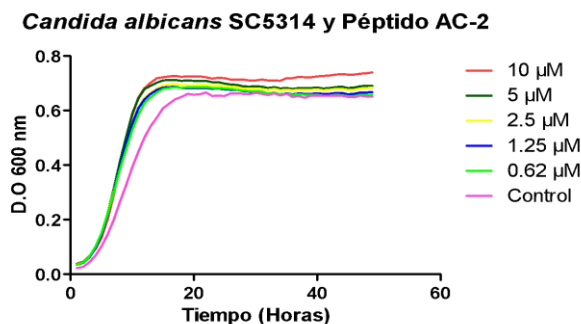
El péptido AC-2 no tuvo efecto antimicrobiano significativo  $p < 0.05$  en las cepas de *Candida albicans* 256 (**Figura 16**), *Candida* FVF (**Figura 17**) y *Candida albicans* SC5314 (**Figura 18**) en ninguna concentración del gradiente empleado en el estudio. Todas las cepas comparadas con el grupo control (crecimiento basal durante 48 horas sin exposición al péptido).



**Figura 16** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido LL-37-1. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). No se evidenció una significancia estadística  $p < 0.05$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



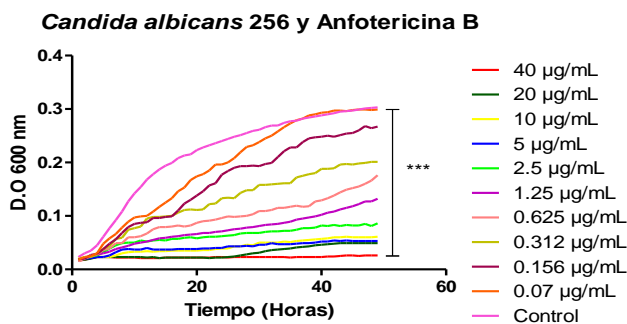
**Figura 17** Curva de crecimiento de la levadura *Candida* FVF frente a varias concentraciones del péptido AC-2. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). No se evidenció una significancia estadística  $p < 0.05$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



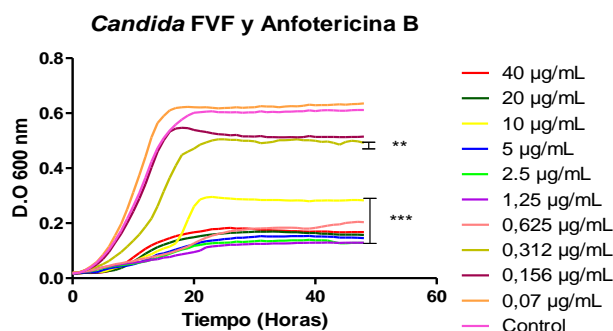
**Figura 18** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones del péptido AC-2. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido). No se evidenció una significancia estadística  $p < 0.05$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

- **Antifúngico control Anfotericina B.**

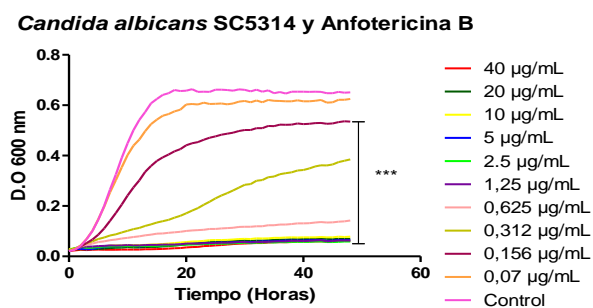
En este estudio se utilizó un control inhibitorio para todas las cepas tratadas el cual fue Anfotericina B, el antifúngico de uso común para el tratamiento de levaduras del género *Candida*. En la cepa *Candida albicans* 256 Anfotericina B efectuó una inhibición significativa con un  $p < 0.001$  a concentraciones de 40  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , 0.62  $\mu\text{g/mL}$ , 0.312  $\mu\text{g/mL}$ , 0.156  $\mu\text{g/mL}$ , 0.07  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 19**). En *Candida* FVF un efecto inhibitorio significativo con un  $p < 0.001$  a concentraciones de 40  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , 0.62  $\mu\text{g/mL}$  y  $p < 0.01$  a concentraciones de 0.312  $\mu\text{g/mL}$ , 0.156  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 20**). En *Candida albicans* SC5314 el efecto inhibitorio fue significativo  $p < 0.001$  en las concentraciones 40  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , 0.62  $\mu\text{g/mL}$ , 0.312  $\mu\text{g/mL}$ , 0.156  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 21**). Todos los efectos de inhibición de todas las cepas fueron comparadas con el crecimiento basal de cada una.



**Figura 19** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 256 frente a varias concentraciones de Anfotericina B. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.



**Figura 20** Curva de crecimiento de la levadura *Candida* FVF frente a varias concentraciones de Anfotericina B. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey



**Figura 21** Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* SC5314 frente a varias concentraciones de Anfotericina B. Control (Fase de crecimiento en ausencia de péptido), se observó una significancia estadística de \*\*\*  $p < 0.001$  en comparación con el grupo control, crecimiento basal en ausencia de péptido. Análisis por One-way ANOVA seguida de post-test Tukey.

## 8. DISCUSIÓN

Los experimentos ejecutados en este trabajo verificaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de los péptidos análogos de la catelicidina humana LL-37 frente a levaduras del género *Candida*. Las variaciones a nivel de la síntesis química de los péptidos sintéticos derivados de LL-37 reflejan una posible alternativa en el efecto antimicrobiano e incrementar de esta forma su efecto microbicida y/o inhibitorio en el crecimiento fúngico, favoreciendo los avances en el diseño racional de nuevos péptidos como posibles terapias antifúngicas.

En este trabajo los péptidos AC-1 y D reflejaron una actividad inhibitoria mayor con respecto a los péptidos AC-2 y LL-37, la variabilidad que se produjo entre estos péptidos frente a los procesos de inhibición posiblemente se debe a algunas de las características presentadas a continuación, los péptidos antimicrobianos están cargados positivamente (generalmente +2 a +9), (3) su naturaleza catiónica permite que estos péptidos, se unan de manera ideal a las cargas aniónicas de las membranas bacterianas y celulares. *Ringstad et al*, descubrió que la absorción de un péptido (CNY21) y la desestabilización de la membrana aumentan con la carga positiva del péptido, y se pierde por completo al eliminar todas las cargas positivas o aumentadas en exceso; (58) por lo tanto, mantener un balance óptimo entre las cargas dadas al péptido ayudará a aumentar el efecto antimicrobiano de estos.

Por otro lado la hidrofobicidad en los péptidos proporciona la capacidad de inserción en las membranas microbianas y está determinada por la naturaleza de aminoácidos que lo conforman definiendo así su efecto antimicrobiano; por último la anfipaticidad por lo general se define como la dualidad que poseen los péptidos al contener regiones apolares y polares dadas por la conformación de aminoácidos presentes en los péptidos (64) y que tiende a ser un requisito fundamental en la actividad de los péptidos antimicrobianos con estructura de alfa-hélice, por ende obtener una anfipaticidad perfecta posiblemente da como resultado un aumento simultáneo de la actividad antimicrobiana (65), de esta manera se ha informado previamente que la interacción entre los niveles de hidrofobicidad y la distribución

diferencial de residuos positivos a lo largo de la secuencia de un péptido antimicrobiano es un determinante principal y fundamental de la bioactividad de este.

Cabe destacar que el péptido LL-37,1 en la cepa *Candida albicans* 256, mostró un efecto inhibitorio en todas las cinco concentraciones del estudio dado que este péptido se encuentra amidado en la posición C-terminal y esta amidación ejerce un efecto protector (temporal) aumentando así su estabilidad frente a exonucleasas y potencializando su actividad biológica (66).

En cuanto a las variantes químicas del péptido LL-37, el péptido AC-1 mostró un excelente efecto de inhibición en las cinco concentraciones del estudio para la *Candida albicans* 256, a 10  $\mu\text{M}$  para *Candida* FVF y para *Candida albicans* SC5314. Este péptido posee un dominio N-terminal acetilado en su estructura química que le confiere una actividad potenciadora permitiendo así insertarse con más afinidad y una capacidad más profunda en la membrana celular impidiendo un apropiado empaquetamiento de lípidos y de este modo aumentando su capacidad lítica(67) El péptido D el cual posee un cambio estructural al costado derecho del carbono- $\alpha$  (carbono quiral) clasificándose como enantiómero D (la diferencia entre los aminoácidos viene dada por el resto -R, o cadena lateral del aminoácido de sustitución unida al carbono- $\alpha$ ). Este es un péptido cargado positivamente lo cual le permite unión a las cargas aniónicas de las membranas microbianas promoviendo la desestabilización estructural del microorganismo y además su estabilidad en sistemas proteolíticos potencia su efecto antimicrobiano.(68)

Pei-Wen Tsai y colaboradores detectaron la actividad antimicrobiana de LL-37 contra *C. albicans*, LL-37 tuvo un efecto fungicida comenzando en una dosis de 20  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ( $\sim 4.4 \mu\text{M}$ ) y su actividad anti-*Candida* fue dosis-dependiente; a 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ( $\sim 8,8 \mu\text{M}$ ), LL-37 inhibió fuertemente el crecimiento de hongos, pero a 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ( $\sim 1.1 \mu\text{M}$ ) tuvo un ligero efecto de inhibición sobre el crecimiento de *Candida* dentro de los efectos antimicrobianos de las concentraciones de péptido utilizadas en el

proyecto en comparación con las dispuestas por Pei-Wen Tsai y colaboradores, en el presente estudio se evidencia el efecto inhibitorio a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y 2,5  $\mu\text{M}$  de los péptidos análogos de LL-37,1, AC-1 y D frente a la cepa 256 de *C.albicans*, con respecto a las cepas FVF y SC5314 el efecto inhibitorio se logró solo a la concentración más alta. Es de anotar que la finalidad de proponer nuevos péptidos antimicrobianos como posibles candidatos para el perfeccionamiento y producción de fármacos terapéuticos, consiste en la búsqueda de concentraciones mínimas en las que consecuentemente podría disminuir el riesgo de citotoxicidad en células del hospedero (69).

En este trabajo no fue establecido el verdadero mecanismo de acción de los análogos del péptido LL-37 pero se han relacionado estudios tales como el de Pei-Wen Tsai<sup>1</sup> y colaboradores donde han definido el verdadero mecanismo de acción inhibitorio de LL-37 frente a *Candida albicans* teniendo en cuenta que el primer paso para la colonización de *Candida* en el individuo es la adhesión al tejido celular, este proceso tiende a darse por medio de la pared celular rica en carbohidratos que permiten la fácil adhesión a las células del hospedero, en ese estudio se utilizó LL-37 para mirar la fijación de *C. albicans* a una superficie abiótica, a la epidermis oral y a vejigas urinarias murinas, se encontró que la viabilidad celular de *Candida* era más sensible a concentraciones más altas de (20 a 40 mg / ml) en comparación con concentraciones más bajas (5 y 10 mg / ml), teniendo en cuenta que a concentraciones de 20 mg/dl se indujo muerte celular. De acuerdo con los resultados de un ensayo de competencia, los efectos inhibidores de LL-37 sobre la adhesión y agregación celular estuvieron mediados por su unión preferencial al manano, el componente principal de la pared celular de *C. albicans*, y parcialmente por su capacidad de unirse a quitina o glucano, que subyace a la capa de manano (10).

Hoy en día se han probado en *Candida* varios péptidos provenientes de distintos orígenes la variabilidad de los AMPs ha hecho que su estudio y utilidad se haya abarcado satisfactoriamente, como lo es el caso de Marie Kodedová y

colaboradores donde utilizaron péptidos provenientes del veneno de la abeja silvestre *Halictus sexcinctus* HAL-2 el cual posee doce aminoácidos de largo y tiene cuatro cargas positivas. Para este estudio se seleccionaron cuatro análogos de HAL-2, uno de los péptidos el péptido VII compuesto completamente de D-aminoácidos, fue el que mostró mejor actividad antimicrobiana contra la mayoría de las cepas utilizadas, esta excelente eficacia de D-péptido se debe a que poseen mayor estabilidad en los sistemas proteolíticos (15) comparado en el presente estudio con el péptido D, el cual contiene dos fenilalaninas en posición D demostrando ser uno de los péptidos con mayor eficacia inhibitoria en las cepas del estudio.

Los péptidos AC-1 y D se proponen en este trabajo como alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones de levaduras en estado planctónico y a las infecciones asociadas a la formación de biopelículas como mecanismo de virulencia, tras la probabilidad de generar poca resistencia y posiblemente baja toxicidad en células del hospedero; demostrando su potencial antimicrobiano en células eucariotas expuestas en este estudio como las levaduras del género *Candida*.

Actualmente la terapia común para el tratamiento de infecciones fúngicas tiende a ser tratamientos con medicamentos azólicos, equinocandinas y polienos dentro del cual se encuentra la Anfotericina B ejerciendo su papel inhibitorio a través de su unión específica al ergosterol de membrana, desencadenando así la formación de poros y la pérdida de permeabilidad selectiva a través de la fuga de iones, según Jose P. Guirao et al, Anfotericina B también es capaz de ejercer en células de *Candida albicans* la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una fuerte activación inducida de la actividad enzimática de catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa (70).

En un estudio Touil et determinaron la actividad antimicrobiana de Anfotericina B, caspofungina, voriconazol y dos combinaciones antifúngicas (anfotericina B / caspofungina) y anfotericina B / voriconazol) en 11 aislados de *C. albicans*

provenientes de dispositivos médicos determinando la MIC para cada uno y demostrando así que Anfotericina B en todos los aislamientos produjo sensibilidad y una MIC de 0,25 a 1 µg/mL (71) comparado en este estudio en la cepa *Candida albicans* 256 resistente a azoles la cual demostró un efecto inhibitorio en las diez concentraciones utilizadas de Anfotericina B incluyendo 0.156 µg/mL y 0.07 µg/mL siendo en este caso concentraciones relativamente bajas y con posible uso para poder ser utilizadas en estudios de citotoxicidad.

Ciertos aspectos señalan a la Anfotericina B como uno de los medicamentos con mayores efectos adversos después de su administración, uno de ellos es el shock anafiláctico, arritmias y falla hepática, pero también existen reacciones generadas a partir de la continua administración de este antifúngico incluyendo la hipokalemia, hipomagnesemia, toxicidad medular y la toxicidad que genera mayor preocupación en el campo médico la nefrotoxicidad (72).

Es por ello que se debe seguir en la búsqueda continua de péptidos antimicrobianos con propiedades antifúngicas, optimizando parámetros biofísicos, minimizando la toxicidad en células eucarióticas y maximizando el efecto antimicrobiano, se considerarán como candidatos potenciales a nuevos fármacos dado su mecanismo de acción rápida al enfocarse específicamente en las membranas fúngicas reduciendo así la resistencia y la duración de los tratamientos, de este modo generando gran impacto en salud pública debido a que aumenta la probabilidad de tener alternativas de solución en enfermedades infecciosas provocadas por levaduras del género *Candida* donde se han reportado multirresistencias a medicamentos utilizados actualmente.



## 9. 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 más especies de levaduras del género *Candida* (En curso).

Evaluar la actividad antifúngica de los péptidos análogos de LL-37 en la formación de biofilm de levaduras del género *Candida* (En curso).

## ANEXOS

### Anexo 1: Protocolo para preparación de Agar Sabouraud dextrosa (Scharlau).

1. Pesar el contenido de Agar Sabouraud en gramos necesario para preparar 250 ml de Agar Sabouraud.

1000 mL	→	65 gramos.
250 mL	→	X

$$X = \frac{250 \text{ ml} * 65 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 16.25 \text{ gr}$$

Se debe adicionar 16.25 gr para 250 ml de agua destilada.

2. Homogenización
3. Esterilización por autoclave (15 minutos a 121°C)
4. Retirar el medio de la autoclave, dejar en reposo el medio por 5 minutos y servir en cajas de Petri.

**Anexo 2: Protocolo para preparar concentraciones de péptidos AC-1,  
LL-37,1, AC-2, D.**

Todos los péptidos se encontraron a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ .

Se utilizó la siguiente fórmula para llevar los péptidos a una concentración de 10 $\mu\text{M}$ .

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

$$V_1 * 1000 \mu\text{M} = 300 \mu\text{l} * 20 \mu\text{M}$$

$$V_1 = \frac{300 \mu\text{l} * 20 \mu\text{M}}{1000 \mu\text{M}}$$

**$V_1 = 6 \mu\text{l} + 294 \mu\text{l}$  medio RPMI suplementado con MOPS.**

**NOTA:** Como concentración final se colocó la concentración deseada al doble ya que en este caso se le añadieron 150  $\mu\text{l}$  del inóculo (Cepa de *Candida* más medio RPMI), a cada pozo por lo tanto la concentración del péptido se diluirá mucho más.

### Anexo 3: Protocolo para preparar concentraciones de Anfotericina B.

Se utilizó Anfotericina B concentrada a 120 µg/ml.

Se utilizó la siguiente fórmula para tener una concentración de Anfotericina B de 40 µg/ml.

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

$$V_1 * 120 \mu\text{g/ml} = 300 \mu\text{l} * 80 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = \frac{300 \mu\text{l} * 80 \mu\text{g/ml}}{120 \mu\text{g/ml}}$$

**V<sub>1</sub> = 200 µl + 100 µl medio RPMI suplementado con MOPS.**

**NOTA:** Como concentración final se colocó la concentración deseada al doble ya que en este caso se le añadieron 150 µl del inóculo (Cepa de *Candida* más medio RPMI), a cada pozo por lo tanto la concentración de la Anfotericina B se diluirá mucho más.

## 10. REFERENCIAS

1. Alvarez-moreno CA. Burden of Fungal Infections in Colombia. 2018;1–13.
2. Merseguel KB, Nishikaku AS, Rodrigues AM, Padovan AC, Carmona R, Salles A, et al. Genetic diversity of medically important and emerging

- Candida species causing invasive infection. 2015;1–11.
3. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ, Nac N-C. Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species : Beyond the Candida albicans Paradigm. 2013;9(9).
  4. Whibley N, Gaffen SL. Beyond Candida albicans: Mechanisms of immunity to non-albicans Candida species. Cytokine. 2015;76(1):42–52.
  5. Pfaller MA, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Antifungal susceptibilities of Candida , Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus from the Asia and Western Paci fi c region : data from the SENTRY antifungal surveillance program ( 2010 – 2012 ). 2015;(November 2014):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2015.29>
  6. Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance : Mechanisms , Epidemiology , and Consequences for Treatment. AJM [Internet]. 2012;125(1):S3–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
  7. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates among Candida Bloodstream Infection Isolates : Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program ( 2008 to 2009 ) □. 2011;49(1):396–9.
  8. Tema DE. Péptidos antimicrobianos. 2010;14(1):55–67.
  9. de la Fuente-Núñez C, Silva ON, Lu TK, Franco OL. Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. Pharmacol Ther. 2017;
  10. Tsai PW, Yang CY, Chang HT, Lan CY. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of Candida albicans by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. PLoS One. 2011;6(3).

11. Carrascosa JM. Mecanismo De acción De ustekinumab y su relevancia en la patogénesis De la psoriasis. Impacto en el sistema inmune. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(SUPPL. 2):7–15.
12. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. European Journal of Internal Medicine Candidemia and invasive candidiasis in adults : A narrative review. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
13. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, et al. Risk Factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care Unit Patients : The NEMIS Prospective Multicenter Study. 2001;6:177–86.
14. Giongo JL, de Almeida Vaucher R, Fausto VP, Quatrin PM, Lopes LQS, Santos RCV, et al. Anti-Candida activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microb Pathog.* 2016;100:170–8.
15. Kodedová M, Sychrová H. Synthetic antimicrobial peptides of the halictines family disturb the membrane integrity of *Candida* cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2017;1859(10):1851–8.
16. Scarsini M, Tomasinsig L, Arzese A, D'Este F, Oro D, Skerlavaj B. Antifungal activity of cathelicidin peptides against planktonic and biofilm cultures of *Candida* species isolated from vaginal infections. *Peptides.* 2015;71:211–21.
17. Maurya IK, Thota CK, Sharma J, Tupe SG, Chaudhary P, Singh MK, et al. Mechanism of action of novel synthetic dodecapeptides against *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(11):5193–203.
18. Chang H-T, Tsai P-W, Huang H-H, Liu Y-S, Chien T-S, Lan C-Y. LL37 and hBD-3 elevate the  $\beta$ -1,3-exoglucanase activity of *Candida albicans* Xog1p,

- resulting in reduced fungal adhesion to plastic. *Biochem J.* 2012;441(3):963–70.
19. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans* : A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. 2012;2012.
  20. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2015;122(6):785–94.
  21. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(1):67–78.
  22. Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88(6):250–65.
  23. Mothibe J V., Patel M. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. *Microb Pathog.* 2017;110:128–34.
  24. Luis J, Pozo D. *Revista Iberoamericana de Micología Candidiasis asociada a biopelículas.* 2016;33(3):176–83.
  25. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012;148(1–2):126–38.
  26. Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM, Hanson MF, et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):87–93.
  27. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et



- al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients : Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. 2019;48(August 2018):1695–703.
28. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(1):103–24.
  29. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the missing 50% of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1284–92.
  30. Kaaniche FM, Allela R, Cherif S, Algia N ben. Invasive candidiasis in critically ill patients. *Trends Anaesth Crit Care.* 2016;11:1–5.
  31. Valdivielso-Ramos M, Mauleón C. Diagnóstico diferencial de la candidiasis sistémica. *Piel.* 2012;27(10):581–90.
  32. Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria ? *Trends Microbiol [Internet].* 2016;xx:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>
  33. Iavazzo C, Gkegkes ID, Zarkada IM, Falagas ME. Boric Acid for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis : 2011;20(8).
  34. Tardif KD, Schlaberg R. Development of a real-time PCR assay for the direct detection of *Candida* species causing Vulvovaginal candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;88(1):39–40.
  35. Sun M-G, Huang Y, Xu Y-H, Cao Y-X. Efficacy of vitamin B complex as an adjuvant therapy for the treatment of complicated vulvovaginal candidiasis: An in vivo and in vitro study. *Biomed Pharmacother.* 2017;88:770–7.
  36. Blostein F, Levin E, Wagner J, Foxman B. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis,. *Ann Epidemiol.* 2017;

37. Authors T, Munksgaard B. Oral mucosal fungal infections. 2009;49:39–59.
38. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. Vol. 34, Clinics in Dermatology. Elsevier B.V.; 2016. 487-494 p.
39. Khullar G, Vignesh P, Lau YL, Rudramurthy SM, Rawat A, De D, et al. Chronic Mucocutaneous Candidiasis. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017;5(4):1119–21.
40. Moriyama B, Gordon LA, Mccarthy M, Stacey A, Walsh TJ, Penzak SR. NIH Public Access. 2015;57(12):718–33.
41. Warrillow AG, Parker JE, Kelly DE, Kelly SL. Candida albicans and Homo sapiens. 2013;57(3):1352–60.
42. Emami S, Tavangar P, Keighobadi M. An overview of azoles targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase for antileishmanial therapy. Eur J Med Chem. 2017;135:241–59.
43. Azanza JR, Montejo M. Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(SUPPL. 14):14–20.
44. Kinoshita H, Yoshioka M, Ihara F, Nihira T. Cryptic antifungal compounds active by synergism with polyene antibiotics. J Biosci Bioeng. 2016;121(4):394–8.
45. Perea A. Anfotericina B forma liposómica : un perfil farmacocinético exclusivo . Una historia inacabada . 2012;25(1):17–24.
46. Candida D, De E, Porte L, León P, Gárate C, Guzmán AM, et al. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de. 2010;149–55.
47. Brillhante RSN, Paiva MAN, Sampaio MS, Teixeira CEC. Macrobrachium amazonicum: 2011;76:268–77.

48. Brilhante RSN, Paiva MAN, Sampaio CMS, Castelo-Branco DSCM, Teixeira CEC, de Alencar LP, et al. Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: An efflux-pump-mediated mechanism. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47(1):33–8.
49. Morace G, Perdoni F, Borghi E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014;2(4):254–9.
50. Fernandes T, Silva S, Henriques M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix-involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83(2):165–9.
51. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Grup Inmunol Mol.* 2010;14(1):55–67.
52. Rossi DC, Munoz JE, Carvalho DD, Belmonte R, Faintuch B, Borelli P, et al. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC Microbiol.* 2012;12(1):28.
53. Zhu M, Liu P, Niu ZW. A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chem Lett.* 2016;
54. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol.* 2016;
55. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Reports.* 2016;68(4):802–8.
56. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the lactoferrin human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012;280(1):22–35.
57. Wang G. Structures of Human Host Defense Cathelicidin LL-37 and Its

Smallest Antimicrobial Peptide KR-12 in Lipid Micelles \* □. 2008;

58. Malmsten M. Interactions of Antimicrobial Peptides with Bacterial Membranes and Membrane Components. 2016;16–24.
59. Wong JH, Ng TB, Legowska A, Rolka K, Hui M, Cho CH. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. *Peptides*. 2011;32(10):1996–2002.
60. Nobile CJ, Johnsonb AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:71–92.
61. Hamid S, Zainab S, Faryal R, Ali N, Sharafat I. Inhibition of secreted aspartyl proteinase activity in biofilms of *Candida* species by mycogenic silver nanoparticles. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2017;(2016):1–7.
62. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2011;19(5):241–7.
63. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, Cormick TMC, Ghannoum MA. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans* : Development , Architecture , and Drug Resistance. 2001;183(18):5385–94.
64. Tanaka M, Takamura Y, Kawakami T, Aimoto S, Saito H. Effect of amino acid distribution of amphipathic helical peptide derived from human apolipoprotein A-I on membrane curvature sensing. *FEBS Lett [Internet]*. 2013;587(5):510–5.
65. Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide – membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]*. 2016;141:528–36.

66. Nuijens T, Piva E, Kruijtz JAW, Rijkers DTS, Liskamp RMJ, Quaedflieg PJLM. Enzymatic C-terminal amidation of amino acids and peptides. *Tetrahedron Lett* [Internet]. 2012;53(29):3777–9.
67. Alvares DS, Wilke N, Ruggiero J. BBA - Biomembranes Effect of N-terminal acetylation on lytic activity and lipid-packing perturbation induced in model membranes by a mastoparan-like peptide. *BBA - Biomembr* [Internet]. 2018;1860(3):737–48.
68. Aminoácidos y péptidos 1 . :49–62.
69. Tsai P, Cheng Y, Hsieh W, Lan C. Responses of *Candida albicans* to the Human Antimicrobial Peptide LL-37. 2014;52(8).
70. Guirao-abad JP, Sánchez-fresneda R, Albuquerque B, Hernández JA, Argüelles J. Ac ce p cr t. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2017;
71. Touil HFZ, Boucherit-otmani Z, Boucherit K. ScienceDirect In vitro activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in an intensive care department. *J Mycol Med* [Internet]. 2018;6–10.
72. C LM, Novoa C, Carlos M. Uso de anfotericina B deoxicolato y sus reacciones adversas en un hospital universitario en Chile. 2007;

