



*Actividad in vitro e in vivo de péptidos antifúngicos derivados de la catelicidina humana LL-37,
sobre aislamientos clínicos y de referencia causantes de candidiasis vulvovaginal*

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá , Mayo de 2022



*Actividad in vitro e in vivo de péptidos antifúngicos derivados de la catelicidina humana LL-37,
sobre aislamientos clínicos y de referencia causantes de candidiasis vulvovaginal*

Karem Juliette Guzmán Torres
Wendy Daniela Mejía Contreras

Asesor interno

Gladys Pinilla Bermudez M.Sc Ciencias químicas

Asesor externo

Julián Esteban Muñoz Henao, PhD Microbiología

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, Mayo de 2022



Actividad *in vitro e in vivo* de péptidos antifúngicos derivados de la catelicidina humana

LL-37, sobre cepas de referencia y aislamientos clínicos causantes de candidiasis

vulvovaginal

CONCEPTO

APROBADA _____

MERITORIA _____

LAUREADA _____

Jurados: _____

Asesor Externo: Julián Esteban Muñoz Henao PhD.

Asesor Interno: Gladys Pinilla Bermudez M.Sc Ciencias Químicas

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, Mayo de 2022

DEDICATORIA

Este proyecto de investigación está dedicado a Dios por guiarnos en este camino y habernos llenado de fortaleza en momentos de adversidad, a todos nuestros seres queridos incluyendo familiares y amigos, quienes nos ayudaron a alcanzar nuestro máximo potencial incluso en los momentos más difíciles y siempre nos apoyaron a lo largo de toda la carrera, impulsándonos con su motivación y comprensión incondicional. También este trabajo está dedicado a nuestros asesores, Julian Esteban Muñoz y Gladys Pinilla Bermudez, por habernos orientado durante el desarrollo de este proyecto ofreciéndonos su capacidad y conocimiento científico, que fue de vital importancia en el momento de realizar este proyecto; sentando en nosotras un amor profundo por la ciencia y las bases para ser futuras investigadoras.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecemos a nuestros asesores, al profesor Julián Esteban Muñoz docente de la Universidad del Rosario por su enorme entusiasmo, compromiso, paciencia y gran apoyo que fueron fundamentales para el desarrollo del proyecto, a la profesora Gladys Pinilla Bermudez, por su confianza y disposición para enseñar, por acogernos en su semillero y encaminarnos en este maravilloso proyecto, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos una formación integral como profesionales de la salud, y además por el constante apoyo y guía de los docentes que fomentaron en nosotras el espíritu científico a lo largo de toda la carrera. Así mismo agradecemos a la Red Colombiana de semilleros de investigación (RedColsi) por habernos dado la oportunidad de enriquecer nuestro trabajo de grado, mediante el financiamiento de una parte de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
3. MARCO REFERENCIAL	16
3.1 Generalidades del género Candida spp	16
3.2 Factores de virulencia del género Candida spp.	16
3.3 Candidiasis vulvovaginal	18
3.4 Epidemiología de la candidiasis vulvovaginal	19
3.5 Tratamiento de la candidiasis vulvovaginal	19
3.6 Resistencia a los antifúngicos	20
3.7 Péptidos antimicrobianos	20
3.7.1 Defensinas	21
3.7.2 Histatinas	21
3.7.3 Catelicidinas	22
3.7.3.1 Péptido LL-37	22
3.8 Diseño de péptidos antimicrobianos	23
4. MARCO METODOLÓGICO	25
4.1 Diseño metodológico	25
4.2 Materiales y métodos	25
4.2.1 Curvas de crecimiento	26
4.2.2 Microdilución en caldo (MIC)	27
4.2.3 Microscopía de Fluorescencia	28
4.2.4 Microscopía electrónica de transmisión	28
4.2.5 Modelo in vivo de candidiasis	28
4.2.6 Análisis de Carga Fúngica	29
4.2.7 Análisis Histopatológico	29
4.2.8 Análisis estadístico	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Curvas de crecimiento	30
5.2 Concentración mínima inhibitoria	31
5.3 Microscopía de fluorescencia	34
5.4 Microscopía de transmisión	35
5.5 Modelo in vivo	36
5.5.1 Análisis de carga fúngica	36
5.5.2 Análisis histopatológico	37

6. DISCUSIÓN	38
6.1 CONCLUSIONES	43
6.2 RECOMENDACIONES	44
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8. ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de formación de Biopelícula y activación de polimorfismo de la levadura <i>Candida albicans</i> .	17
Figura 2. Mecanismo de acción del LL-37.	23
Figura 3. Modificaciones realizadas al LL37	24
Figura 4. Curva de crecimiento de la levadura <i>Candida albicans</i> 1738 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37.	30
Figura 5. Microscopía de fluorescencia de la levadura <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a la MIC del péptido LL37-D.	34
Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de la levadura <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente al péptido LL37-D.	35
Figura 7. Unidades formadoras de colonias (UFCs) de riñones (R), bazo (B) e hígados (H) de ratones BALB/c infectados por vía intravenosa con 10^3 levaduras de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	36
Figura 8. Secciones histológicas del Riñón de ratones BALB/c infectados con 10^3 levaduras de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño metodológico	25
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de los peptidos análogos al LL37 y FCZ frente a diferentes aislamientos de <i>Candida</i> .	32
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de los peptidos análogos al LL37 en sinergia con FCZ frente a diferentes aislamientos de <i>Candida</i> .	33



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Actividad *in vitro* e *in vivo* de péptidos antifúngicos derivados de la catelicidina humana LL-37, sobre aislamientos clínicos y cepas de referencia causantes de candidiasis vulvovaginal

RESUMEN

Candida albicans, es el principal agente causal de la candidiasis vulvovaginal recurrente (VVCR), las cepas de candida aisladas de pacientes con VVCR presentan una alta resistencia a la terapia convencionalmente usada para su tratamiento por lo tanto, como alternativa terapéutica han sido estudiados péptidos antimicrobianos de amplio espectro, dentro de los cuales está la catelicidina humana LL37.

Este trabajo tuvo como objetivo evidenciar el efecto antifúngico *in vitro* e *in vivo* de péptidos análogos derivados del LL37, en levaduras del género *Candida*. Para observar este efecto anti-*Candida* de los péptidos análogos al LL37, se estudiaron 14 aislamientos clínicos provenientes de pacientes con VVCR, así como también en 4 cepas de referencia. Se realizó

curvas de crecimiento y la técnica de microdilución en caldo, para determinar la concentración mínima inhibitoria de los péptidos, el fluconazol y los péptidos en sinergia con el fluconazol. Además se realizó microscopía electrónica de transmisión y de fluorescencia para ver la afectación estructural de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a los péptidos y por último se realizó un modelo *in vivo* de candidiasis sistémica para evaluar la eficacia de los péptidos en ratones.

Los péptidos análogos al LL37 estudiados presentaron un efecto promisorio anti-*Candida* y un destacado efecto sinérgico cuando estos péptidos fueron asociados al fluconazol; a nivel estructural los péptidos lograron la destrucción de pseudohifas de *C. albicans* ATCC 10231. Por lo cual se demostró que estos péptidos se pueden usar como alternativa terapéutica o para complementar los tratamientos actuales de VVCR.

Palabras clave: Candidiasis vulvovaginal recurrente, resistencia antifúngica, fluconazol, LL37, *Candida albicans*.

Estudiantes: Karem Juliette Guzmán Torres y Wendy Daniela Mejía Contreras

Docentes: Julián Esteban Muñoz Henao PhD, Gladys Pinilla Bermúdez

Instituciones: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad del Rosario.

Fecha: Mayo de 2022

1. INTRODUCCIÓN

La candidiasis representa una de las infecciones fúngicas más frecuentes en pacientes hospitalizados o con alteraciones en su sistema inmunológico¹. En Colombia la candidiasis es una causa frecuente de infección en personas tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidas, entre ellas, la infección del torrente sanguíneo o candidiasis invasiva especialmente a nivel intrahospitalario, donde representa aproximadamente el 80% de infecciones micóticas en UCI, con una mortalidad alrededor del 40%². Por otra parte, la candidiasis vulvovaginal es una de las infecciones más frecuentes en mujeres, donde la mayoría de estas infecciones son ocasionadas por *C. albicans*, además, en los últimos años los porcentajes de incidencia de Candidiasis vulvovaginal (CVV) y candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) en mujeres de todo el mundo han aumentado considerablemente³.

La CVV se ha convertido en un problema de salud pública debido a su prevalencia, recurrencia y difícil tratamiento, lo cual repercute de manera significativa en la calidad de vida de las mujeres^{4,5}; uno de los factores más importantes de *C. albicans* es su resistencia adquirida a diferentes antifúngicos utilizados comúnmente en el tratamiento de estas micosis, su resistencia está asociada a la expresión de diversos factores de virulencia que conllevan al fracaso terapéutico generando un aumento significativo de diferentes tipos de candidiasis clínica desde micosis superficiales hasta micosis invasoras o sistémicas lo cual genera gran impacto en el sistema de la salud y en la calidad de vida de los pacientes⁶.

Actualmente, se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas que puedan sustituir o complementar los tratamientos convencionales para lograr reducir estas cifras, basadas en el uso de los péptidos antimicrobianos (PAM). Los péptidos antimicrobianos, son moléculas producidas por una variedad de organismos como mecanismos de defensa, han recibido una atención considerable en los últimos años debido a sus características antimicrobianas contra microorganismos patógenos y también importantes funciones en el sistema inmune^{7,8}. Las catelicidinas son una familia de péptidos distribuida ampliamente en mamíferos; en humanos

sólo se ha identificado el péptido catelicidina humana LL37, el cual presenta propiedades antimicrobianas debido a su actividad citotóxica mediante la interacción con la membrana celular y la formación de poros en la membrana que produce una alteración de la permeabilidad de la membrana, causando la fuga de componentes celulares y la muerte celular ^{9,10}.

Por consiguiente, el presente estudio tiene como objetivo analizar el comportamiento de los aislamientos clínicos de candidiasis vulvovaginal y de cepas de referencia del género *Candida* frente a la exposición de cuatro péptidos análogos al LL37. Con el fin de aportar información acerca del efecto antimicrobiano de los péptidos que permita desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que puedan usarse para el tratamiento de micosis humanas, mejorando la calidad de vida de las mujeres, y asimismo, contribuir al estudio de enfermedades infecciosas hacia la comunidad científica.

2. ANTECEDENTES

La candidiasis vulvovaginal es una enfermedad muy prevalente que afecta a muchas mujeres en edad fértil, y es causada por diferentes especies del género *Candida* siendo la más común *Candida albicans*¹¹. Existen diversos estudios en los cuales se destaca la capacidad de los péptidos antimicrobianos secretados por células epiteliales para inhibir el desarrollo y crecimiento de diferentes microorganismos, estos péptidos comprenden tres grupos principales que son las B-defensinas de las cuales existen 4 tipos (HBD-1, -2, -3 y -4), las histatinas, y las catelicidinas y de la cual, solo se ha identificado una en el ser humano que es el LL-37¹².

En el año 2015, se llevó a cabo un estudio, realizado por *Scarsini et al*¹³, que consiste en la actividad antifúngica *in vitro* de la catelicidina LL-37 y BMAP-28 contra *Candida* spp, donde se determinó la actividad antimicrobiana para la cual se usaron células de *Candida* planctónicas, mediante el método de susceptibilidad en microdilución y microscopía de fluorescencia en cepas de *Candida* con formación de biopelícula. Los resultados demostraron que el péptido LL37 fue menos eficaz que BMAP-28 ya que su rango de MIC en las células planctónicas fue de 4 a >64 µM; sin embargo el LL-37 logró evitar la formación de biopelícula, al inhibir la adhesión celular a superficies de poliestireno y silicona de células de *Candida*.

Por otro lado, la prevalencia de *C. albicans* en el ámbito clínico se debe principalmente a la resistencia a los tratamientos usados convencionalmente, como lo son los azoles y los polienos usados como tratamiento de primera línea. Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia como la formación de biopelícula, el estrés oxidativo celular, disminución de la permeabilidad celular, la expresión de bombas de eflujo como Mdr1, Cdr1 y Cdr2, así como también, la modificación o mutación de la enzima diana del fluconazol (FCZ) ERG11 asociada a la síntesis de ergosterol de la célula fúngica¹⁴. En cuanto a la expresión de bombas de eflujo, en el año 2015 Wang *et al*¹⁵, determinó en el estudio, que las mutaciones en el factor de transcripción (TF) Mrr2 (regulador 2 de resistencia a múltiples fármacos) encargado de la expresión del gen transportador ABC CDR1 están asociadas a la resistencia al FCZ. Se analizaron 20 aislamientos

clínicos de *C. albicans* resistentes al FCZ y 10 aislamientos sensibles. Como resultado se observó una sobreexpresión de CDR1 en los aislamientos resistentes a FCZ, asimismo, se generaron cepas recombinantes con el gen *Mrr2* mutado, lo cual contribuyó a una expresión de CDR1 seis veces mayor que en las cepas no mutadas así como también, presentaron una resistencia ocho veces mayor a FCZ. Por lo tanto, *Mrr2* tiene una función esencial en la regulación de la expresión de *Cdr1* de las bombas de eflujo de diferentes fármacos y media la resistencia de *Candida* a FCZ.

Uno de los factores más importantes en el estudio de péptidos como posibles tratamientos, es la posibilidad de obtener péptidos sintéticos o análogos que cumplan las mismas funciones biológicas que los péptidos originales pero que a su vez, puedan ser optimizados para mejorar su actividad ¹⁶, Luo et al ¹⁷, en un estudio del año 2017, comparó la bioactividad y el efecto inhibitorio o de prevención de biopelículas del péptido LL37 y dos péptidos análogos a este, KE-18 y KR-12 frente a *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se realizó mediante el ensayo de difusión radial. También se realizó un ensayo hemolítico para determinar la citotoxicidad de los péptidos frente a eritrocitos humanos. En el estudio, se demostró mediante software de predicción *in silico* que la modificación del péptido LL37 mejoraba la relación hidrofóbica de KE-18 y KR12. En cuanto a la inhibición de biopelícula, LL37 fue eficiente para la prevención y en menor medida en la inhibición de formación de biopelícula en *C. albicans* y *E. coli* pero no en *S. aureus*. Mientras que el péptido KE-18 produce mayor efecto biocida frente a los tres microorganismos analizados. Por otra parte, ninguno de los péptidos mostró actividad citotóxica significativa, ni siquiera en la concentración más alta (175 ug/ ml).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Generalidades del género *Candida spp*

El género *Candida spp.*, abarca una gran variedad de microorganismos unicelulares perteneciente al Phylum *Ascomycota* que comprende más de 200 especies muy heterogéneas, crecen como levaduras pero la mayoría de las especies poseen la capacidad de desarrollar filamentos como hifas y pseudohifas por lo cual son consideradas polimorfas. Se reproducen sexual o asexualmente y crecen fácilmente en el laboratorio en medios de cultivo habituales y se identifican por su morfología microscópica y por sus propiedades bioquímicas ¹⁸.

Las especies de *Candida* generalmente son hongos comensales que residen en la piel humana, las superficies mucosas, el tracto gastrointestinal y el aparato respiratorio así como también, pueden establecerse en objetos inanimados como dispositivos médicos ¹⁹ y en el medio ambiente. No obstante, diversos cambios en el hospedador proporcionan condiciones óptimas para que estos hongos oportunistas causen una gran variedad de infecciones tanto superficiales como invasivas, sistémicas y muy peligrosas especialmente en pacientes inmunocomprometidos ²⁰. Aunque, actualmente las especies *Candida spp*, se aíslan con mayor frecuencia en el ámbito clínico, *C. albicans* sigue siendo la más común y la que tiene más implicaciones en enfermedades humanas ²¹.

3.2 Factores de virulencia del género *Candida spp*.

La patogenicidad de estos microorganismos está relacionada con sus diversas propiedades de virulencia que facilitan la adherencia y colonización de tejidos y contribuyen en la evasión de las defensas del huésped²¹. Los principales factores de virulencia que presentan las especies *Candida spp*, son: la expresión de bombas de eflujo, los cambios fenotípicos, en la lisis de macrófagos en la invasión de células epiteliales, así como también, la secreción de enzimas hidrolíticas como proteasas y fosfolipasas; además como se muestra en la figura 1 las especies de *Candida* tienen

la capacidad de hacer una transición morfológica que se ha visto implicada en la formación de biopelículas en diferentes tejidos y dispositivos médicos ²².

La formación de biopelículas representa uno de los factores más importantes en la patología de *C. albicans*, este proceso comienza con la adhesión celular a un sustrato biótico o abiótico, posteriormente, se da el crecimiento y la proliferación celular, después se produce el desarrollo de formas filamentosas (hifas o pseudohifas) y simultáneamente se forma la matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos, hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, fosfatos y ácido úrico producidos por las células que forman la biopelícula, dando como resultado una densa red de células levaduriformes y filamentosas que se van desprendiendo de la biopelícula para así colonizar nuevos lugares ^{23,24}.

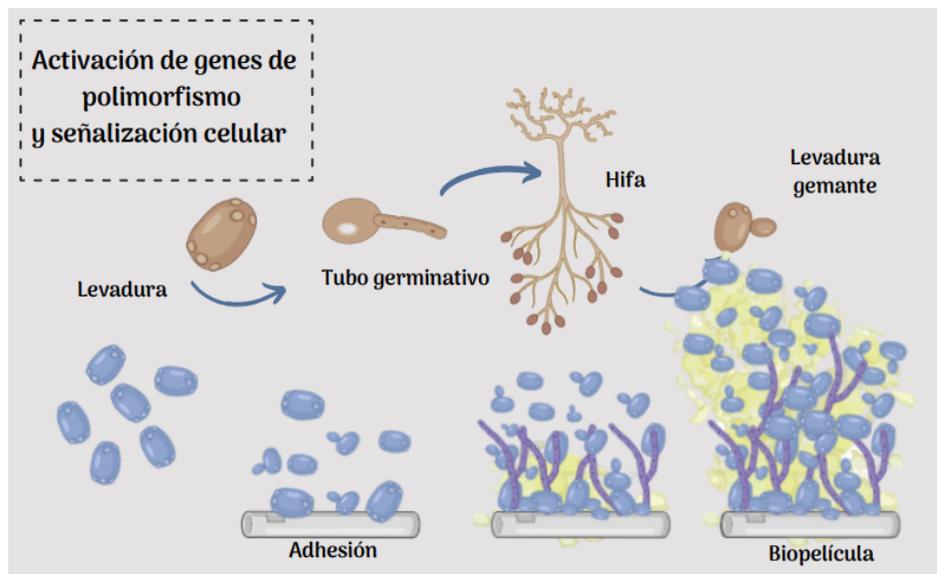


Figura 1. Mecanismo de formación de Biopelícula y activación de polimorfismo de la levadura *Candida albicans*.

Estas biopelículas causan problemas clínicos importantes puesto que confieren resistencia contra la terapia antifúngica usada para tratar las micosis humanas, esto principalmente debido a que la matriz protege las células de las condiciones adversas, limitando la penetración de los fármacos y evadiendo el sistema inmune del huésped ²⁵.

3.3 Candidiasis vulvovaginal

La candidiasis vulvovaginal es una enfermedad inflamatoria aguda del tracto reproductor femenino causada por especies de *Candida*, principalmente por el hongo oportunista *C. albicans* que habitualmente hace parte de la microbiota humana normal de la vagina. La CVV es la infección por *Candida* más prevalente y después de la vaginosis bacteriana es considerada la segunda infección vaginal más común, infecta alrededor del 80% de las mujeres en edad reproductiva por lo menos una vez en la vida ²⁶.

Respecto a la presentación recurrente de esta micosis conocida como CVVR, se define como la presencia de 3 o más episodios sintomáticos en un periodo de un año, afecta aproximadamente el 9% de las mujeres a nivel mundial y en comparación con la candidiasis invasiva y oral, la CVVR es un enfermedad que afecta a mujeres inmunocompetentes, es decir, con su sistema inmunológico en condiciones adecuadas²⁷. Por otra parte, los factores predisponentes son variados: factores genéticos, hormonales, desequilibrio de la microbiota normal, uso de antibióticos, alteración del pH, el embarazo y enfermedades como la diabetes mellitus y causas idiopáticas ²⁸. Esta micosis impacta negativamente la calidad de vida de las mujeres puesto que afecta su desempeño social, laboral y personal ²⁹.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, la CVV y la CVVR se caracteriza por prurito vulvar, ardor, disuria y secreción vaginal blanca o grisácea y grumosa que está compuesta por el tejido desprendido, células del sistema inmune, levaduras y fluido vaginal. Los síntomas a menudo se informan como leves, sin embargo, los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos de las especies de *Candida*, dificultan el tratamiento por lo cual, se requiere el uso prolongado de antimicóticos o el uso de otras alternativas terapéuticas como los supositorios vaginales ^{30,31}.

3.4 Epidemiología de la candidiasis vulvovaginal

La CVV es muy común en mujeres adultas, especialmente entre los 20 y 40 años, y se estima que a una edad de 25 años al menos el 50 % de las mujeres ya ha tenido algún episodio sintomático de CVV, en cuanto a las mujeres premenopáusicas, el 75% habra presentado al menos un episodio de CVV, así mismo, se calcula que el 5 -8 % de las mujeres adultas presentará CVVR^{32,23}. Sin embargo, los datos epidemiológicos son inexactos debido a que la mayoría son obtenidos a partir de informes y diagnósticos médicos generales, ya que en Colombia no es una enfermedad de notificación obligatoria en el país motivo por el cual, no se realiza vigilancia y control de forma periódica, adicionalmente, se presentan limitaciones y errores en el diagnóstico ya que usualmente puede confundirse clínicamente con la vaginosis bacteriana. Aunque *C.albicans*, es el agente etiológico más prevalente con cerca del 90% de los casos de CVV, actualmente se ha evidenciado un aumento significativo de las distintas especies no *albicans* (NAC). Entre ellas *C.glabrata* es considerada la segunda causa principal de CVV^{33,24}.

3.5 Tratamiento de la candidiasis vulvovaginal

La candidiasis vulvovaginal puede clasificarse como no complicada, que se manifiesta en el 90% de los casos, o complicada, que está presente en el 10% de los casos. Actualmente esta enfermedad es tratada con antifúngicos tópicos y orales especialmente medicamentos de la familia de los azoles. En el caso de candidiasis no complicada el tratamiento puede ser con antimicóticos tópicos una dosis oral única de 150 mg de fluconazol o una dosis de corta duración por 3 días, y ambos logran una respuesta > 90%. Para la candidiasis vulvovaginal complicada se puede administrar por vía intravaginal agentes tópicos durante 5-7 días o por vía oral con 150 mg de fluconazol cada 72 horas en 3 dosis^{34,35,36,37}.

Para la CVVR se recomienda iniciar el tratamiento de inducción con un agente tópico o fluconazol oral durante 10 a 14 días, seguido de 150 mg de FCZ una vez a la semana durante al menos 6 meses; esta dosificación logra el control de los síntomas en el 90% de los pacientes. Si el tratamiento con fluconazol no es viable, se puede utilizar crema tópica de clotrimazol 200 mg

dos veces por semana, un supositorio vaginal de clotrimazol 500 mg una vez a la semana u otro tratamiento antifúngico oral o tópico intermitente como los nuevos derivados triazólicos como el albaconazol, que tiene espectro de acción sobre levaduras y puede administrarse por vía oral.

^{34,35,36, 37.}

3.6 Resistencia a los antifúngicos

En los últimos años se ha observado que infecciones causadas por *C. albicans*, han tenido aumento significativo, esto directamente relacionado al aumento de pacientes con cáncer, pacientes trasplantados, aquellos internados en unidades de cuidados intensivos (UCI) y en todos aquellos que presenten alteraciones del sistema inmunológico incluyendo los pacientes con VIH/sida.; Es importante resaltar el aumento en la aparición de resistencia a diferentes antifúngicos de cepas de *C. albicans* como no *albicans* prevalentes en Colombia, lo que ha dificultado el éxito terapéutico. En el caso de las mujeres con CVV la resistencia está relacionada debido a que muchas mujeres que son tratadas por candidiasis vulvovaginal suspenden el tratamiento prescrito por el médico en el momento en que hay desaparición de los síntomas o se automedican al momento de padecer una infección vaginal. El aumento en la resistencia a los antifúngicos por parte de *C. albicans*, sin duda la convierte la candidiasis vulvovaginal en un problema de salud pública que se encuentra en constante aumento afectando considerablemente la calidad de vida de las mujeres ^{32,38}.

3.7 Péptidos antimicrobianos

Son moléculas que en su mayoría son catiónicas con regiones hidrofóbicas, característica que les confieren acción antimicrobiana; estos péptidos participan en la defensa frente a la invasión patógena por parte de agentes extraños. Además son moléculas efectoras producidas como mecanismo de defensa del sistema inmune. Los PAM han obtenido gran atención en las últimas dos décadas debido a su promisorio mecanismo de acción en la defensa contra microorganismos intrusos y además tienen importantes funciones inmunomoduladoras a través de una gran red de

interacciones entre la inmunidad innata y adquirida, estos péptidos son producidos por gran variedad de organismos vivos: plantas, animales y humanos ³⁹.

Sus características comunes se basan primero, en que tienen carga positiva debido a su gran variedad de aminoácidos básicos y segundo, la mayoría de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos. Aunque ya se han determinado las diferentes funciones de los PAM como su respuesta al daño tisular y su actividad inmunoreguladora donde estos atraen células inflamatorias como los neutrófilos, los linfocitos B y los macrófagos, además de la activación de células epiteliales que liberan citoquinas pro-inflamatorias como IL-8, IFN- γ y IL-6. Su función microbicida tiene gran relevancia debido a su mecanismo de acción frente a diferentes microorganismos. En los humanos existen tres grandes familias de estos péptidos que son las catelicidinas, las defensinas y las histatinas ⁴⁰.

3.7.1 Defensinas

Se caracterizan por ser péptidos catiónicos que son ricos en argininas y contienen 6 residuos de cisteína que están unidos por puentes disulfuro los cuales son característicos de éstas. Las defensinas constituyen el tipo de PAM más amplio y estudiado; se divide en dos familias de acuerdo a la ubicación de sus puentes disulfuro en alfa defensinas y Beta defensinas, su papel principal se basa en la lisis directa de microorganismos debido a la interacción entre el péptido catiónico y la membrana aniónica de un microorganismo mediante la atracción electrostática, seguido de un proceso de permeabilización de la membrana donde se da la formación de poros en la membrana debido a la incorporación de los péptidos y al final la lisis celular por choque osmótico. ³⁹.

3.7.2 Histatinas

Son una familia de péptidos que se encuentra comúnmente en la saliva humana y se caracterizan por ser péptidos catiónicos ricos en histatinas. Este péptido presenta actividad antimicrobiana

principalmente en hongos, por medio de la inactivación de organelos como la mitocondria y la alteración de la permeabilidad celular ⁴¹.

3.7.3 Catelicidinas

Las catelicidinas son péptidos antimicrobianos que pertenecen a la familia anfipática catiónica, se caracterizan por presentar un dominio catelina conservado y un dominio catiónico C-terminal variable que le permite interactuar con las membranas microbianas mediante interacciones iónicas y anfipáticas. Estos péptidos tienen actividad contra diversos microorganismos y además actúa en cicatrización de heridas, regulación del cáncer y algunas funciones proinflamatorias ^{42,43}.

3.7.3.1 Péptido LL-37

En humanos sólo se encuentra una catelicidina que es el LL-37, que es producida por varias células epiteliales, leucocitos, queratinocitos, melanocitos, neutrófilos, células de médula ósea, mastocitos, glándulas salivales, entre otras. El LL-37 es perteneciente a la clase de PAM helicoidales alfa, debe su nombre a su longitud total de 37 aminoácidos con dos residuos principales de leucina, LL-37 se encuentra en diferentes concentraciones en diferentes tipos de células, tejidos y fluidos corporales. Sus funciones principales son la señalización molecular, sus propiedades de unión a lipopolisacáridos, su participación en la angiogénesis y la cicatrización de heridas y su uso como antibiótico ^{44, 45}

El LL-37 en condiciones fisiológicas actúa mediante la creación de poros toroidales (Figura 2) causando la salida de las moléculas de la célula, y por ende la muerte celular. Esto se debe a que el LL-37 es una molécula catiónica con estructura hélice alfa que es de carácter anfipático, en donde el extremo que es hidrofóbico está cubierto de aminoácidos especialmente fenilalanina, lo cual le confiere al péptido una carga positiva que le permite interactuar con lipopolisacáridos de la membrana celular u otros componentes que están cargados negativamente ^{46, 47}.

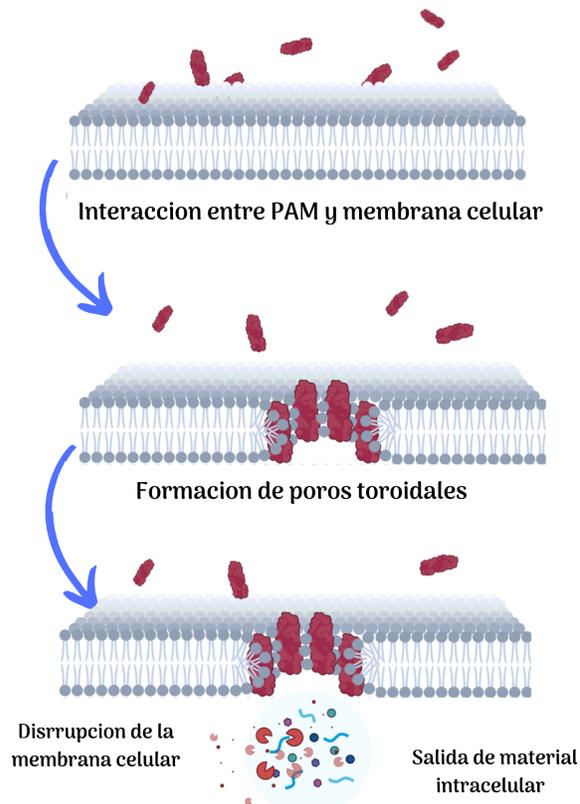


Figura 2. Mecanismo de acción del LL-37.

Una vez el LL-37 interactúa con la membrana celular del microorganismo, se empieza a desestabilizar la bicapa de fosfolípidos generando una curvatura, debido a que los fosfolípidos se flexionan internamente llevando a cabo la formación del poro toroidal que conduce a la salida de material intracelular y a la muerte celular ^{48,49}.

3.8 Diseño de péptidos antimicrobianos

Los PAM pueden interactuar con las membranas de los microorganismos para inducir la muerte celular, mediante la carga, estructura de los componentes de la membrana externa como lipopolisacáridos, composición de los lípidos y presencia de un potencial electroquímico en la membrana citoplasmática. Sin embargo estos factores también son el desencadenante del surgimiento de la resistencia a los PAM, adicionando el hecho de que el estrés y los factores

ambientales pueden influir en los microorganismos para generar resistencia; no en una magnitud como se ve hoy en día frente a la resistencia a los antibióticos, pero si es una problemática a la cual se le puede dar una solución.⁵⁰.

La estructura del LL37 puede servir como molde para el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos esto con el fin de potenciar la actividad antimicrobiana, hacer los péptidos más resistentes a la degradación por proteasas, y evadir la resistencia a los PAM que hasta el momento únicamente ha sido reportada en bacterias. El grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se ha encargado del diseño de péptidos antimicrobianos tomando como plantilla el LL-37, el cual sufrió cambios descritos en la figura 3 tales como acortamiento en la secuencia y la adición de aminoácidos cargados y aminoácidos D. Lo cual evita la degradación por proteasas, resolviendo así un problema muy común en péptidos como el LL-37 que al ser de cadena larga son susceptibles a la degradación por proteasas. Además con estas modificaciones se potencia la actividad anti biopelícula lo cual es de gran utilidad en contra de microorganismos formadores de biopelícula como lo son las especies del género *Candida*.^{46,51}

Modificaciones al péptido LL-37	
LL37	LLGDF <u>FRKSKERIGKEFR</u> RIVQRIKDFLRNLVPRTES
LL37-1	<u>G</u> RKSAKKIGKRAKRIVQRIKDFLR
ACLL37-1	-RRSKERIGKEFRIVQRIKDFLR Acetilación N-terminal
ACLL37-2	G R K S A K K I G K R A K R I V Q R I K D F L R Acetilación (N-terminal)
DLL37-1	(d-PHE) G R K S A K K I G K R A K R I V Q R I K D (d-F)LR Acetilación (N-terminal)

Figura 3. Modificaciones realizadas al LL37.

4. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Diseño metodológico

Tabla 1 Diseño metodológico

Tipo de investigación	Cuantitativa
Alcance	Semi-experimental
Universo	Mujeres en edad fértil
Población Objeto de estudio	Mujeres con diagnóstico de candidiasis vulvovaginal que asistieron al servicio de consulta externa de la clínica en estudio.
Muestra	Aislamientos clínicos de <i>C. albicans</i> provenientes de mujeres con diagnóstico confirmado de CVVR y las cepas de referencia <i>C. albicans</i> ATCC 10231, <i>C. tropicalis</i> ATCC 750, <i>C. krusei</i> ATCC 6258 y <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.

4.2 Materiales y métodos

Este proyecto es un análisis semiexperimental que determina la actividad *in vitro* e *in vivo* de los péptidos análogos derivados de LL-37 frente a 14 aislamientos clínicos y 4 cepas de referencia de *Candida*. Para determinar dicha actividad se hicieron estudios de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los péptidos a diferentes concentraciones, junto con el FCZ con el propósito de observar el efecto sinérgico y la eficiencia de estos en la inhibición total (efecto fungicida), o parcial (efecto Fungistático) frente a esta levadura; además se realizaron estudios de sobrevida con curvas de letalidad, microscopía de fluorescencia, microscopía de transmisión y se determinó la actividad *in vivo* de los péptidos frente a *Candida albicans* ATCC 10231 empleando un modelo murino en el que se realizaron conteos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y estudios de histopatología de los órganos de los ratones.

Como cepas de referencia fueron utilizadas *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Los aislamientos clínicos fueron obtenidos del Laboratorio del Grupo de Estudios en Microbiología Traslacional y Enfermedades Emergentes (MICROS) de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario y se mantuvieron criopreservados a -80°C , 24 horas antes de realizar los experimentos estos fueron cultivados en medio agar Sabouraud dextrosa a 35°C . Los estudios *in vitro* fueron realizados en el laboratorio de microbiología molecular de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (grupo de investigación REMA), exceptuando la microscopía electrónica de transmisión realizada en la Fundación Santa Fe de Bogotá y la microscopía de fluorescencia realizada en la Universidad del Rosario. Por último los estudios *in vivo* se hicieron en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y los estudios de histopatología se llevaron a cabo por la empresa Patología Bogotá S.A.S.

4.2.1 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se establecieron mediante inoculación de cultivos procedentes de 4 de los 14 aislamientos clínicos en medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, USA) a escala 0.5 McFarland obtenida mediante una densidad óptica de 0.08 a 0.1 que determina 1×10^8 UFC/mL mediante la lectura en el espectrofotómetro Genesys a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, para determinar la actividad antifúngica de los 4 péptidos análogos de LL37 (L, D, AC1, AC2), se usaron 3 concentraciones distintas de cada péptido (2,5 μM , 5 μM , 10 μM), frente a 4 aislamientos clínicos. Se procedió a inocular en las placas por cada pozo 270 μl de cada péptido diluido en medio RPMI 1640 más la adición de 30 μl del inóculo de la levadura, como control de esterilidad se utilizó medio RPMI 1640 sin péptido y sin inóculo de *Candida*. Con el fin de determinar la reproducibilidad en cada ensayo, cada uno fue montado por triplicado. Para la obtención de las curvas de crecimiento se usó el equipo BioScreen C a una

temperatura de 36°C y una agitación constante durante 48 horas, con intervalos de medición de las densidades ópticas cada hora a una longitud de onda de 600 nm.

4.2.2 Microdilución en caldo (MIC)

Se realizó los inóculos de los cultivos procedentes de los 14 aislamientos clínicos y de las 4 cepas de referencia en agua destilada esteril a escala 0.5 McFarland obtenida mediante la lectura de densidad óptica en el densitómetro (DensiCHEK Plus) que proporcionó el valor de la densidad óptica en unidades de McFarland (0.5).

Para determinar la MIC de los 4 péptidos análogos de LL37 y la sinergia con FCZ. Se preparó los péptidos mediante diluciones seriadas a concentraciones de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.125 μ M, 1.56 μ M, 0.78 μ M y el FCZ (Pfizer, NY, USA) se preparó también por medio de diluciones seriadas a concentraciones de 64 μ g/ml, 32 μ g/ml, 16 μ g/ml, 8 μ g/ml, 4 μ g/ml, 2 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.25 μ g/ml y 0.125 μ g/ml.

En una placa de microtitulación por triplicado, se colocó en cada pozo las diluciones seriadas del péptido y se agregó el inóculo de la cepa a estudiar. También por triplicado, se hizo el ensayo de sinergia agregando en cada pozo las diluciones del péptido, las diluciones del FCZ y inóculo de *Candida* a estudiar. Por último en la misma placa de microtitulación en cada pozo por duplicado, se colocó las diluciones del FCZ y el inóculo de *Candida* teniendo así en cada pozo una suspensión de *Candida* más una concentración específica de FCZ para determinar la MIC de FCZ frente a *Candida*.

Una vez se hizo el montaje experimental se dejó las placas de microdilución a 37 °C durante 24 horas, y finalmente se determinó la concentración inhibitoria mínima de los péptidos a diferentes concentraciones y la eficiencia de estos en la inhibición total (efecto fungicida), parcial (efecto Fungistático) frente a esta levadura, y el efecto de sinergia junto con el FCZ.

4.2.3 Microscopía de Fluorescencia

Se emplearon levaduras *C. albicans* ATCC 10231 que fueron sometidas a concentraciones de (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) de los 4 péptidos análogos de LL37 (L, D, AC1, AC2), durante 24 horas a 37 °C en medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, USA) tamponado con MOPs (Sigma, Aldrich, USA) 0,16 M. Después de esto, las células que se trataron se lavaron con los péptidos y las no tratadas con PBS pH 7,2, se fijó las células con paraformaldehído (Sigma, Aldrich, USA) al 4% en PBS por 30 min, adherido a cubreobjetos de vidrio previamente cubierto con poli-l-lisina y teñido con Calcofluor-White (Sigma, Aldrich, USA) 1 mg/mL por 5 min. Los cubreobjetos se lavaron y se montaron en una solución de galato de n- propilo (Sigma, Aldrich, USA) (1%) y se observaron al microscopio de fluorescencia.

4.2.4 Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizó *C. albicans* ATCC 10231 tratada 24 h con los péptidos análogos (L, D, AC1, AC2) las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 2 h a temperatura ambiente. Post-fijación se llevaron a cabo en 1% de tetróxido de osmio en cacodilato tampón que contiene 1,25% de ferrocianuro de potasio y 5 mM CaCl₂ durante 2 h. Posteriormente, las células se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, propileno al 100% y se embebieron en resina de Spurr. Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 Plus con cámara Gatan.

4.2.5 Modelo *in vivo* de candidiasis

Ratones hembras BALB/c (6 animales por grupo) fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D.C. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad Nacional de Colombia y fueron realizados siguiendo las recomendaciones

internacionales. Se indujo candidiasis diseminada en animales con óptimas condiciones inmunes mediante inoculación intravenosa de levaduras de *C. albicans* ATCC 10231. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente, con los péptidos análogos al LL-37 y con fluconazol (Pfizer, NY, USA) utilizado como antifúngico control, un grupo de animales control recibió PBS, el tratamiento fue realizado cada 24 horas durante 7 días, comenzando el día 1.

4.2.6 Análisis de Carga Fúngica

Los animales fueron eutanasiados después de 8 días de infección, los riñones, bazo e hígado se homogeneizaron individualmente mediante maceración en 1 ml de PBS y 100 μ l de esta suspensión y fueron sembrados e incubados en placas con agar *Brain Heart Infusion* (BHI) (Becton Dickinson & Company, USA). Las colonias fueron cuantificadas visualmente después de 24 h de incubación a 37 ° C.

4.2.7 Análisis Histopatológico

Uno de los riñones se incluyó en un tubo con formalina al 10% para posteriormente realizar la inclusión del órgano en bloques de parafina. De este órgano incluido en parafina se realizó cortes de 5 micras en un micrótopo (Thermo Scientific – Microm HM325, Germany) y las láminas se procesaron en el laboratorio Patología Bogota SAS en donde se hizo la coloración de hematoxilina-eosina (H&E) y Gomori-Grocott.

4.2.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos son realizados por triplicado y los análisis de significancia estadísticos son realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La comparación estadística se realizó mediante análisis de varianza (one-way ANOVA), seguidas de un post-test de Tukey-Kramer, los valores de $p < 0.05$ indican significancia estadística.

5. RESULTADOS

5.1 Curvas de crecimiento

El análisis del efecto antifúngico *in vitro* (Figura 4) demostró que los cuatro péptidos antimicrobianos derivados de LL37 especialmente el LL37-1 y LL37-D presentan una inhibición en el crecimiento de los 4 aislamientos clínicos, en comparación con el control sin ningún tratamiento.

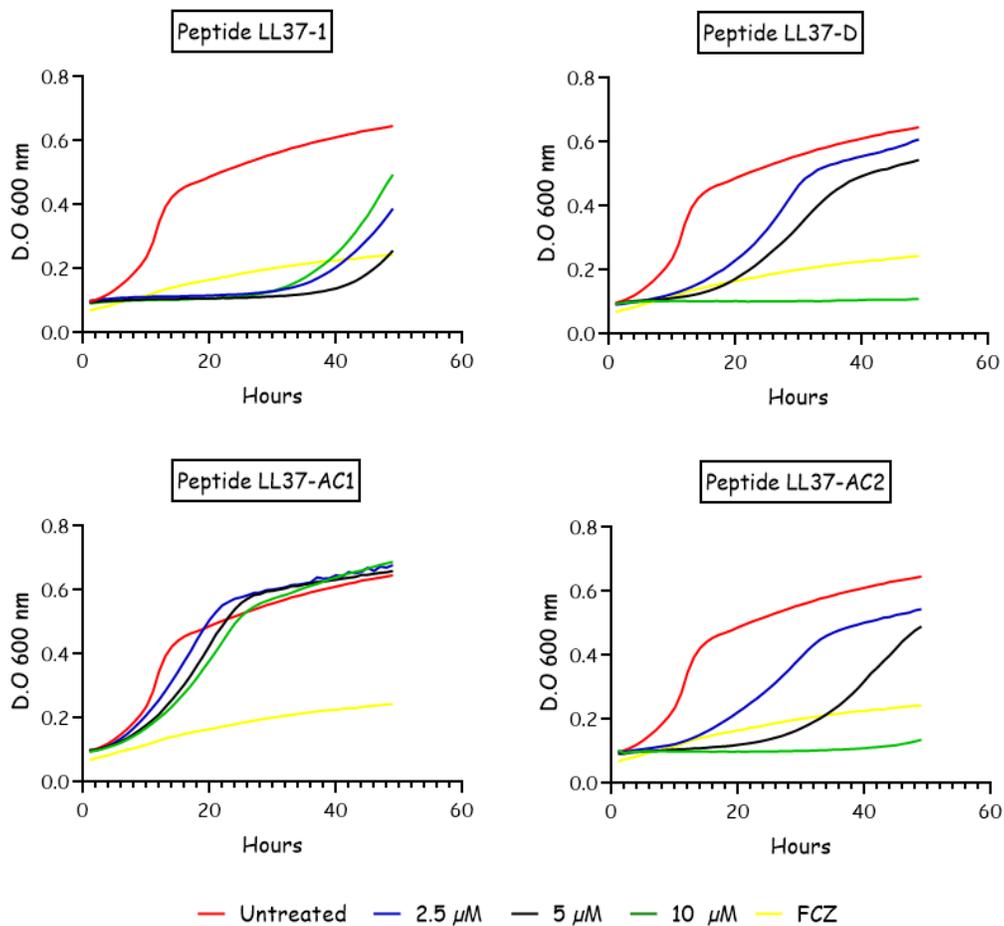


Figura 4. Curvas de crecimiento de *C. albicans* 1738 utilizando diferentes concentraciones de los péptidos análogos de LL37. Los cuatro péptidos utilizados AC-1, AC-2, D y LL37-1 fueron utilizados en concentraciones (10, 5 y 2.5 μM), como control fueron utilizadas células de *C. albicans* con exposición a fluconazol 64 ug/mL y sin exposición a péptidos antimicrobianos, los datos representan una significancia estadística de **** $p < 0.0001$.

5.2 Concentración mínima inhibitoria

Todos los aislamientos de *Candida* de este estudio fueron sometidos a diferentes concentraciones de los péptidos análogos al LL37, a diferentes concentraciones de FZC y por último se sometieron a diferentes concentraciones de los péptidos en sinergia con diferentes concentraciones de FZC.

La Tabla 2 muestra los valores MIC para cada aislamiento frente a las diferentes concentraciones de los péptidos análogos al LL37 y frente a diferentes concentraciones de FZC, y la tabla 3 muestra los valores de MIC de los péptidos empleados en sinergia junto con el FZC para cada aislamiento. Los péptidos análogos al LL37 mostraron resultados con efectos fungicidas y fungistáticas; la mayoría de los aislamientos mostraron valores bajos de MIC para el péptido LL37-D de entre 1.52 a 25 μM , por otro lado el LL37-1 evidencio valores de MIC de entre 6.25 a 50 μM ; sin embargo, los péptidos LL37-AC1 y LL37-AC2 mostraron en la mayoría de los aislamientos valores de MIC elevados de 50 a 100 μM . Todos los aislamientos mostraron valores de MIC superiores a 64 $\mu\text{g/mL}$ para el FCZ lo cual sugiere el aumento en la resistencia antifúngica frente este medicamento, haciendo necesario la reformulación de un tratamiento para las infecciones causadas por *Candida*.

Tabla. 2 Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, expresada en μM) de los péptidos LL37-1, LL37-D, LL37-AC1, LL37AC2 y FCZ determinado en aislamientos de *Candida* spp.

Cepas	Rango de fármacos antifúngicos				
	LL37-1 (μM)	LL37-D (μM)	LL37-AC1 (μM)	LL37-AC2 (μM)	FCZ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. albicans</i> 2272	50	50	100	50	>64
<i>C. albicans</i> 3773	50	25-50	100	50	> 64
<i>C. albicans</i> 5530	50	25-12.5	100	50	> 64

Tabla. 2 Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, expresada en μM) de los péptidos LL37-1, LL37-D, LL37-AC1, LL37AC2 y FCZ determinado en aislamientos de *Candida* spp.

Cepas	Rango de fármacos antifúngicos				
	LL37-1 (μM)	LL37-D (μM)	LL37-AC1 (μM)	LL37-AC2 (μM)	FCZ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. albicans</i> 194	50	50	100	50	>64
<i>C. albicans</i> 1738	12.5-25	25-50	100	25-50	>64
<i>C. albicans</i> 206069	50	12.5-25	50	>100	> 64
<i>C. albicans</i> 2230561	50	12.5-25	50	25-50	> 64
<i>C. albicans</i> 6110	12.5-25	6.25-12.5	25-50	12.5-25	> 64
<i>C. albicans</i> 181608	>100	100	>100	50	> 64
<i>C. albicans</i> 2532	>100	100	>100	100	> 64
<i>C. albicans</i> 226061	100	6.25-100	50	100	> 64
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	50	25-50	>100	25-50	> 64
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	12.5-25	1.56-3.12	50	>100	> 64
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	>100	NR	25-50	50	> 64
<i>C. krusei</i> ATCC	6.25-12.5	12.5-25	12.5-25	12.5-25	>64

Los valores de MIC para los péptidos análogos al LL37 y al FCZ en sinergia resultaron ser muy bajos llegando hasta rangos de 0.78-1.56 μM y 0.5-1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente en la mayoría de los aislamientos clínicos, demostrando que no es necesario reemplazar el tratamiento actual con

fluconazol y por el contrario este se puede potenciar implementandolo junto con los péptidos análogos al LL37.

Tabla. 3 Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, expresado en $\mu\text{M} + \mu\text{g/mL}$) de los péptidos LL37-1, LL37-D, LL37-AC1, LL37 AC2 en combinación con el FCZ determinado en aislamientos de *Candida* spp.

Cepas	Fármacos antifúngicos en sinergia ($\mu\text{M} + \mu\text{g/mL}$)			
	LL37-1 FCZ	LL37-D FCZ	LL37-AC1 FCZ	LL37-AC2 FCZ
<i>C. albicans</i> 2272	100 64	3.12-6.25 2-4	3.12-6.25 2-4	1.56-3.12 1-2
<i>C. albicans</i> 3773	3.12-6.25 2-4	1.56-3.12 1-2	>100 >64	>100 >64
<i>C. albicans</i> 5530	3.12-6.25 2-4	6.25-12.5 4-8	50 32	0.78-1.56 0.5-1
<i>C. albicans</i> 194	>100 >64	0.78-1.56 0.5-1	>100 >64	3.12-6.25 2-4
<i>C. albicans</i> 1738	0.78-1.56 0.5-1	1.56-3.12 1-2	12.5-25 8-16	6.25-12.5 4-8
<i>C. albicans</i> 206069	>100 >64	1.56-3.12 1-2	>100 >64	3.12-6.25 2-4
<i>C. albicans</i> 2230561	1.56-3.12 1-2	1.56-3.12 1-2	25-50 16-32	1.56-3.12 1-2
<i>C. albicans</i> 6110	0.78-1.56 0.5-1	1.56-3.12 1-2	6.25-12.5 4-8	0.78-1.56 0.5-1
<i>C. albicans</i> 181608	50 32	>100 >64	50 32	50 32
<i>C. albicans</i> 2532	>100 >64	3.12-6.25 2-4	25-50 16-32	>100 >64
<i>C. albicans</i> 226061	0.78-1.56 0.5-1	<0.39 <0.25	6.25-12.5 4-8	0.78-1.56 0.5-1
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.78-1.56 0.5-1	0.78-1.56 0.5-1	1.56-3.12 1-2	0.39-0.78 0.25-0.5

<i>C. parapsilosis</i> ATCC	0.39-0.78 0.25-0.5	0.39-0.78 0.25-0.5	0.39-0.78 0.25-0.75	0.39-0.78 0.25-0.75
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1.56-3.12 1-2	NR	>100 >64	1.56-3.12 1-2
<i>C. krusei</i> ATCC 6558	>100 >64	>100 >64	>100 >64	3.12-6.25 2-4

5.3 Microscopía de fluorescencia

La capacidad de los péptidos para inhibir la formación de hifas y pseudohifas en *C. albicans* se evaluó mediante microscopía de fluorescencia. Como se evidencia en la figura 5 las células tratadas con el péptido LL37-D a una concentración de 12.5 μ M (B) presentaron una reducción significativa en el desarrollo de las pseudohifas micóticas en comparación con las células no tratadas (A). Como indica la intensidad de la tinción de Calcofluor White presente en los extremos apicales de las hifas de las células control en comparación con la baja intensidad de fluorescencia observada en las levaduras en presencia del péptido.

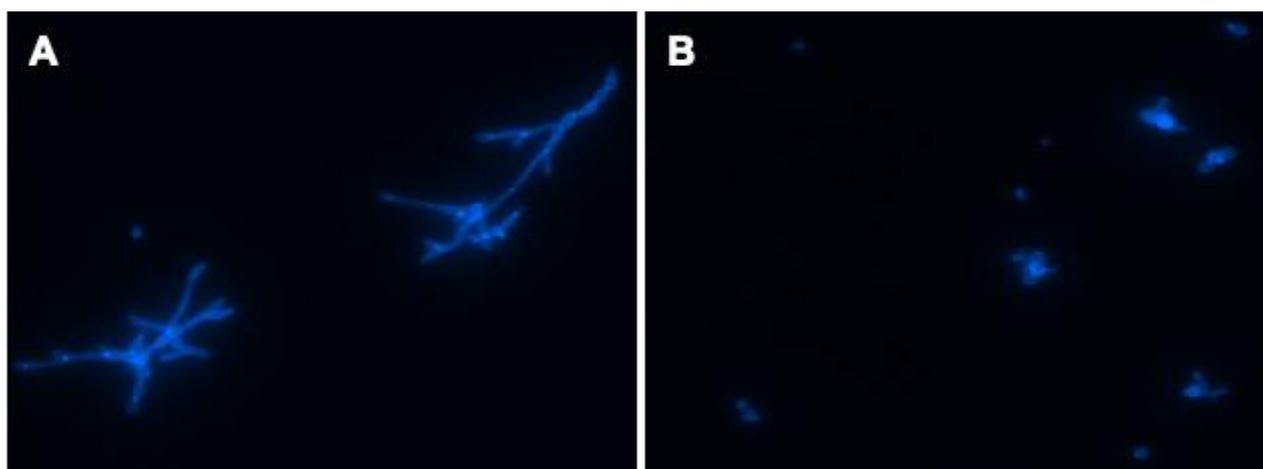


Figura 5. Producción de hifas en la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 frente al péptido LL37-D. A.

Control de crecimiento *Candida albicans* ATCC 10231 sin tratamiento con el péptido. **B.** MIC del péptido LL37-D, se observa la inhibición de Crecimiento de Pseudohifas.

5.4 Microscopía de transmisión

Para evaluar el efecto de los péptidos en la morfología de *C. albicans*, se analizó la estructura de las levaduras por microscopía electrónica de transmisión TEM, como se observa en la figura 6 las células control no tratadas con péptido, presentan células con una morfología regular, con pared y membrana intacta, orgánulos normales y citoplasma homogéneo, con alta concentración de electrones, (figura 2A) en contraste con las células tratadas con los péptido LL37-D con 12.5 uM y 100 uM por 24 horas a 37°, mostraron diversas alteraciones morfológicas en la membrana, como forma irregular, bordes difusos y disrupción de la pared celular. De igual manera en la concentración de 100 uM el péptido indujo la producción de numerosas vacuolas citoplasmáticas, alteración de los organelos intracelulares y pérdida de la integridad estructural de la membrana y pared celular.

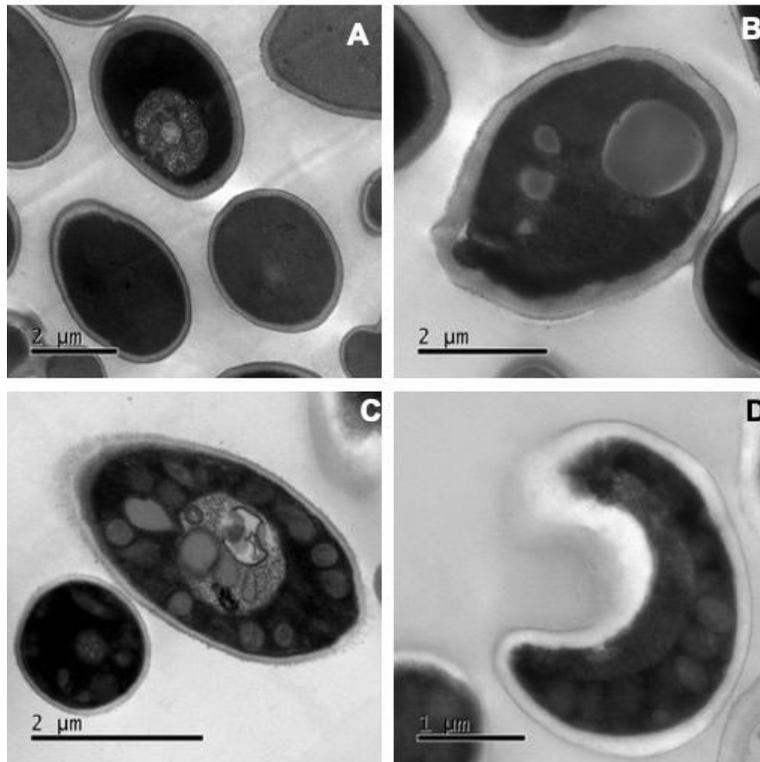


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 frente al péptido LL37-D. Se evidenciaron múltiples alteraciones morfológicas en las células de *Candida albicans* ATCC 10231 tratadas con 12.5 uM (B, C, D) de LL37-D en comparación con las células no tratadas (A).

5.5 Modelo *in vivo*

5.5.1 Análisis de carga fúngica

Para evaluar la actividad antifúngica *in vivo* se realizó un modelo murino con ratones hembras BALB/C inmunocomprometidas con anterioridad. Los ratones fueron inoculados vía intravenosa con 10^3 células de *Candida albicans* ATCC 10231 y fueron tratados con 0,7 mg de los péptidos vía intraperitoneal durante 7 días. A los 8 días de tratamiento, se realizó el conteo de UFC por gramo de tejido en bazo, hígado y riñón con y sin tratamiento con los péptidos (Figura 7). En general, se observó una disminución significativa ($P < 0.0001$) de la carga fúngica de los tejidos cuando los ratones fueron tratados con derivados del LL37 en comparación con el control. El órgano que presentó mayor carga fúngica fue el bazo (≈ 14.178 UFC/g), seguido del riñón (≈ 1.523 UFC/g) y el hígado (≈ 257 UFC/g), no obstante, los péptidos lograron reducir la carga microbiana eficientemente y el péptido LL37-D logró inhibir el desarrollo microbiano en todos los tejidos analizados.

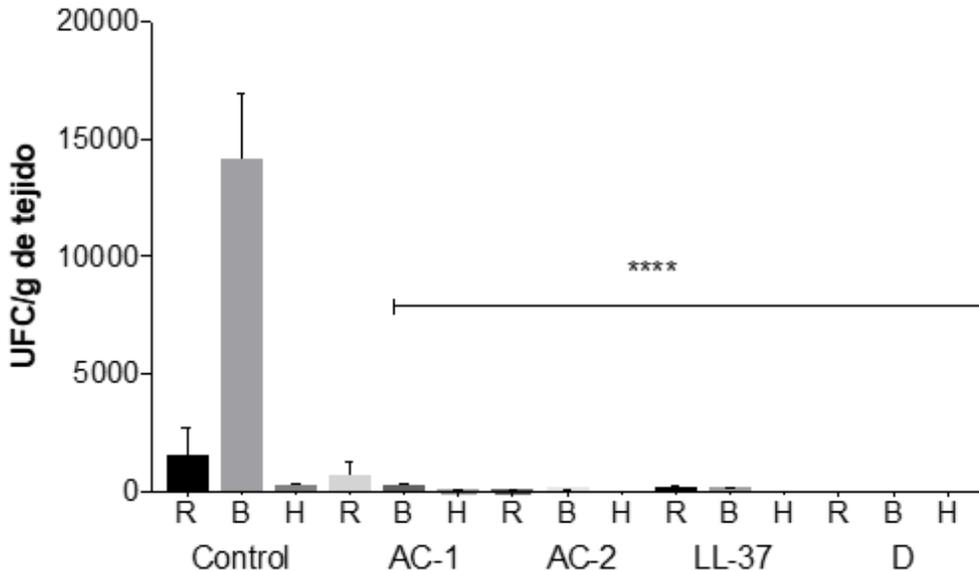


Figura 7. Unidades formadoras de colonias (UFCs) de riñones (R), bazos (B) e hígados (H) de ratones BALB/c infectados por vía intravenosa con 10^3 levaduras de *Candida albicans* ATCC 10231 **** $P < 0.0001$.

5.5.2 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico de muestras de riñón recolectados de ratones que no fueron infectados con candidiasis sistémica evidenciaron una morfología normal (Figura 8A), por otra parte las muestras de riñón del grupo control positivo de ratones infectados con *Candida albicans* pero que no fueron tratados con ningún antimicrobiano evidenciaron levaduras y la formación de pseudohifas/hifas (Figura 8B). Se observó una clara reducción de la carga fúngica en el grupo de animales tratados con FCZ (Figura 8C), sin embargo la morfología celular se encontraba afectada en comparación con el control negativo. También se observó una reducción importante en la carga fúngica en el grupo de animales tratados con los péptidos análogos al LL37 (figura 8D)en comparación con el grupo de animales no tratados.

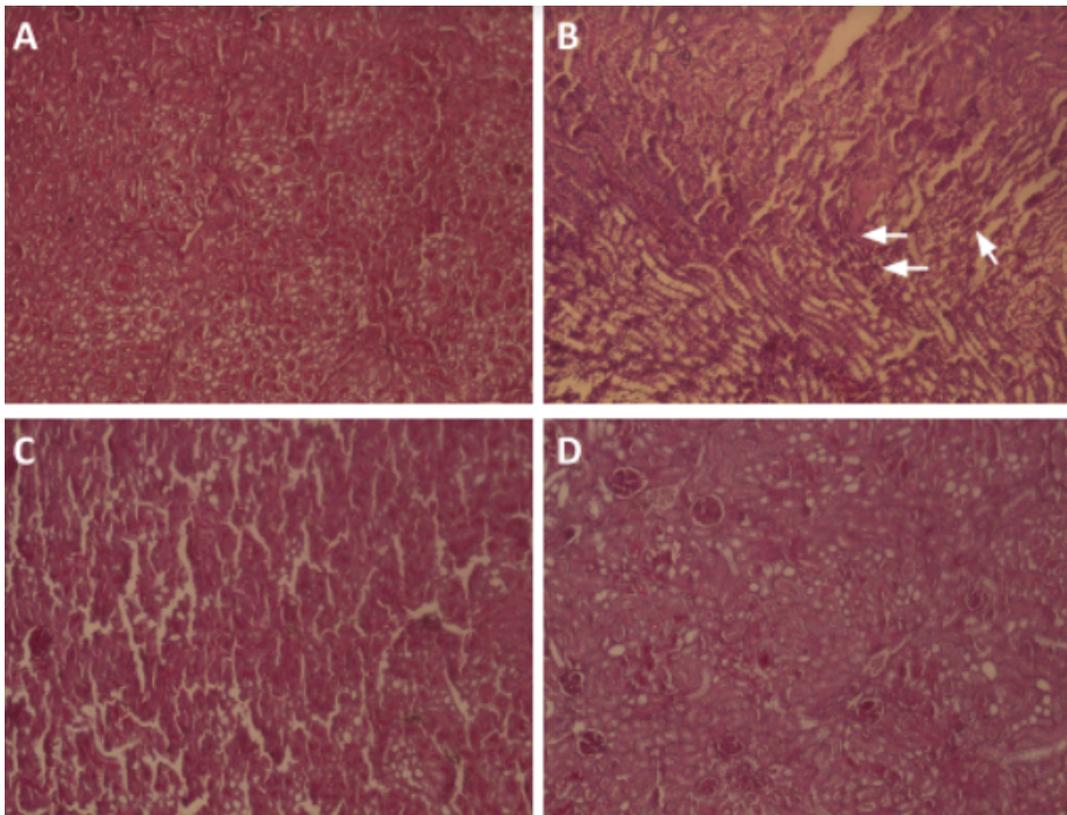


Figura 8.Secciones histológicas del Riñón de ratones BALB/c infectados con 10^3 levaduras de *C. albicans* ATCC 10231 (A) grupo de control negativo, animales sin infectar (B) grupo de control positivo, animales infectados y sin tratamiento (C) Animales infectados y tratados con FCZ (D) Animales infectados y tratados con los péptidos análogos al LL37.

6. DISCUSIÓN

El LL37 es la única catelicidina con acción antimicrobiana que produce el ser humano, y puede ser implementada como posible tratamiento frente a diferentes enfermedades infecciosas ya que estudios previos respaldan su potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades causadas por *S. aureus* al inhibir la formación de biopelícula ⁴⁶; y además otros estudios también evidencian que el péptido LL37 puede inhibir el crecimiento de diferentes especies de *Candida* ⁴⁷. Por lo anterior este estudio comprueba el potencial terapéutico *in vitro* e *in vivo* de 4 péptidos análogos al LL37 (LL37-1, LL37-D, LL27-AC1 y LL37AC2) diseñados previamente por el grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca ⁵¹ frente a diferentes cepas de referencia de *Candida* y frente a 14 aislamientos clínicos de *Candida albicans*.

El diseño de péptidos es una estrategia muy prometedora para dar solución a la problemática de resistencia antifúngica frente a la *Candidiasis Vulvovaginal*, una de las limitaciones del péptido LL37 natural es que este es susceptible a la degradación por proteasas, por lo cual el diseño de los péptidos utilizados en este estudio contempló el uso de aminoácidos D, para evitar esta problemática y así potenciar la acción antimicrobiana de los péptidos ^{46,51}.

Observamos que de los cuatro péptidos análogos al LL37 el LL37-1 tiene actividad antifúngica al inhibir totalmente el crecimiento de 4 aislamientos clínicos en un periodo de tiempo de 24 horas a una concentración de 2.5µM (Fig 1, S1,S2 y S3). Por otro lado el péptido LL37-D y LL37-AC2 inhibieron totalmente el crecimiento fúngico de los 4 aislamientos en un periodo de tiempo de 48 horas a una concentración de 10µM, y por último el péptido LL37-AC1 no logró inhibir el crecimiento fúngico en ninguno de los aislamientos clínicos. Estos resultados concuerdan con los estudios previos en donde el péptido LL37-D logró inhibir el crecimiento de diferentes cepas de referencia de *Candida albicans*⁴⁷.

Se demostró que el fluconazol no logró inhibir el crecimiento de la cepa de referencia de *Candida albicans* ATCC 10231 lo cual apoya los recientes estudios de Yassin et al, 2020⁵², que

estipulan un aumento en la ineficacia de los tratamientos para la candidiasis vulvovaginal debido al crecimiento en la resistencia causado principalmente por la automedicación en mujeres que sufren de esta enfermedad y a la persistencia de las levaduras en la vagina, algunos antígenos de *Candida* producen déficit inmunológico y *Candida* prolifera y se repiten las infecciones^{53,54}.

Estudios anteriores han demostrado que el LL37 logra inhibir el crecimiento de diferentes especies de *Candida* con valores de MIC de 64 μM , lo cual al contrastarlo con los resultados de este estudio se demuestra que las modificaciones realizadas a los péptidos potencializan la actividad antimicrobiana logrando inhibir el crecimiento de diferentes especies de *Candida*⁵⁴.

Los valores de MIC de los péptidos análogos al LL37 son consecuentes con los resultados de las curvas de crecimiento, puesto que el LL37-1 y el LL37-D fueron los péptidos con valores de MIC más bajos de hasta 12.5 a 25 μM y de hasta 1.52 a 25 μM respectivamente; esto en comparación a los otros dos péptidos análogos (LL37-AC1 y LL37-AC2) los cuales en su mayoría tenían valores de MIC superiores a 50 μM . Por ende las modificaciones realizadas al LL37 funcionan de manera adecuada principalmente en el péptido LL37-D el cual logró inhibir el crecimiento de 10 aislamientos clínicos de manera exitosa con valores de MIC significativamente bajos.

Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de usar los otros péptidos análogos estudiados para complementar el tratamiento con FCZ, esto debido a que en los ensayos de sinergia de los péptidos junto con FCZ, se evidencio una disminución significativa en los valores de MIC de los 4 péptidos análogos y del FCZ con valores de hasta 0.78-1.56 μM y 0.5-1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Además se destaca que de los 14 aislamientos analizados con cada uno de los péptidos estudiados se logró la inhibición del crecimiento de una cantidad significativa de aislamientos; en donde el LL37-1 inhibió la actividad fúngica de 9 aislamientos, el LL37-D inhibió la actividad fúngica de 11 aislamientos, el LL37-AC1 inhibió la actividad fúngica de 8 aislamientos y por último el LL37-AC2 inhibió la actividad fúngica de 12 aislamientos. Por ende se muestra que todos los péptidos análogos al LL37 usados en este estudio son candidatos

potenciales para ser usados como complemento al tratamiento con FCZ, ya que estos péptidos se encargan de generar una disrupción en la membrana celular del hongo alterando la morfología, provocando la muerte celular y además favoreciendo el ingreso del FCZ a la célula para que este puede ejercer su mecanismo de acción y aumente la cantidad de compuestos tóxicos mediante la alteración de metabolismo celular⁵⁵.

La patogenia de *C. albicans* está asociada a diversos factores de virulencia que le permiten una mayor facilidad para colonizar el tejido. Entre los factores de mayor relevancia se encuentran, la adaptación ambiental, la secreción de enzimas y adhesinas, la formación de biopelículas y la capacidad de dimorfismo de levadura a hifa⁵⁶. Esta transición morfológica le concierne a la levadura diversos rasgos de virulencia puesto que, a través de esta se coordinan otros factores importantes en la invasión y colonización celular en el huésped⁵⁷, es por esto, que diferentes investigadores indicaron que las moléculas antimicrobianas que presentan actividad inhibitoria frente a la formación de hifas en *Candida albicans* son alternativas terapéuticas prometedoras contra estos agentes patógenos^{58,59}

Para analizar la eficiencia de los péptidos en cuanto a la inhibición de la transición de levadura a hifa, se utilizó microscopía de fluorescencia, usando el calcofluor white que posee una alta afinidad por la quitina presente en la estructura micótica originando una coloración azul en toda la estructura de *Candida*⁶⁰, esta reacción permite evaluar la capacidad de formación de pseudohifas con y sin tratamiento, las micrografías de las cepas no tratadas evidencian una densa formación de hifas en forma de prolongaciones a partir de la célula madre, por el contrario, las células tratadas con los péptidos análogos evidenciaron una reducción significativa de pseudohifas, por lo que se determinó que los péptidos poseen una gran actividad anti hifal. De forma similar se ha demostrado mediante microscopía electrónica de barrido que el péptido LL-37 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hifas en *Candida albicans*, donde las células tratadas con 50 uM solo presentaron la forma de levadura y no exhibieron formación de hifas⁶¹.

En las células fúngicas, las paredes celulares brindan rigidez y estabilidad a las células y mantienen el equilibrio osmótico ⁶², a su vez rodean las membranas celulares que representan una barrera esencial ⁶³, pero su ubicación e importancia las hacen susceptibles a los agentes antimicrobianos. El principal mecanismo de acción del péptido LL37 contra las especies de *Candida* puede asociarse al daño en la membrana citoplasmática al crear poros y alterar la permeabilidad de la membrana que permiten la fuga de compuestos citoplasmáticos como los cationes de potasio, el ATP y los aminoácidos que salen a través de la membrana permeabilizada, un mecanismo que es letal y conduce a la muerte celular ^{64, 65}. Para evaluar la actividad de los péptidos sobre la integridad celular, se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión la morfología celular de *Candida albicans* ATCC 10231 expuesta a una concentración de 12,5 uM y 100 uM de cada péptido. Los resultados mostraron que después del tratamiento con péptidos análogos a LL37, las células desarrollaron cambios patológicos asociados, como estructuras celulares irregulares, se alteró la integridad de la membrana y se observó bordes celulares difusos e irregulares. Asimismo, se demostraron cambios citopáticos, como la inducción de vacuolas masivas, citoplasma heterogéneo y orgánulos de mayor tamaño. Esto sugiere un mecanismo de acción del péptido sobre la pared y la membrana del hongo, alterando así la integridad celular.

Se ha demostrado que LL37 altera la permeabilidad de la membrana ocasionando la muerte celular, en estudios anteriores, Hertog et al, año 2005⁶⁶ evidenciaron que el péptido LL37 se localizaba principalmente en la pared celular y la membrana celular mientras que la histatina 5 ejercía su actividad a nivel intracelular, no obstante, otras investigaciones han evaluado si LL37 puede causar alteraciones en los componentes intracelulares, evidenciando que la actividad antimicrobiana de LL37 se acompaña de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno ROS, las cuales pueden inducir la alteración de ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares ⁶⁷, además LL37 afectó negativamente la membrana de las mitocondrias lo cual contribuye a la pérdida de viabilidad celular⁶⁰. También se ha observado que este péptido reduce el espesor de la pared celular, inhibe la adhesión de *Candida* al interactuar con componentes de la pared celular e interrumpe la biogénesis de la pared celular ⁶⁸.

En el modelo *in vivo* se demostró que todos los péptidos a una concentración de 0.7 mg lograron disminuir la carga fúngica de manera significativa ($P < 0.0001$) en comparación con el grupo control y el grupo tratado con FCZ; además se destaca que el péptido LL37-D redujo en su totalidad el crecimiento fúngico en los tres tejidos analizados. Estos resultados apoyan el diseño de péptidos antimicrobianos puesto que en los estudios de Wang et al, 2016 se evaluó la actividad del péptido LL-37 recombinante en un modelo *in vivo* de Candidiasis vulvovaginal en ratones Kunming; en donde se redujo a la mitad la infección fúngica ($4,8 \times 10^4$ UFC/ml) en comparación con el control positivo ($8,5 \times 10^4$ UFC/ml)⁶⁹, y al comparar estos resultados con los evidenciados en este estudio se demuestra que las modificaciones realizadas al LL-37 para evitar la degradación por proteasas y favorecer la actividad anti biopelícula^{46,51}, reducen significativamente el crecimiento de esta levadura en comparación con la actividad antifúngica del péptido LL-37 sin modificaciones.

Respecto al análisis histopatológico del tejido de riñón de los ratones se evidencio que los péptidos lograron reducir la carga fúngica y mantuvieron la morfología celular normal en comparación con el control positivo donde se observó una infección establecida con presencia de levaduras y formación de hifas. Así mismo, se observó un alto grado de afección del tejido tratado con fluconazol en contraste con el control negativo, a diferencia del tejido tratado con los péptidos que presentan una morfología celular más acorde al control negativo.

Estos resultados sugieren que los péptidos derivados de LL-37 son candidatos prometedores para el tratamiento y control de la candidiasis, sin la necesidad de reemplazar el tratamiento actual con FCZ; ya que según estos resultados los péptidos análogos al LL-37 y el FCZ funcionan muy bien en sinergia. Además en este primer modelo *in vivo* con los péptidos análogos, se evidenció una reducción significativa de la carga fúngica en candidiasis sistémica; por lo cual se hace necesario seguir con los estudios *in vivo* utilizando estos péptidos análogos al LL-37, pero en este caso estableciendo un modelo Candidiasis vulvovaginal en ratones.

6.1 CONCLUSIONES

Los péptidos análogos al LL37 presentaron una potente actividad antimicrobiana *in vitro* frente a los aislamientos clínicos de *Candida albicans* y frente a los diferentes aislamientos de referencia de *Candida*, evidenciando inhibiciones fungicidas y fungistáticas a diferentes concentraciones. Se determinó que las concentraciones mínimas inhibitorias para los péptidos LL37-1, LL37-D, LL37AC1 y LL37-AC2 en aislamientos clínicos fueron de 50 μ M, 12.5-25 μ M, 50-100 μ M y 25-50 μ M respectivamente; en donde el péptido LL37-D fue el que tuvo mejor actividad antifúngica.

También se demostró que los péptidos especialmente el LL37-D lograron potenciar la actividad inhibitoria de los aislamientos de *Candida*, en sinergia junto con el fluconazol; con valores de MIC de los péptidos mucho más bajos en comparación a los valores de MIC de los péptidos empleados sin fluconazol; demostrando que no es necesario reemplazar el tratamiento actual contra la Candidiasis vulvovaginal y por el contrario este puede complementar y potenciar la acción del fluconazol, disminuyendo tiempos de tratamiento así como también la resistencia antifúngica.

Se lograron visualizar alteraciones morfológicas en *Candida albicans* ATCC 10231 usando el péptido LL37-D, el cual inhibió el crecimiento de pseudohifas en la levadura; además género alteraciones visibles en la membrana celular y al interior de la célula.

En los ensayos *in vivo* los péptidos sintéticos lograron disminuir significativamente la carga fúngica en los órganos de los ratones con una significancia estadística de $P < 0.0001$, demostrando que los péptidos análogos al LL37- tienen potencial terapéutico frente a especies de *Candida*.

6.2 RECOMENDACIONES

Los péptidos análogos a LL37 exhibieron efectos sinérgicos importantes cuando se emplearon en combinación con el fluconazol un antifúngico utilizado convencionalmente para el tratamiento de la candidiasis. No obstante, no se conoce a fondo el mecanismo con el que interactúan estos compuestos por lo que es necesario realizar más estudios para explorar a fondo el efecto sinérgico y su potencial terapéutico.

De igual forma, se recomienda para futuras investigaciones evaluar el desarrollo de una presentación tópica del péptido LL-37 para analizar la actividad antimicrobiana de los péptidos en un modelo de candidiasis vulvovaginal *in vivo* y establecer su eficiencia para disminuir la carga fúngica vaginal.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vigezzi C, Riera FO, Rodriguez E, Icely PA, Miró MS, Figueredo CM, et al. Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2021;53(2):171–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754120300560>
2. Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos EV. Candidemia in Colombia. *Biomedica* [Internet]. 2020 [citado el 1 de abril de 2022];40(1):195–207. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/4400>
3. Miró MS, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely PA, Gonzaga de Freitas Araújo M, Riera FO, et al. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2017 [citado el 1 de abril de 2022];34(2):65–71. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-candidiasis-vulvovaginal-una-antigua-enfermedad-S1130140617300281>
4. Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. *Genes (Basel)* [Internet]. 2018 [citado el 1 de abril de 2022];9(9). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/genes9090461>
5. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics (Basel)* [Internet]. 2020 [citado el 1 de abril de 2022];9(6):312. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
6. López-Olmos J, Lerma E. Tratamiento de la candidiasis vulvovaginal recidivante: estudio prospectivo comparativo de tres preparados antimicóticos con dosis única durante 6 meses. *Clin Invest Ginecol Obstet* [Internet]. 2000 [citado el 1 de abril de 2022];27(10):366–75. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-ginecologia-obstetricia-7-articulo-tratamiento-candidiasis-vulvovaginal-recidivante-estudio-13089>
7. Pazgier M, Ericksen B, Ling M, Toth E, Shi J, Li X, et al. Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37. *Biochemistry* [Internet]. 2013 [citado el 1 de abril de 2022];52(9):1547–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/bi301008r>
8. Wang G, Mishra B, Epanand RF, Epanand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 [citado el 1 de abril de 2022];1838(9):2160–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.016>
9. Bandurska K, Berdowska A, Barczyńska-Felusiak R, Krupa P. Unique features of human cathelicidin LL-37: Unique Features of Human Cathelicidin LL-37. *Biofactors* [Internet]. 2015;41(5):289–300. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1225>
10. Saporito P, Vang Mouritzen M, Løbner-Olesen A, Jenssen H. LL-37 fragments have antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis* biofilms and wound healing potential in HaCaT cell line. *J Pept Sci* [Internet]. 2018 [citado el 1 de abril de 2022];24(7):e3080. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29737589/>
11. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* [Internet] 2001 [citado 10 oct 2020];9(12):591–596. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11728872/>

12. Casimiro JC, Roque JA, Medina AM, Andrade AA, López JS, Parra SE, et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. [Internet] 2009 [citado 10 oct 2020] ;18(1):16-29. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al091d.pdf>
13. Scarsini M, Tomasinsig L, Arzese A, Este F, Oro D, Skerlavaj B. Antifungal activity of cathelicidin peptides against planktonic and biofilm cultures of *Cándida* species isolated from vaginal infections. Peptides [Internet] 2015 [cited 10 oct 2020] ;71:211-221. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26238597/>
14. Xu Y, Sheng F, Zhao J, Chen L, Li C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Cándida albicans* isolates. Arch Microbiol [Internet] 2015[cited 10 oct 2020] ;197(9):1087-1093. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26349561/>
15. Wang Y, Liu J, Shi C, Li W, Zhao Y, Yan L, et al. Mutations in transcription factor Mrr2p contribute to fluconazole resistance in clinical isolates of *Cándida albicans*. Int J Antimicrob Agents [Internet] 2015 [cited 10 oct 2020] ;46(5):552-559. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26404130/>
16. Bondaryk M, Staniszewska M, Zielińska P, Urbańczyk-Lipkowska Z. Natural Antimicrobial Peptides as Inspiration for Design of a New Generation Antifungal Compounds. J Fungi (Basel) [Internet] 2017 [cited 10 oct 2020] ;3(3). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715947/>
17. Luo Y, McLean DTF, Linden GJ, McAuley DF, McMullan R, Lundy FT. The Naturally Occurring Host Defense Peptide, LL-37, and Its Truncated Mimetics KE-18 and KR-12 Have Selected Biocidal and Antibiofilm Activities Against *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* In vitro. Frontiers in Microbiology [Internet] 2017 [cited 10 oct 2020] ;8:544. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28408902/>
- 18 Estrella CM. Infecciones por candida spp. infecciones superficiales y profundas. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado [Internet] 2002 [citado 20 oct 2020] 1;8(68):3615-3624. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541202706756>
19. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A model organism for studying fungal pathogens. ISRN Microbiol [Internet]. 2012 [citado el 1 de abril de 2022];2012:538694. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/538694>
20. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet] 2012 [cited 20 oct 2020] Jan;31(1):21-31. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21544694/>
- 21 Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Almeida AM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol [Internet] 2013 [cited 20 oct 2020] ;62(Pt 1):10-24. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23180477/>
- 22 Kadosh D. Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. Cell Mol Life Sci [Internet] 2016 [cited 20 oct 2020] -11;73(22):4265-4278. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27312239/>
- 23 Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. Frontiers in Medicine [Internet] 2018 [cited 20 oct 2020] Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00028/full>
24. Eix EF, Nett JE. How biofilm growth affects *Candida*-host interactions. Front Microbiol [Internet]. 2020;11:1437. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01437>

- 25 Finkel JS, Mitchell AP. GENETIC CONTROL OF CANDIDA ALBICANS BIOFILM DEVELOPMENT. *Nat Rev Microbiol* [Internet] 2011 [cited 20 oct 2020] -2;9(2):109-118. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21189476/>
- 26 Miró MS, Rodríguez E. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Rev Iberoam Micol* [Internet] 2017 [citado 20 oct 2020] ;34(2):65-71. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-candidiasis-vulvovaginal-una-antigua-enfermedad-S1130140617300281>
- 27 Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J Fungi (Basel)*[Internet] 2020 [cited 20 oct 2020] -2-25;6(1). Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32106438/>
- 28 Rosati D, Bruno M. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective. *Microorganisms* [Internet] 2020 [cited 20 oct 2020] -1-21;8(2). Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972980/>
29. Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2010 [citado el 1 de abril de 2022];23(2):253–73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00076-09>
30. Tapia P C. Candidiasis vulvovaginal. *Revista chilena de infectología* [Internet] 2008 [citado 20 oct 2020] 08;25(4):312-312. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400016
31. Ray D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Goswami D, Mandal P, et al. Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. *Diabetes Care* [Internet] 2007 [cited 20 oct 2020] Feb;30(2):312-317. Available in: <https://care.diabetesjournals.org/content/30/2/312>
32. Cararach M, Comino R, Armengol E, García E, Martínez JC, Palacios Gil-Antuñano S, et al. La vulvovaginitis candidiásica recurrente. *Prog Obstet Ginecol* [Internet] 2013 [citado 20 oct 2020];56(2):108-116. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304501312001641?via%3Dihub>
33. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol* [Internet] 2016 [cited 20 oct 2020];42(6):905-927. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26690853/>
34. Arechavala A, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G, Negroni R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Revista Iberoamericana de Micología* [Internet] 2007 [citado 10 oct 2020]; 24(4):305-308. Disponible en: https://www.academia.edu/18477415/Identificaci%C3%B3n_y_sensibilidad_frente_a_fluconazol_y_albaconazol_de_100_cepas_de_levaduras_aisladas_de_flujo_vaginal
35. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel SD. Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*; [Internet] 2012 [cited 20 oct 2020]; vol 120. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23168767/>
36. Tsai P, Yang C, Chang H, Lan C. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 10 oct 2020]; 6 (3): 1-11.1. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056723/pdf/pone.0017755.pdf>
37. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis : 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. 62, 1–50.

<https://doi.org/10.1093/cid/civ933>

38. Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2017 [cited 2022 Apr 1];10:237–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S118892>
39. Rivas SB, Sada E, Hernandez PR, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. [Internet] 2006 [citado 10 oct 2020] 48 (1): 62-70. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/salpubmex/sal-2006/sal061i.pdf>
40. Bedout C, Gómez B . Candidiasis vulvovaginal. 2020 [internet] Elsevier.es. [Citado 2 Mar. 2020].Disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13132028>
41. Castrillon LE, Palma A, Padilla C. Péptidos antimicrobianos: antibioticos naturales de la piel [Internet] 2007 [citado 10 oct 2020] ;51:57-67.Disponible en:<https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2007/rmd072d.pdf>
42. Gomez L. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. [internet] 2020 [Citado 20 noviembre. 2020] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a08.pdf>.
43. Bedout, C. and Gómez, B. Candidiasis vulvovaginal.2020 [internet] Elsevier.es. [Citado 20 de nov 2020]. Disponible en : <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13132028>
44. Ulrich HN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* [internet] 2006 [Citado 20 de nov 2020]. Avalaible in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16716248/>
45. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* [Internet]. 2012 [citado 2022 Apr 1];280(1):22–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23246832/>
- 46 Segura M. Efecto inhibitorio de péptidos de defensa innata derivados de LL-37 en biopelícula de *Staphylococcus* spp.Universidad nacional.[Tesis de maestría] Bogotá Colombia 2019
- 47.Chaves G, and Coronado Y. Actividad antifúngica in vitro de péptidos análogos derivados de LL-37 contra levaduras del género *Candida*.Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.[Tesis de pregrado] Bogotá Colombia 2018
48. Travkova O, Moehwald H, Brezesinski G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2017;247:521-532. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28606715/>
49. Hazam P, Goyal R, Ramakrishnan V.Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential.*Prog Biophys Mol Biol* [Internet].2019;142:10-22. Available from:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30125585/>
- 50.Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio* [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 1];14(1):55–67. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>
- 51.Santos P, Muñoz LC, Pinilla G, Navarrete J & Cruz CA. Péptidos antimicrobianos LL-37 y sus derivados frente a microorganismos de importancia clínica: Una alternativa a la resistencia microbiana. In: Edgar SM, editor. *Ciencia transdisciplinar para el desarrollo y la supervivencia de la humanidad*. Edgar Serna M; 2021. p. 458.
52. Yassin MT, Mostafa AA, Al-Askar AA, Bdeer R. In vitro antifungal resistance profile of *Candida* strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis. *Eur J Med Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 1];25(1):1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31901238/>

53. López-Olmos, J., & Lerma, E. (2000). Tratamiento de la candidiasis vulvovaginal recidivante: estudio prospectivo comparativo de tres preparados antimicóticos con dosis única durante 6 meses. *Clinica e investigación en ginecología y obstetricia*, 27(10), 366–375.
<https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-ginecologia-obstetricia-7-articulo-tratamiento-candidiasis-vulvovaginal-recidivante-estudio-13089>
54. Scarini Ms, 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* [Internet]. 2015;71:211–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978115002193>
55. Ciornei CD, Sigurdardóttir T, Schmidtchen A, Bodelsson M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 1];49(7):2845–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.7.2845-2850.2005>
56. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi (Basel)* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 1];7(2):79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499276/>
57. Jothi R, Sangavi R, Kumar P, Pandian SK, Gowrishankar S. Catechol thwarts virulent dimorphism in *Candida albicans* and potentiates the antifungal efficacy of azoles and polyenes. *Sci Rep* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 1];11(1):21049. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-00485-2>
58. Bar-Yosef H, Vivanco Gonzalez N, Ben-Aroya S, Kron SJ, Kornitzer D. Chemical inhibitors of *Candida albicans* hyphal morphogenesis target endocytosis. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [cited 2022 Apr 1];7(1):5692. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28720834/>
59. Priya A, Pandian SK. Piperine impedes biofilm formation and hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 1];11:756. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32477284/>
60. Watanabe H, Azuma M, Igarashi K, Ooshima H. Analysis of chitin at the hyphal tip of *Candida albicans* using calcofluor white. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 1];69(9):1798–801. Available from: <https://academic.oup.com/bbb/article/69/9/1798/5952853?login=false>
61. Wong JH, Ng TB, Legowska A, Rolka K, Hui M, Cho CH. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. *Peptides* [Internet]. 2011;32(10):1996–2002. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978111003378>
62. Beltran ER, Bazan CI, Iranzo M, Mormeneo S & Arias JP The Cell Wall of *Candida albicans*: A Proteomics View. *Interchopen*, [Internet] 2019; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/66105>
63. Ma H, Zhao X, Yang L, Su P, Fu P, Peng J, et al. Antimicrobial peptide AMP-17 affects *Candida albicans* by disrupting its cell wall and cell membrane integrity. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 1];13:2509–20. Available from: <https://www.dovepress.com/antimicrobial-peptide-amp-17-affects-candida-albicans-by-disrupting-it-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>

64. Swidergall M, Ernst JF. Interplay between *Candida albicans* and the Antimicrobial Peptide Armory. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 1];13(8):950–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00093-14>
65. Kodedová M, Sychrová H. Synthetic antimicrobial peptides of the halictines family disturb the membrane integrity of *Candida* cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr* [Internet]. 2017;1859(10):1851–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273617301864>
66. Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, Van't Hof W, Bolscher JGM, Veerman ECI, et al. Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem J* [Internet]. 2005 [cited 2022 Apr 1];388(Pt 2):689–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20042099>
67. Wang K, Dang W, Xie J, Zhu R, Sun M, Jia F, et al. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015 [cited 2022 Apr 1];1848(10 Pt A):2365–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26209560/>
68. Tsai P-W, Cheng Y-L, Hsieh W-P, Lan C-Y. Responses of *Candida albicans* to the human antimicrobial peptide LL-37. *J Microbiol* [Internet]. 2014;52(7):581–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-014-3630-2>
69. Wang F, Huo Y, Yin LR, Sun B, Zhang PP. Effects of antimicrobial peptide LL-37 expressed and purified from prokaryotes in the murine model of vaginal candidiasis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. [Internet]. 2016 [cited 2022 Apr 1] 25;51(7):530–4. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-567X.2016.07.009.

8. ANEXOS

8.1 Protocolo preparación medio RPMI 1640 suplementado con MOPS

1. Disolver 1 sobre medio RPMI (GIBCO thermofisher) en un litro de agua desionizada previamente autoclavada, pesar 33 gramos de morpholinapropanosulfonico (MOPS) y agregarlos al medio RPMI.
2. Con un potenciómetro ajustar el pH de la solución a 7 agregando NaOH y el medio se debe tornar de color naranja o salmon
3. En una cámara de flujo laminar o de bioseguridad previamente expuesta a luz ultravioleta por 15 minutos, abrir el filtro de dos pisos y conectarlo a la bomba de vacío; agregar el medio RPMI en el segundo piso del filtro y encender la bomba de vacío verificando que la succión no sea tan fuerte para filtrar el medio que irá cayendo en el primer piso del filtro y una vez finalizada la filtración tapar, envolver en papel aluminio y refrigerar. (Figura 1)

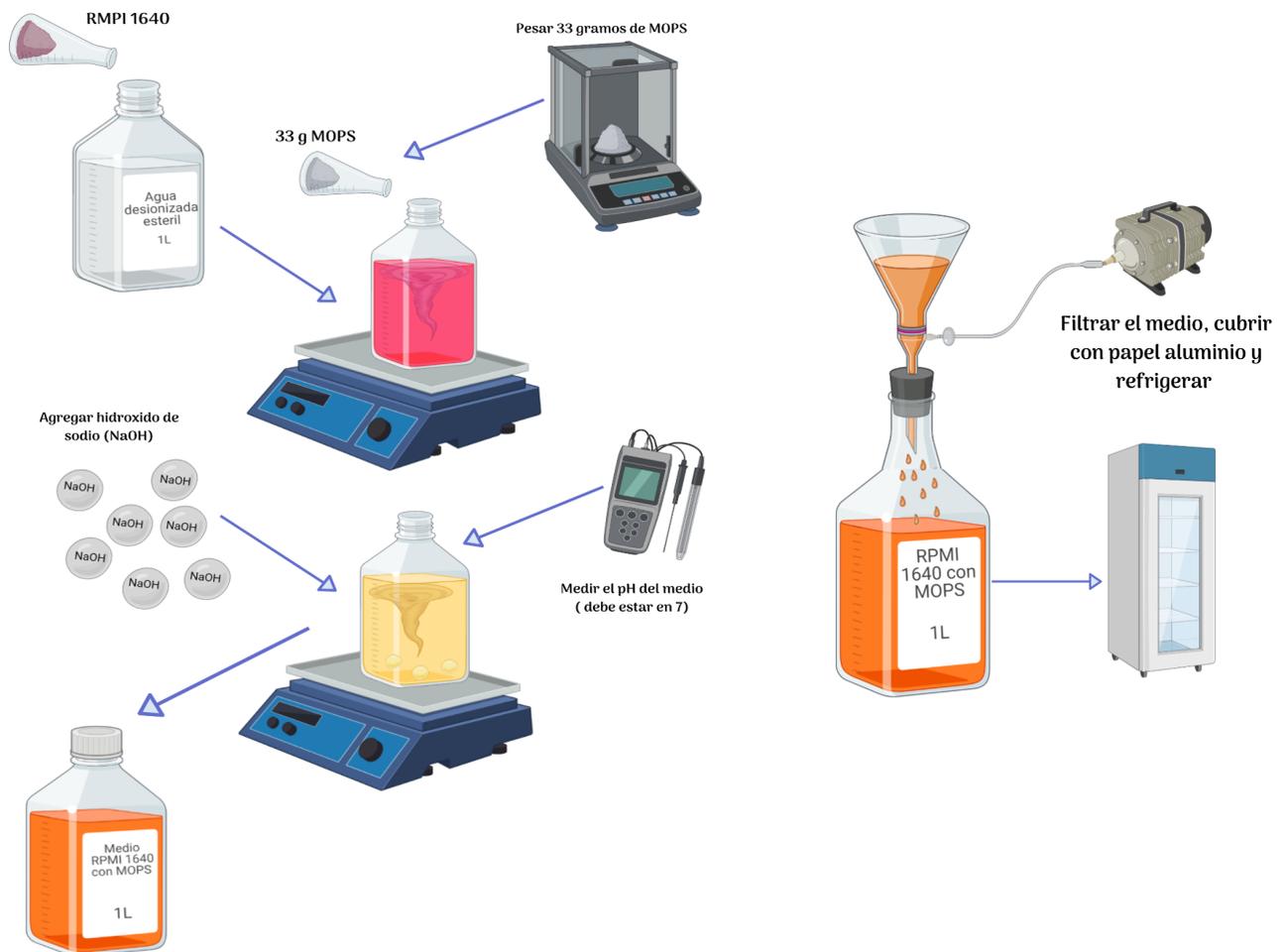


Figura 1. Esquema de preparación del medio RPMI 1640 suplementado con MOPS

8.2 Protocolo de reconstitución de péptidos análogos al LL37

Pesar 3 mg de cada péptido en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril usando un trozo de papel para tomar el polvo. A continuación reconstituir con agua ultrapura (Milli-Q) de la siguiente manera:

ACLL37-1: 725 μ L	DLL37: 690 μ L
ACLL37-2: 713 μ L	LL37-1: 736 μ L

Conservar a 4°C

Notas:

Cálculos realizados teniendo en cuenta el peso molecular y la pureza dada por el fabricante.

Los péptidos tienen carga neta positiva (catiónica) por tal motivo para evitar fuerzas de atracción-repulsión al momento de tomar la cantidad para el pesaje, se debe usar un pequeño trozo de papel a manera de espátula para retirar el producto del envase y dispensar en el eppendorf.

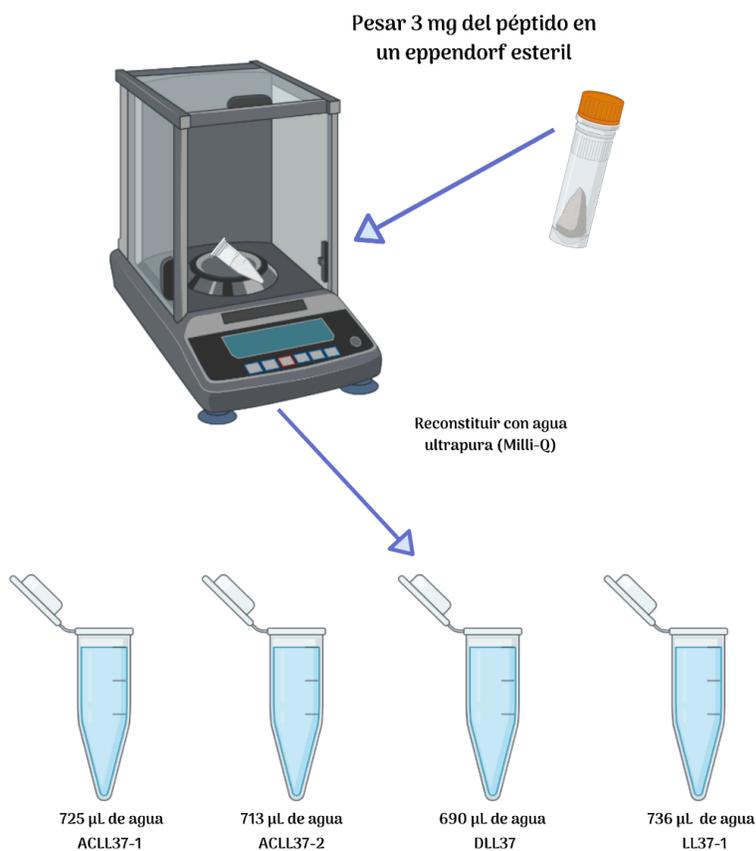


Figura 2. Esquema de reconstitución de péptidos análogos al LL37.

8.3 Protocolo de preparación de fluconazol para MIC

Realizar 10 diluciones seriadas de fluconazol e inocular en placas con fondo curvo, en los pozos del 1 al 10 en los literales D, E, F, G y H ver figura 1 y 2.

1. Marcar del 1 al 10, 20 tubos falcon estériles de 15 mL para realizar las diluciones seriadas; alistar agua destilada esteril y fluconazol (Pfizer, NY, USA)
2. En el tubo 1 agregar 2.6 mL de fluconazol y adicionar 5.4 mL de agua.
3. Del tubo 1 pasar 1 mL al tubo dos y 3 mL al tubo tres, por último adicionar 1 mL de agua en el tubo 2 y 3 mL de agua en el tubo tres.
4. Del tubo 3 pasar 1 mL al tubo 4, 0.5 mL al tubo 5 y 0.5 mL al tubo 6, por último adicionar 1 mL de agua al tubo 4, 1,5 mL de agua al tubo 5 y 3.5 mL de agua al tubo 6.
5. Del tubo 6 pasar 1 mL al tubo 7, 0.5 mL al tubo 8 y 0.5 mL al tubo 9, por último adicionar 1 mL de agua en el tubo 7, 1.5 mL de agua al tubo 8 y 3.5 mL de agua al tubo 9
6. Del tubo 9 pasar 1 mL al tubo 10, por último adicionar 1 mL de agua.
7. En 10 tubos falcon agregar 6 mL de medio RPMI tamponado con MOPS.
8. Pasar 1.5 mL de cada tubo con la dilución de fluconazol a su respectivo tubo con medio RPMI para obtener las concentraciones finales.

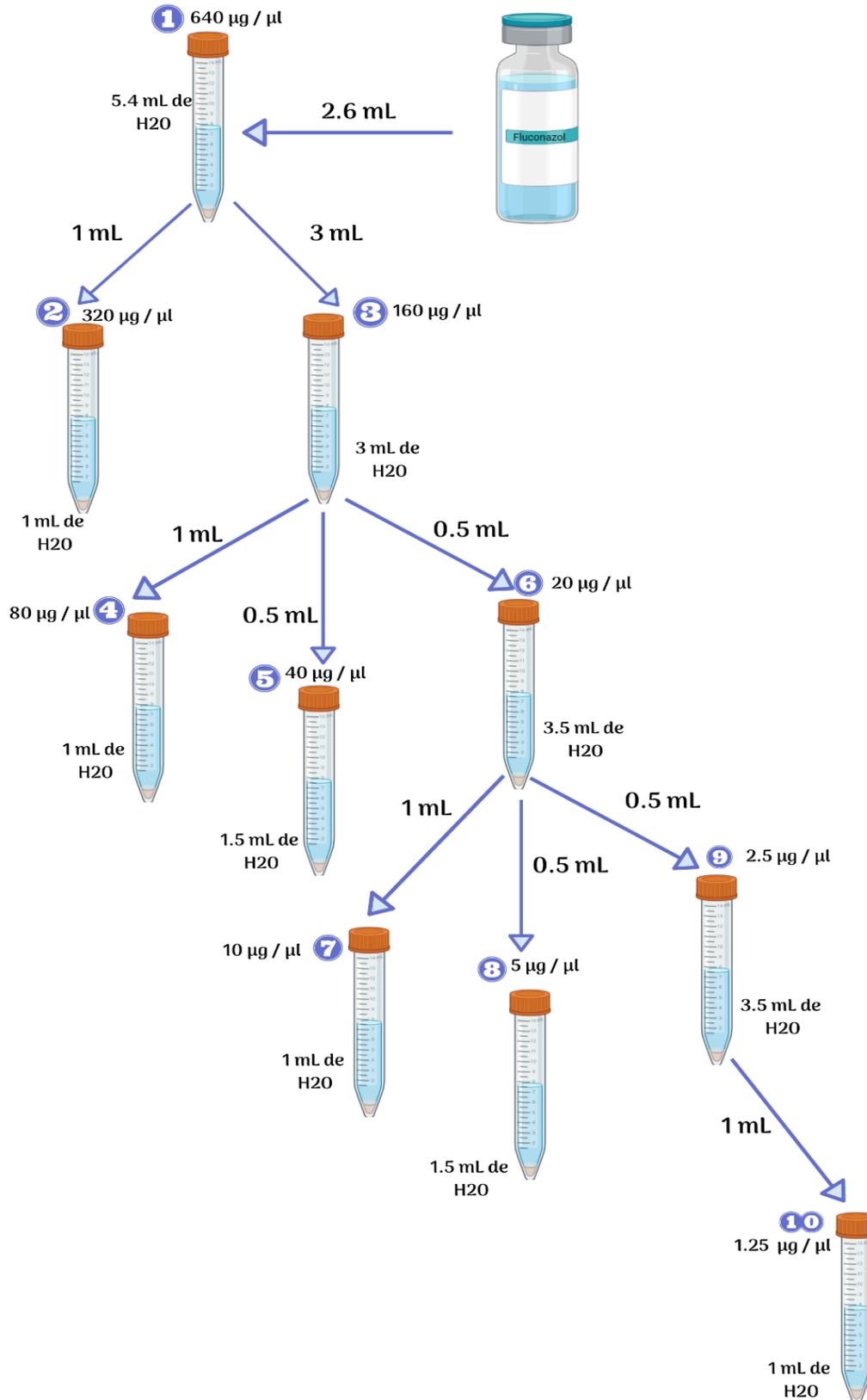


Fig. 3 Esquema de preparación de diluciones de fluconazol.

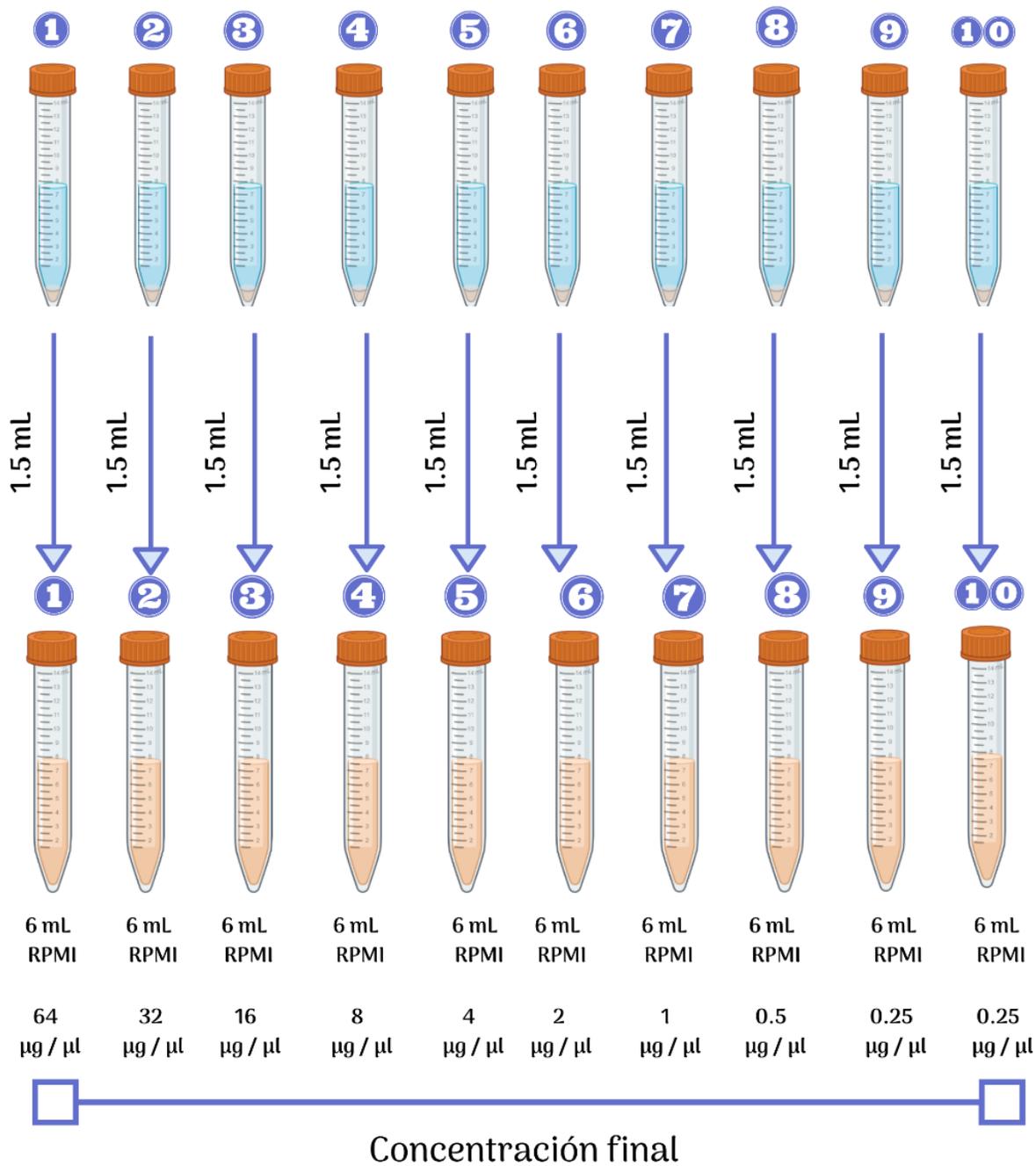
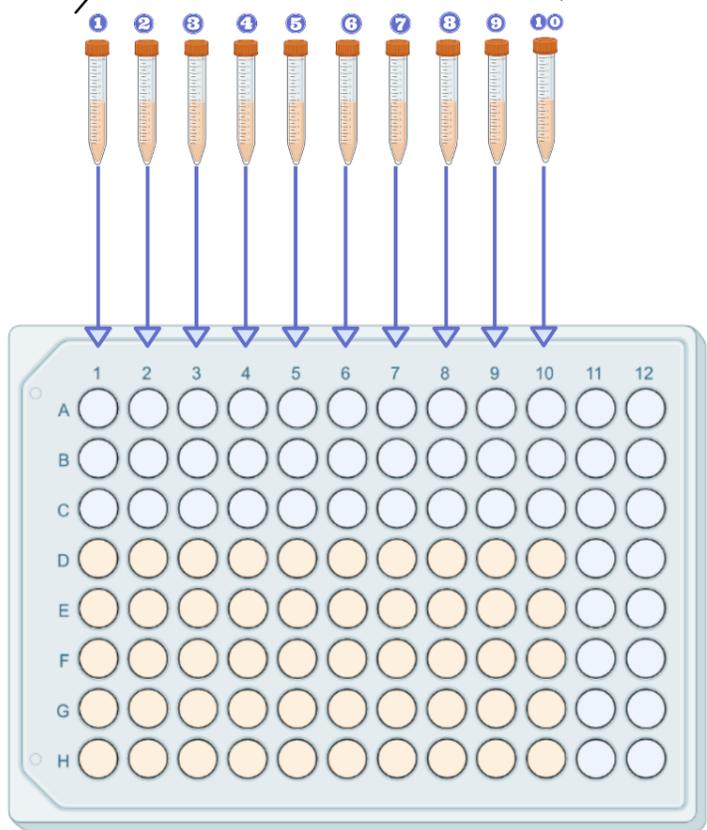
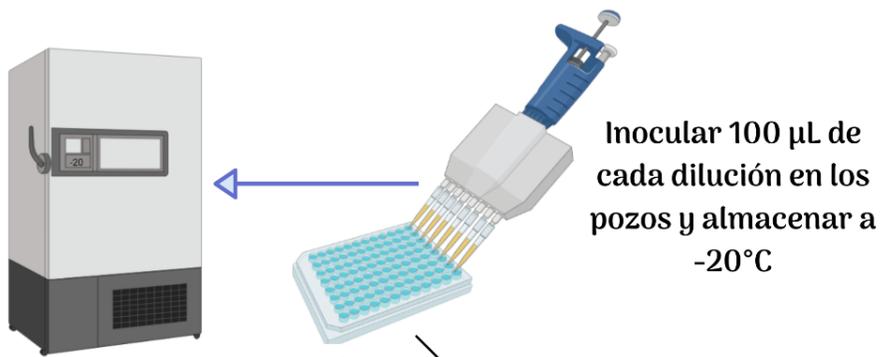


Fig. 4 Esquema de preparación diluciones de fluconazol.



-  Pozos inoculados con diluciones de fluconazol
-  Pozos sin inocular

Fig. 5 Ubicación de las diluciones de fluconazol en placas de 96 pozos.

8.4 Protocolo de montaje de CIM

Materiales:

- Placas de 96 pozos con fluconazol
- Densitómetro o espectrofotómetro
- Pipeta automática
- Medio RPMI tamponado con MOPS
- Inóculos de *Candida* ajustados a escala 0.5 McFarland

Procedimiento

Cada ensayo se realizará por triplicado para asegurar la reproducibilidad del ensayo.

En las placas de 96 pozos (12 columnas numeradas del 1 al 12 y 8 filas numeradas de la A a la H)

1. Preparar los inóculos de *C.albicans* a una escala de 0.5 mcfarland mediante el uso de un densitómetro o mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450, con un límite de absorbancia entre 0.08 y 0.1 que determina una escala 0.5 mcfarland (1×10^8 / ml)
2. Como control positivo se inocularon 100 mL de medio RPMI y 100 mL de inóculo de *Candida* 0.5 Mcfarland en los pozos de la columna 11 de la A a la H.
3. Como control negativo, se inocularon 200 mL de medio RPMI en los pozos de la columna 12 de la A a la H. Para verificar la esterilidad del medio.
4. En las filas A, B y C desde el pozo 1 al 10 se realizaran las diluciones seriadas del péptido, en los pozos A1, B1, C1 agregar 160 μ l de medio y adicionar 40 μ l del péptido (concentración 1000 μ M) para completar un volumen de 200 μ l, en los pozos A2,B2 y C2 hasta los pozos A10, B10 y C10 agregar 100 μ l de medio RPMI, posteriormente, mezclar con la pipeta automatizada los pozos A1, B1 Y C1 y pasar 100 μ l de la solución a los pozos A2, B2 y C2 respectivamente, realizar de 3 a 4 lavados con la pipeta y pasar 100 μ l del pozo 2 al pozo 3 y realizar los lavados, repetir los pasos hasta llegar al pozo 10 del cual se toman 100 μ l de la solución para descartar.
5. En las filas D, E y F se realizará el ensayo de sinergismo entre el fluconazol y el péptido a usar. Se adicionaron 100 μ l de cada dilución del fluconazol en los pozos del 1 al 10 en las filas D, E y F. Se realizaron las diluciones del péptido en el inóculo de *Candida* (para no alterar la concentración) como se mencionó anteriormente, y se transferirá 100 μ l de cada dilución del péptido a cada pozo correspondiente.

6. En las filas G y H se probará el efecto del fluconazol sobre el inóculo de *Candida*, desde el pozo 1 al 10 se adicionan 100 μl de cada dilución del fluconazol y se adiciona 100 μl del inóculo de *Candida*. Todos los pozos quedarán con un volumen final de 200 μl .
7. Incubar a 37°C por 24 horas
8. Realizar la lectura de las placas en un lector de ELISA.

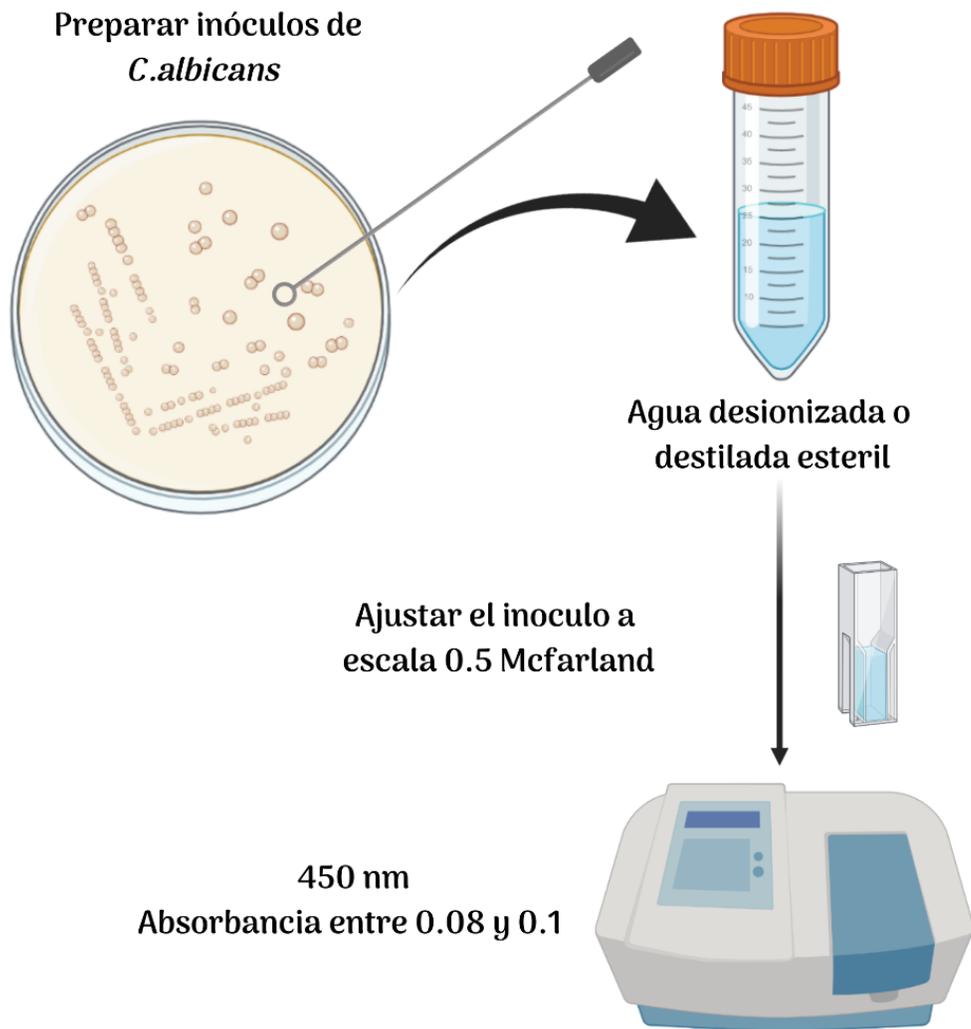


Figura 6. Esquema de preparación de inóculos de *Candida*.

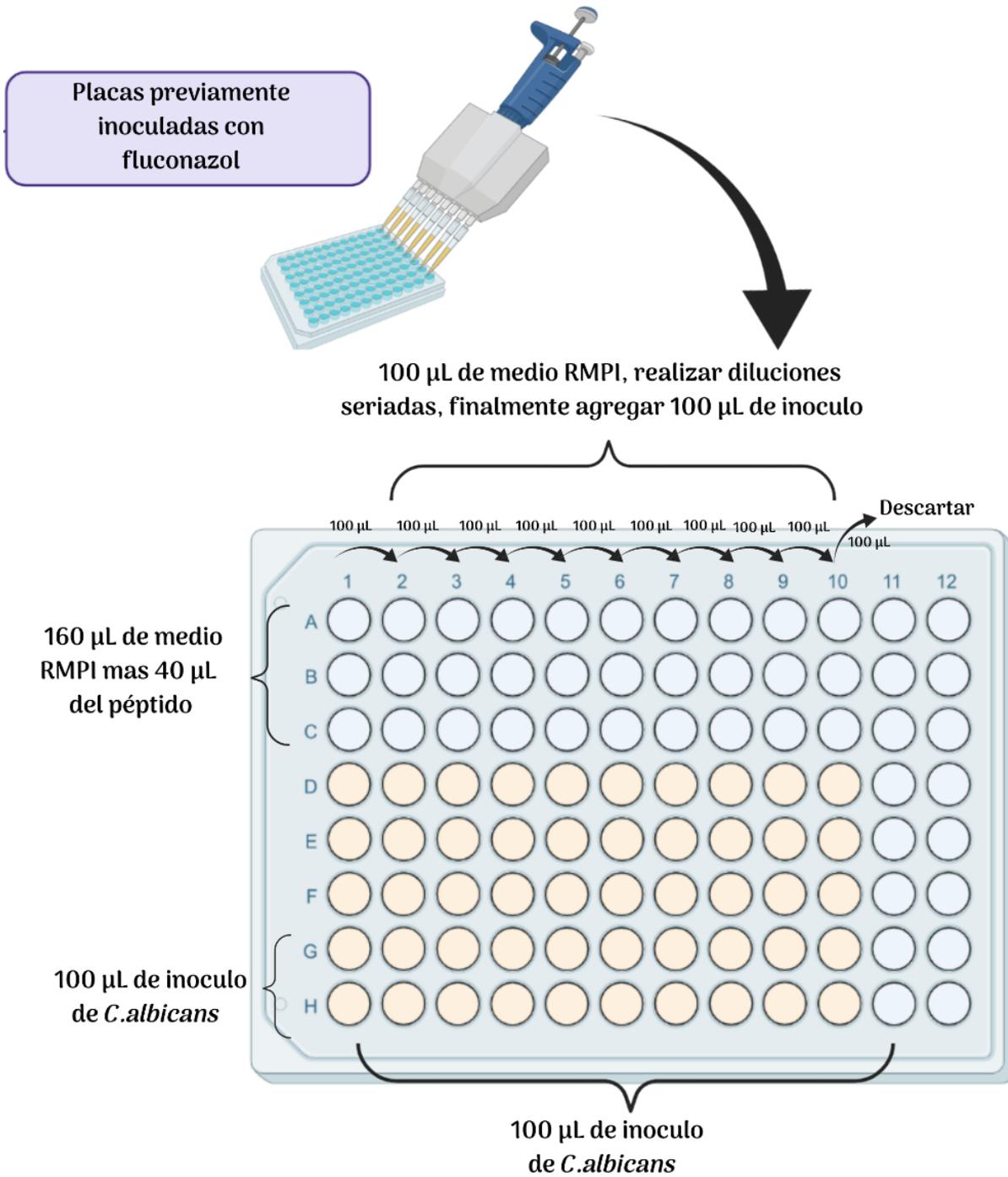


Figura 7. Montaje de ensayo de concentración mínima inhibitoria.

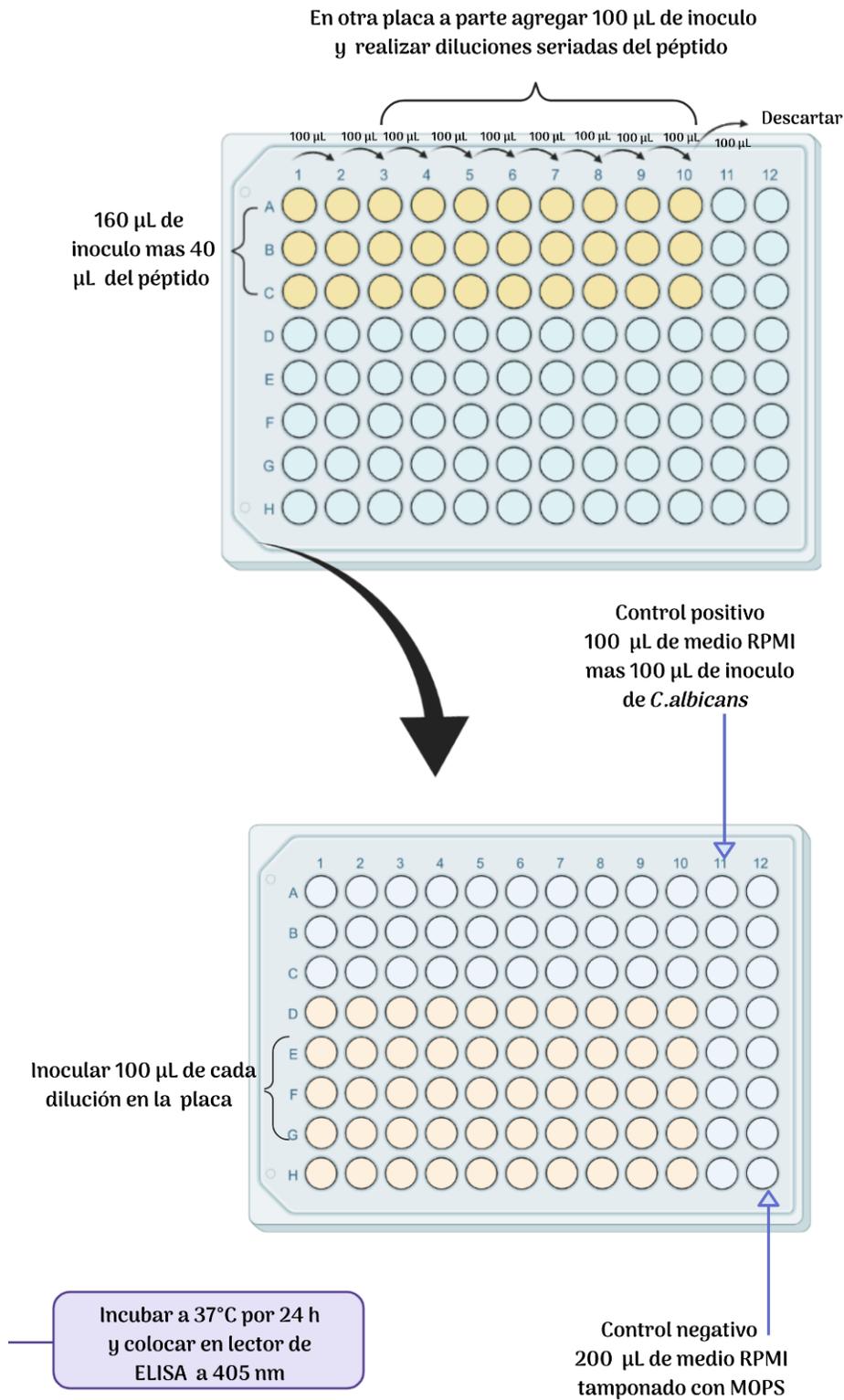


Figura 8. Montaje de concentración mínima inhibitoria.

8.5 Curvas de crecimiento

Candida albicans 194

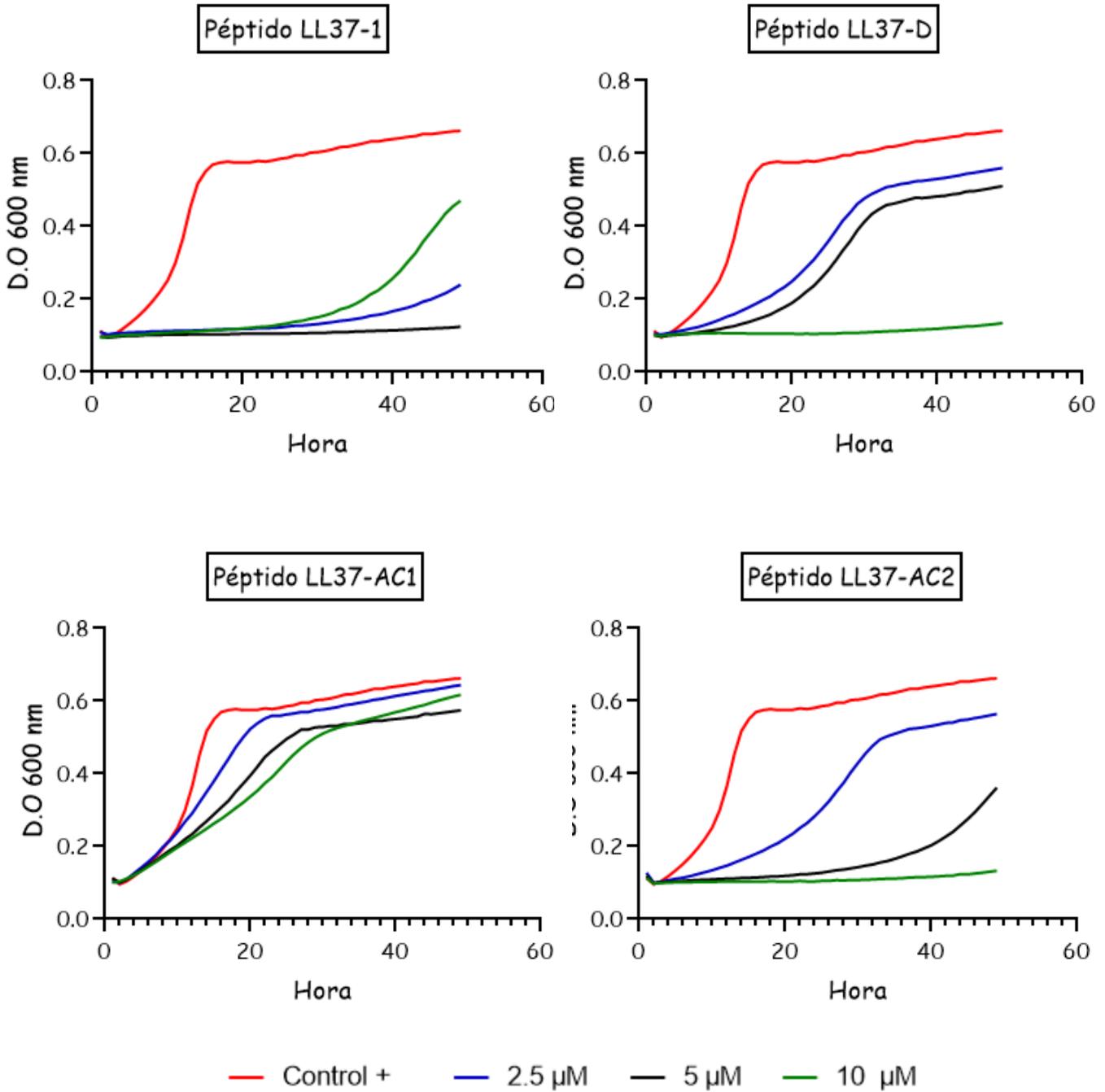


Figura 9. Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 194 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37. Control (Fase de crecimiento sin presencia de péptido).

Candida albicans 5530

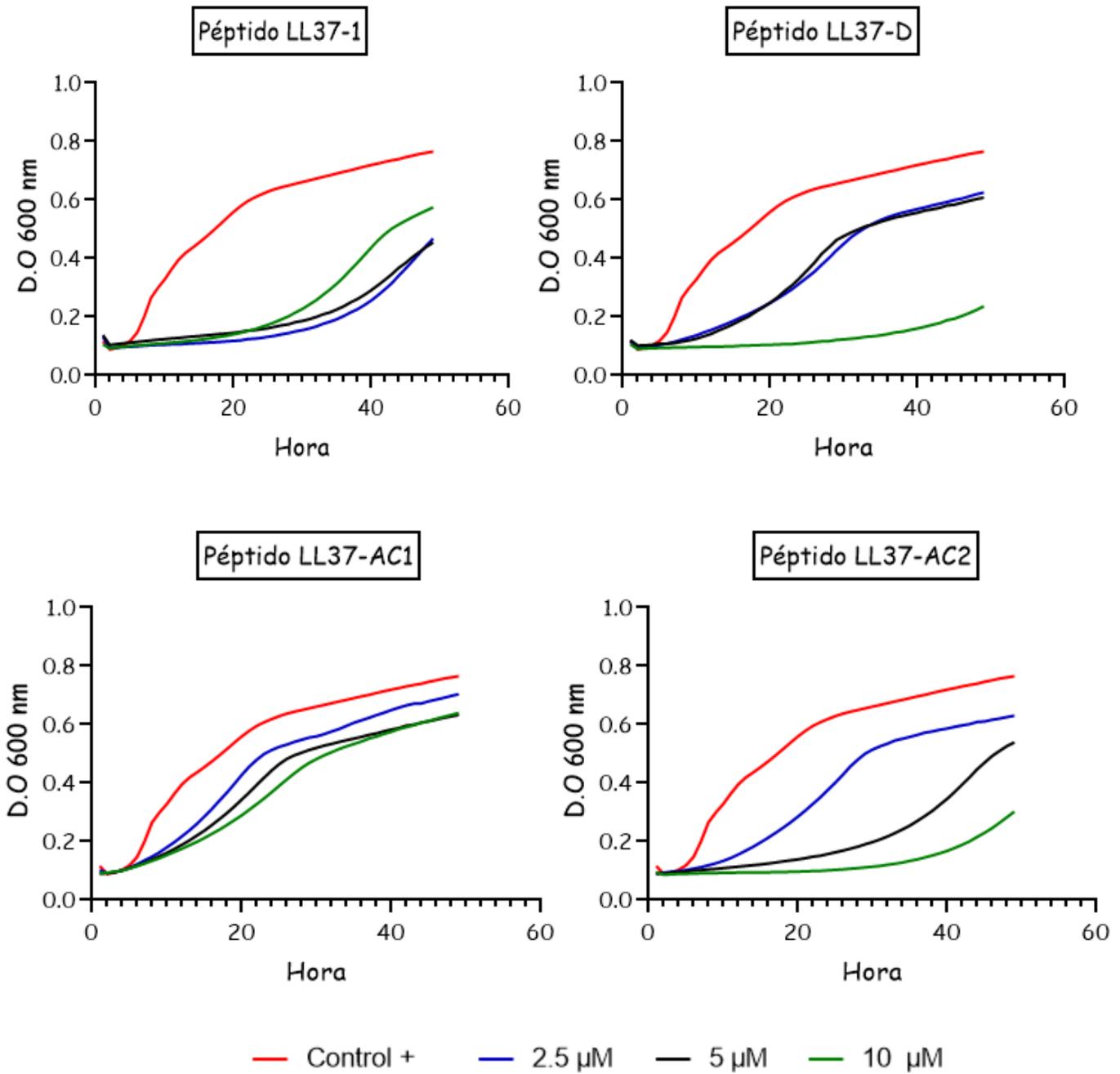


Figura 10. Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 5530 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37. Control (Fase de crecimiento sin presencia de péptido).

Candida albicans 3773

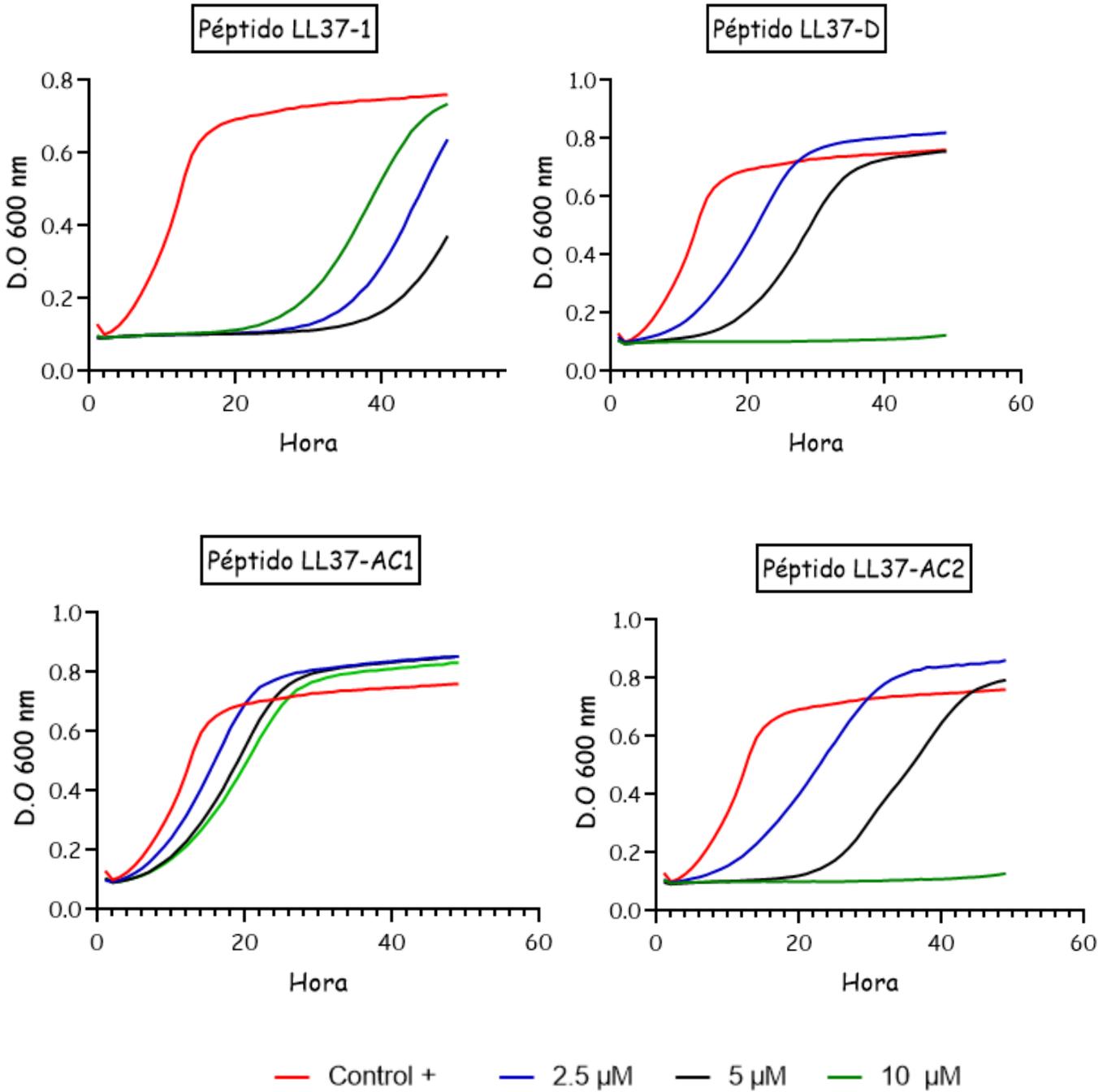


Figura 11. Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 3773 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37. Control (Fase de crecimiento sin presencia de péptido).

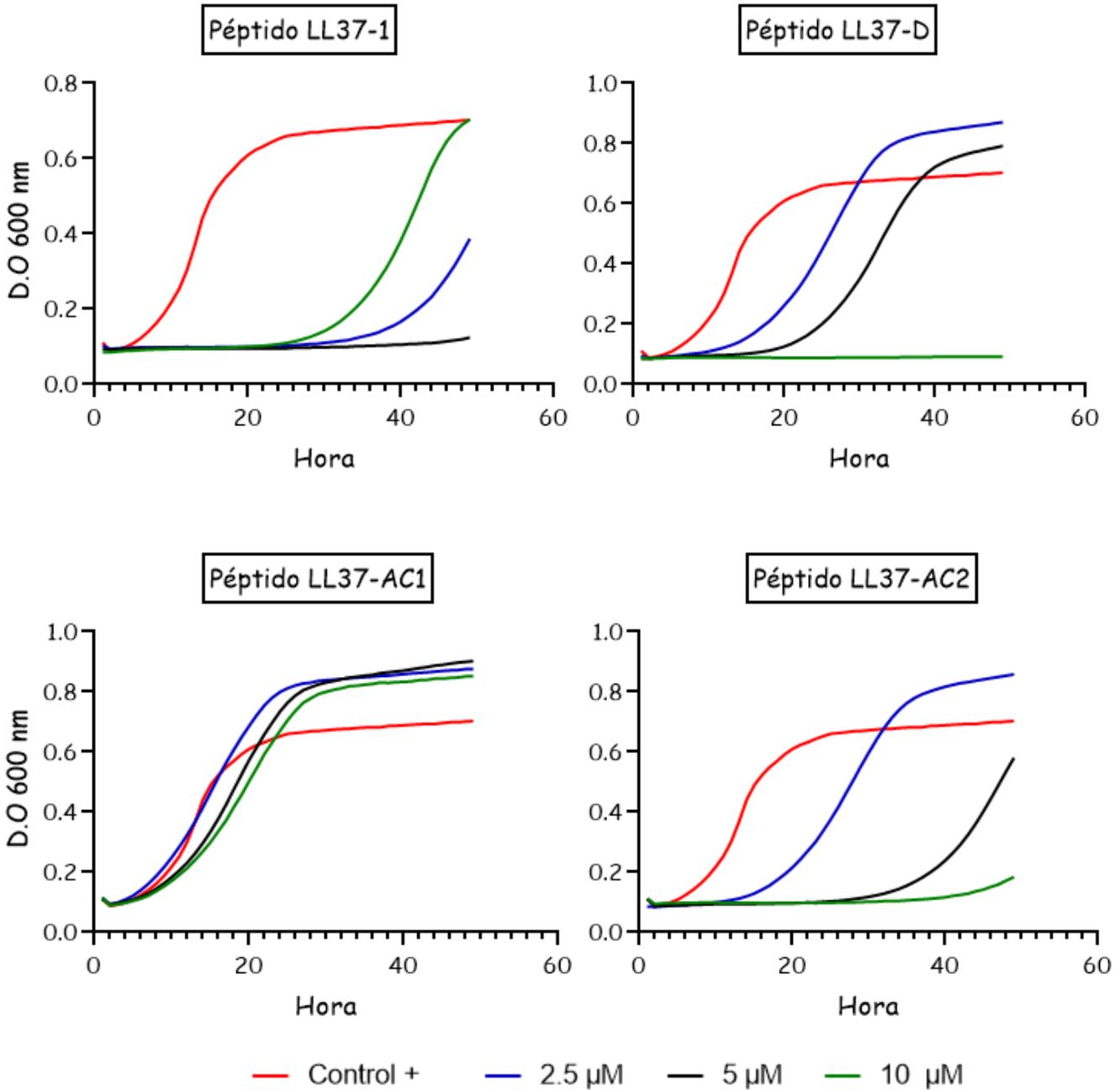


Figura 12. Curva de crecimiento de la levadura *Candida albicans* 2272 frente a varias concentraciones de los péptidos. Control (Fase de crecimiento sin presencia de péptido).

8.6 MIC

Candida parapsilosis

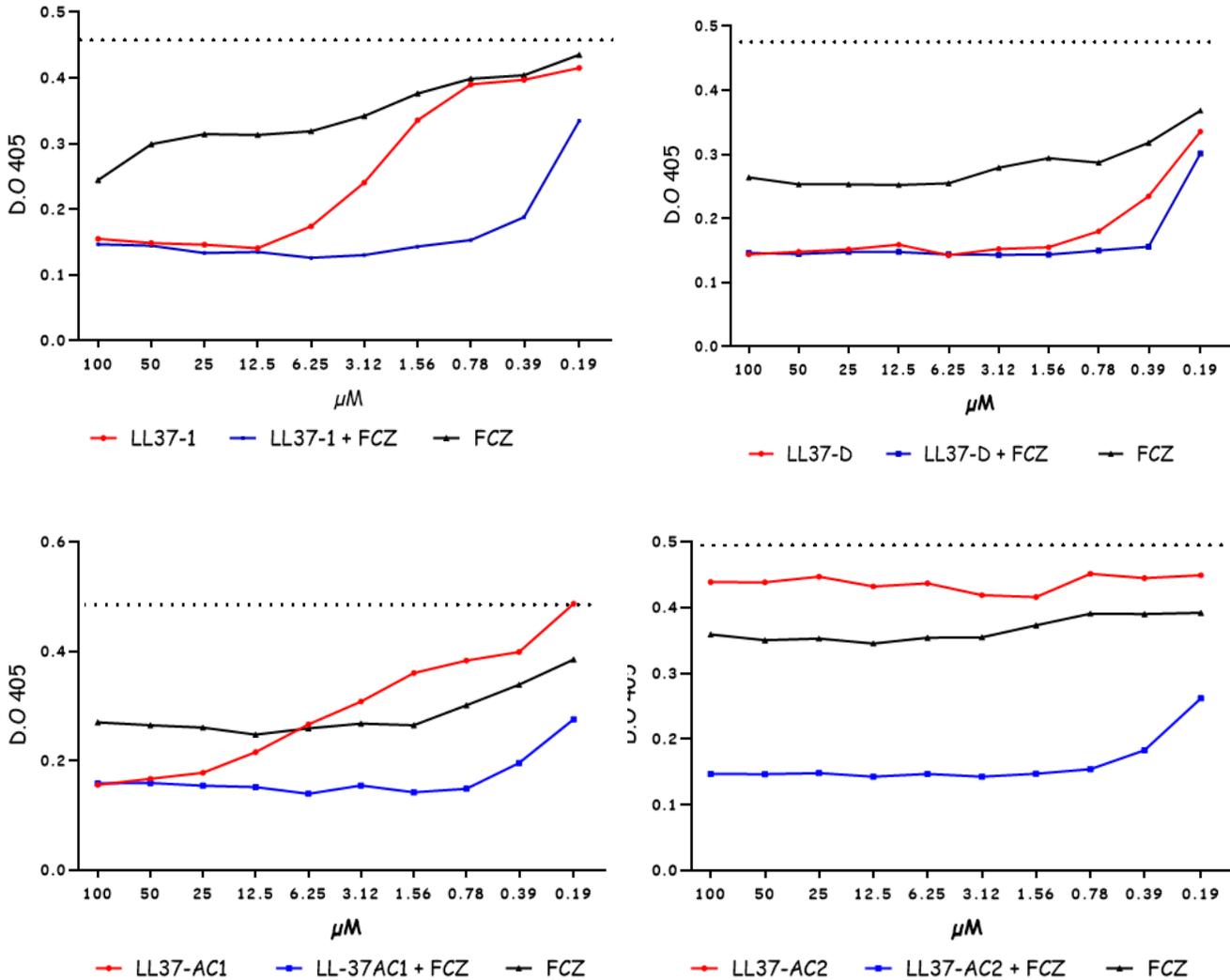


Figura 13. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida parapsilosis* frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol. Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans ATCC 10231

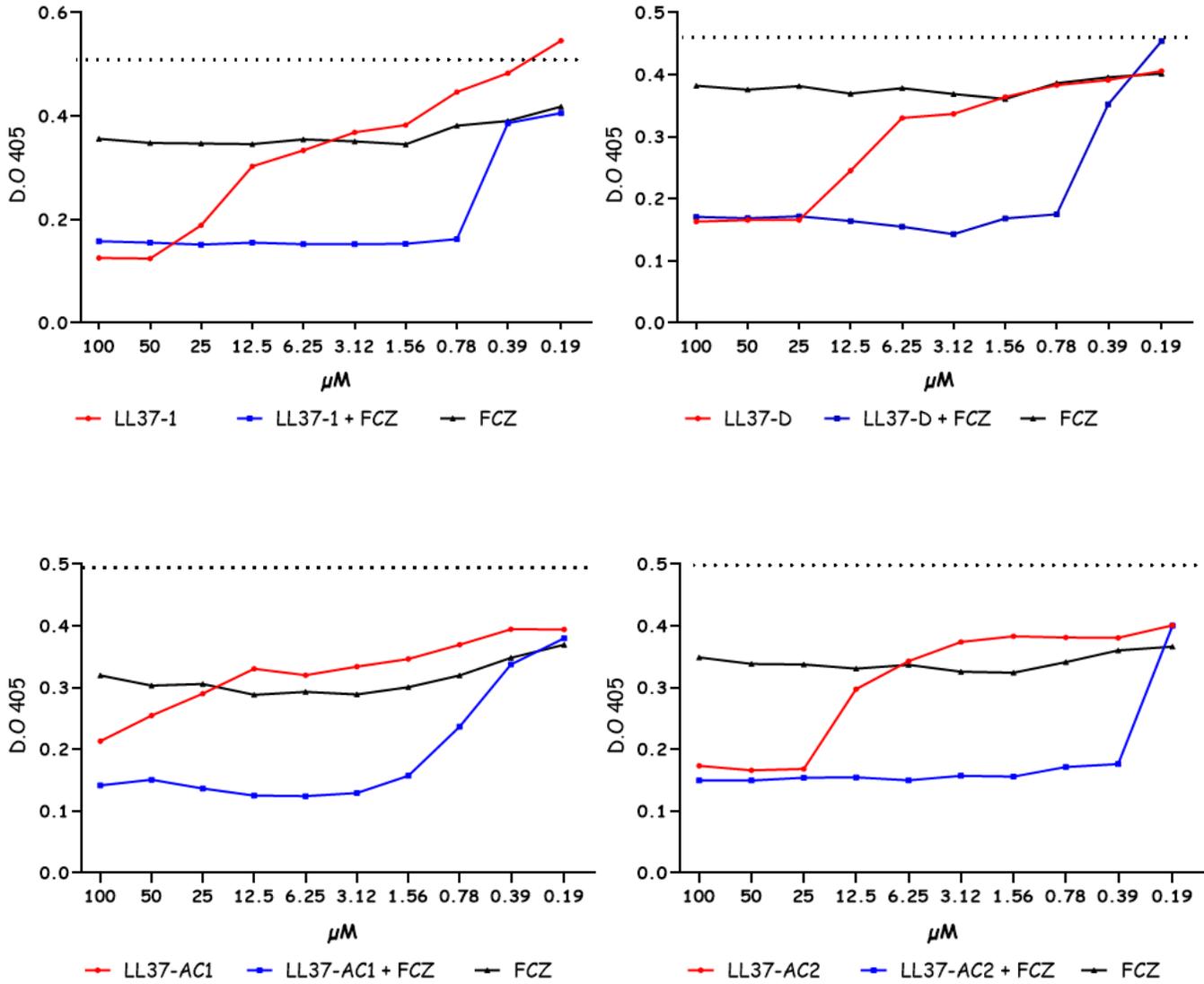


Figura 14. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol. Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 22606108

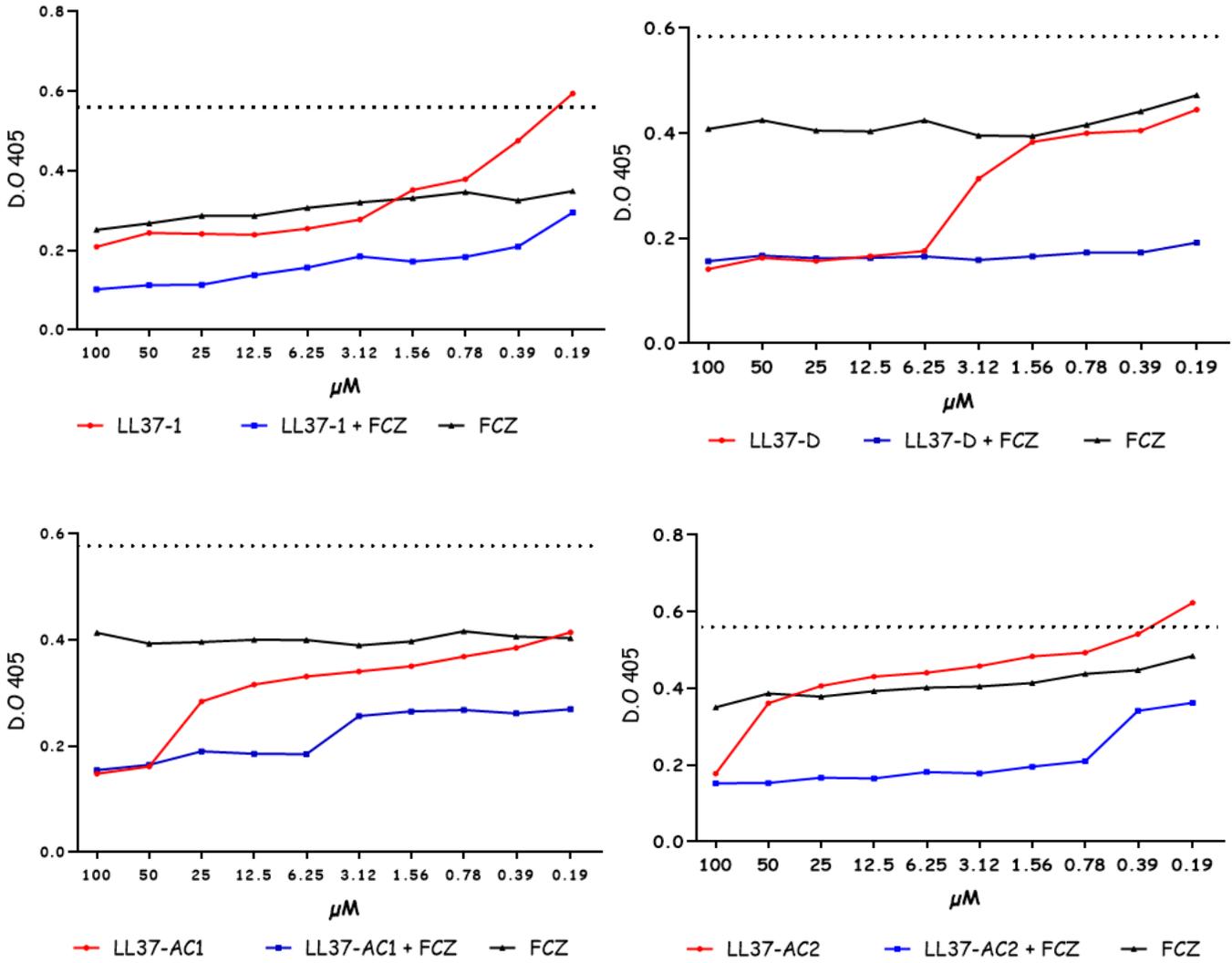


Figura 15. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 22606108 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol. Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 6110

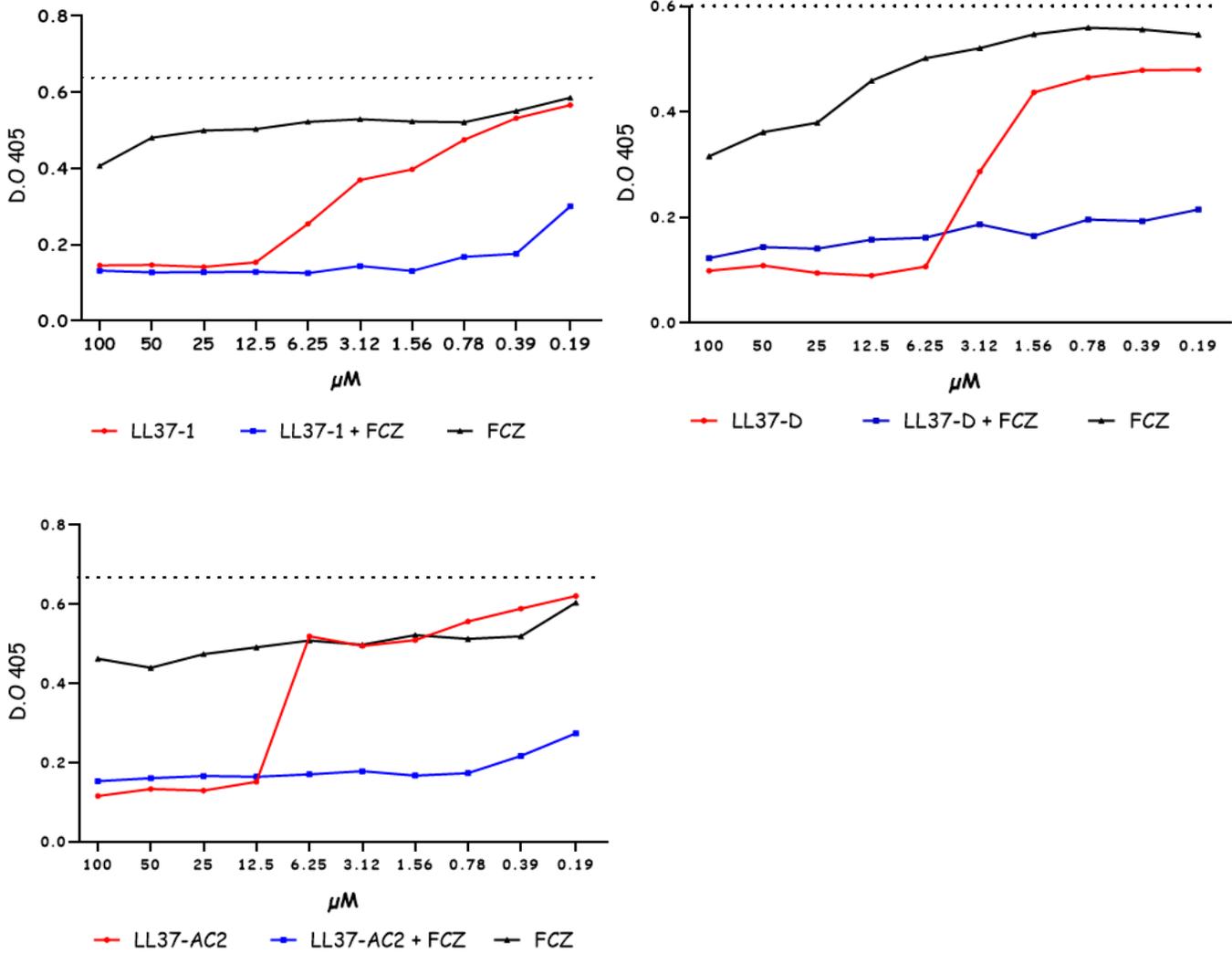


Figura 16. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 6110 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol. Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 5530

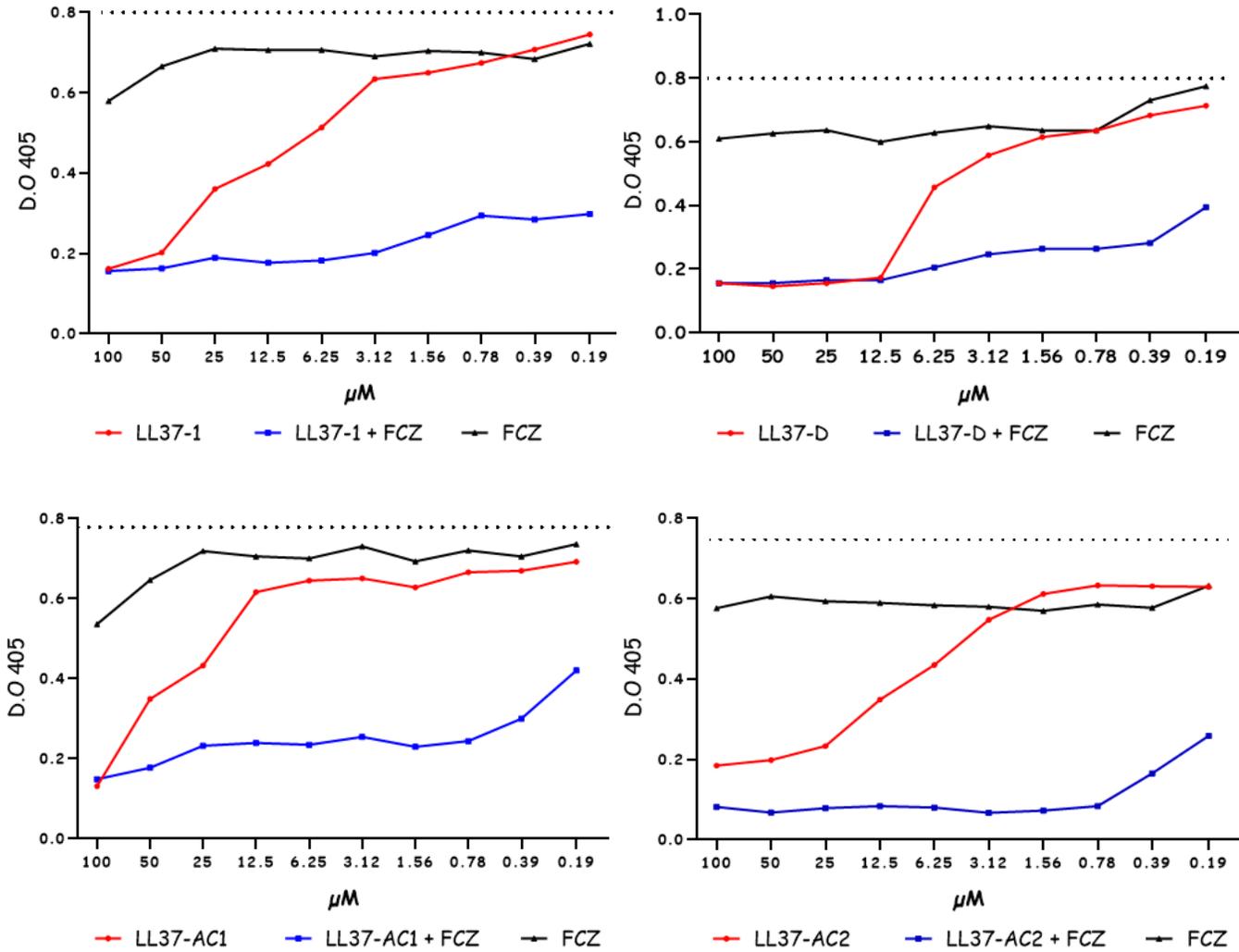


Figura 17. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 5530 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 3773

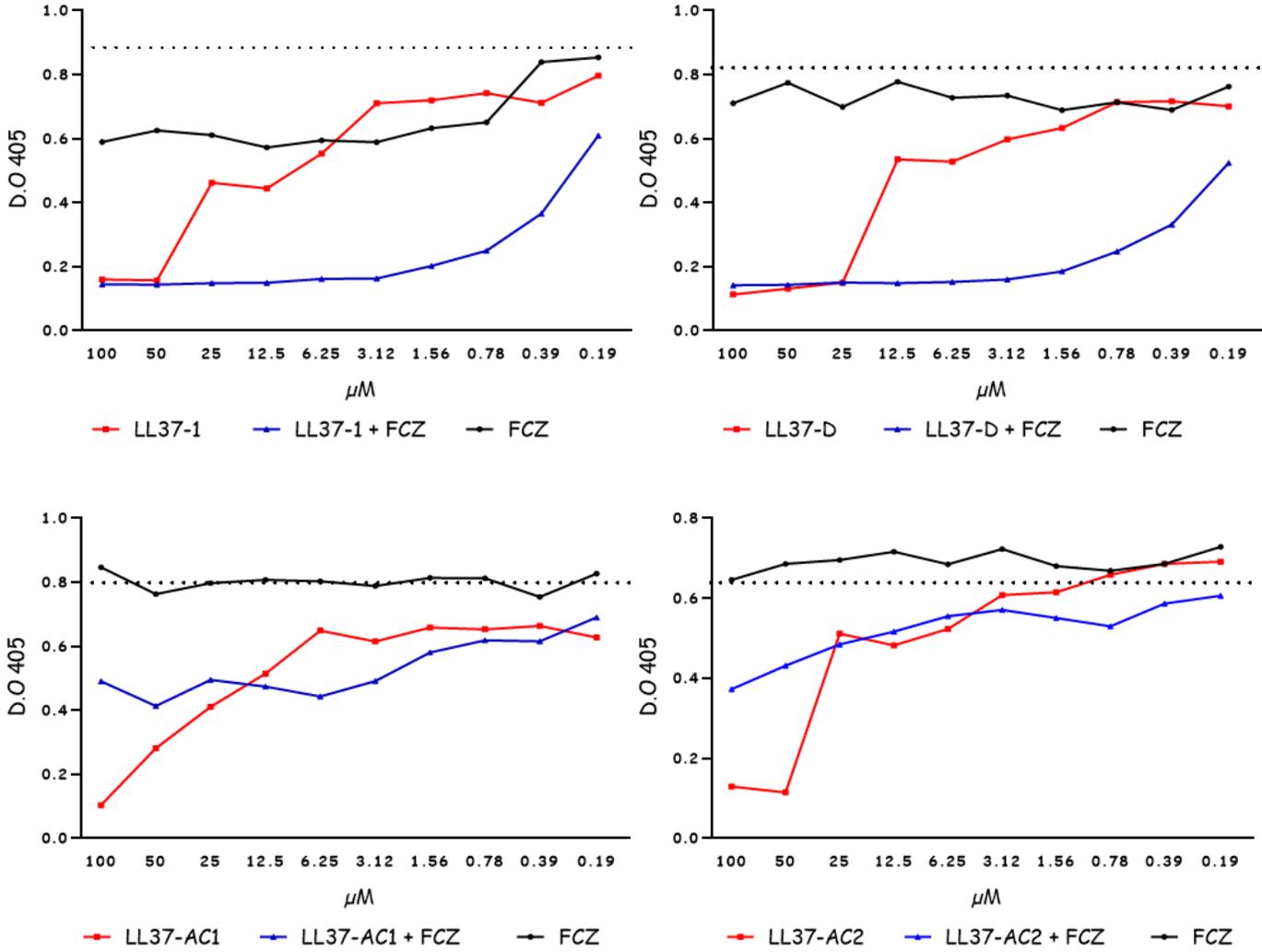


Figura 18. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 3773 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 2230561

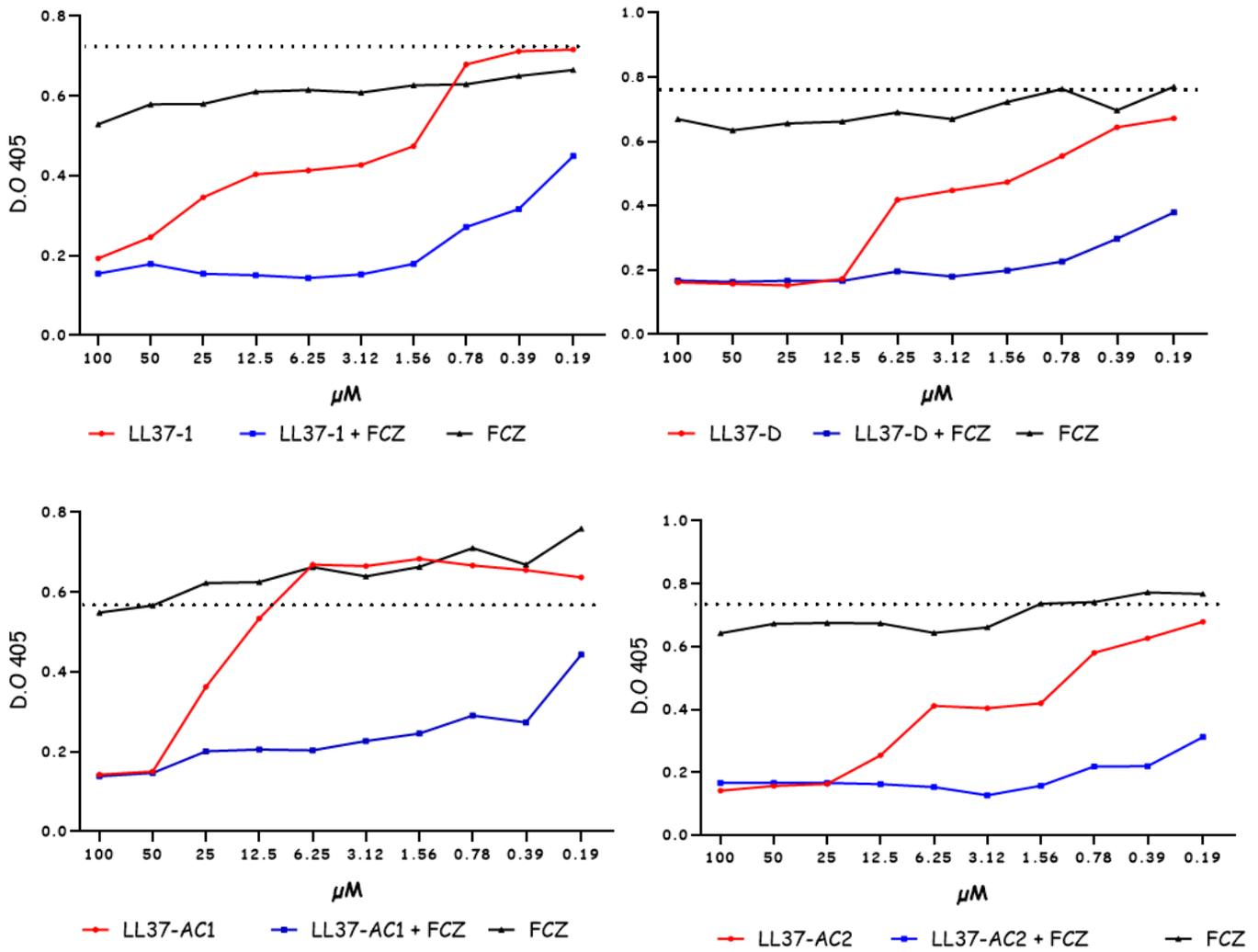


Figura 19. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 2230561 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida tropicalis

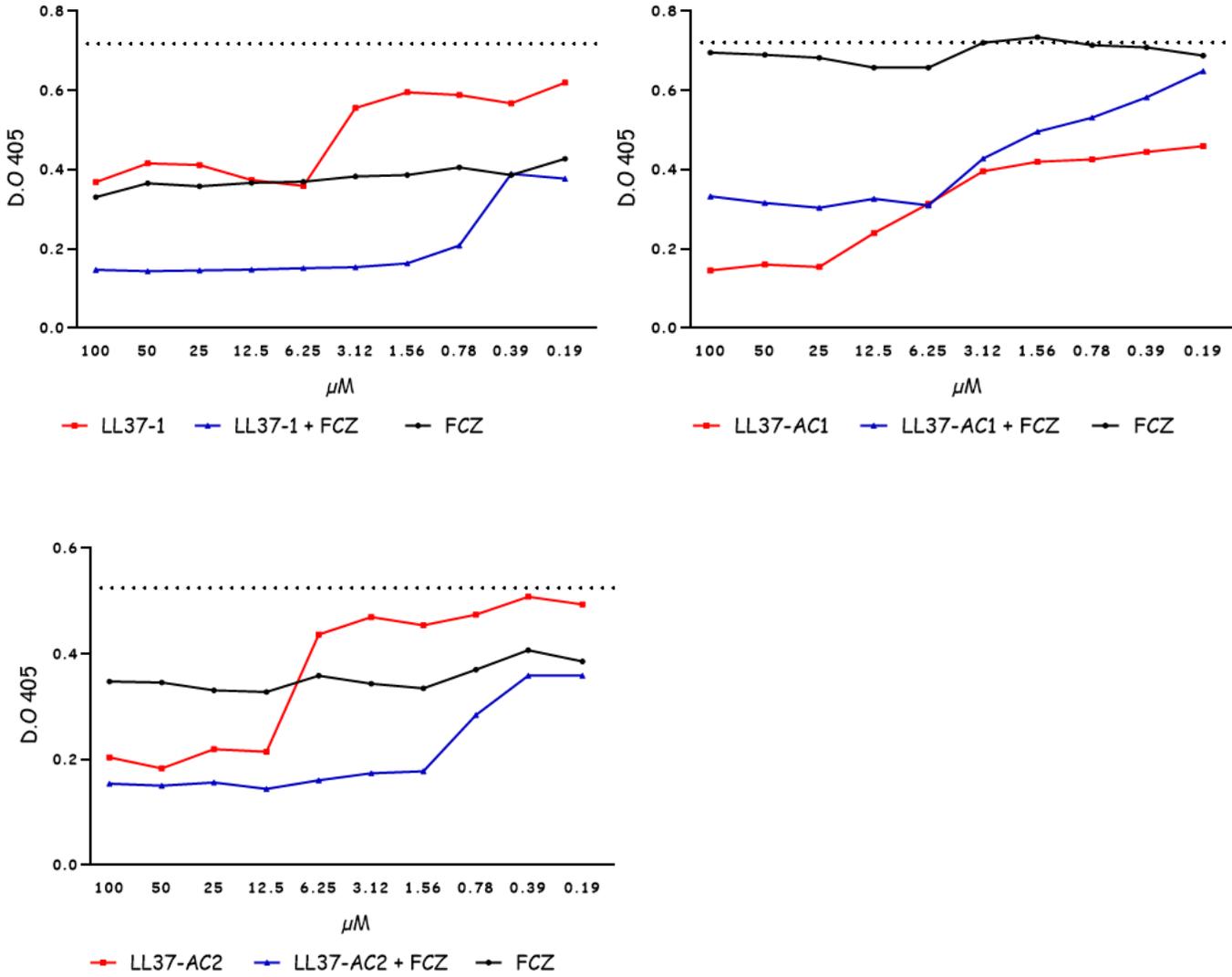


Figura 20. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida tropicalis* frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 181608

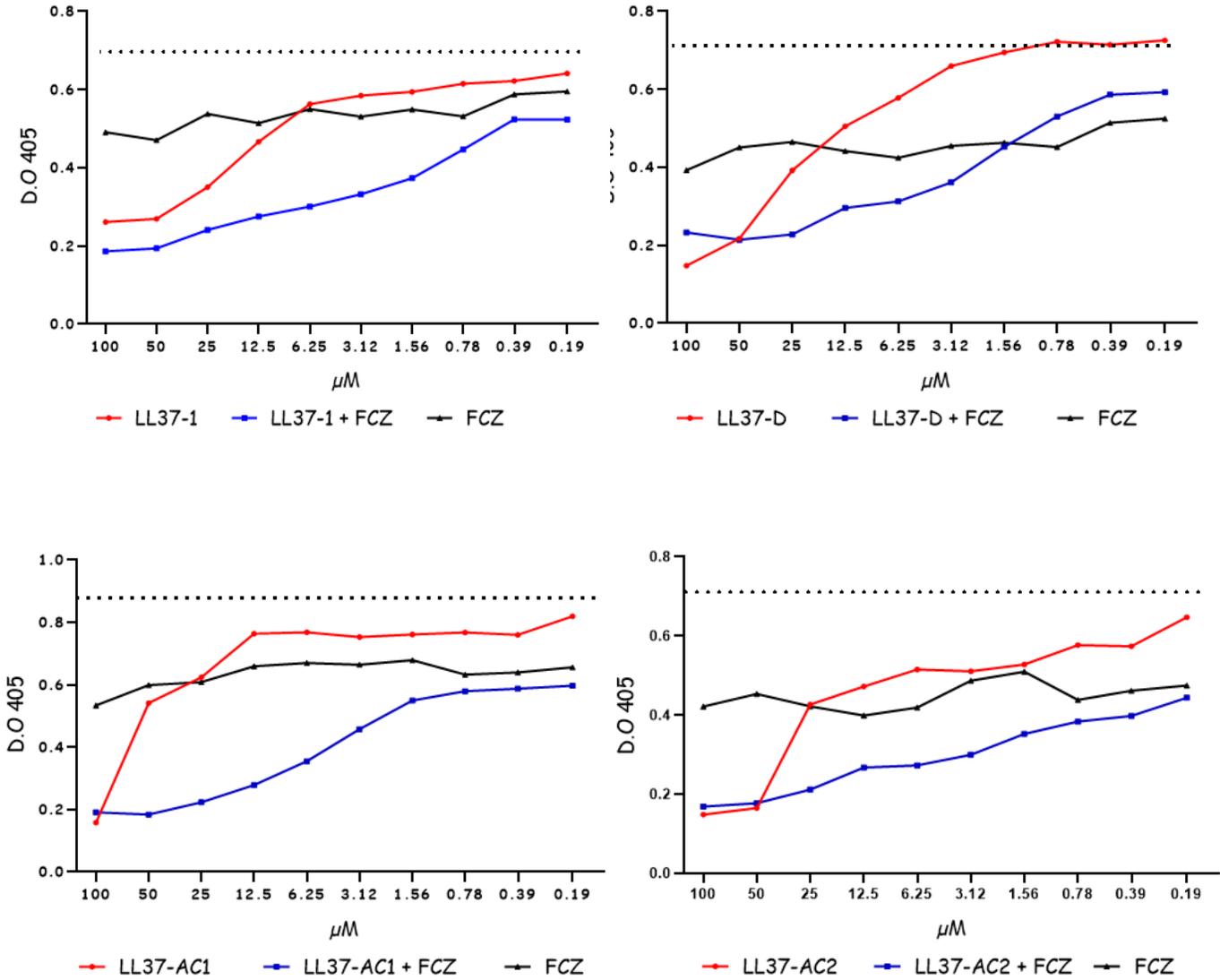


Figura 21. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 181608 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 221749

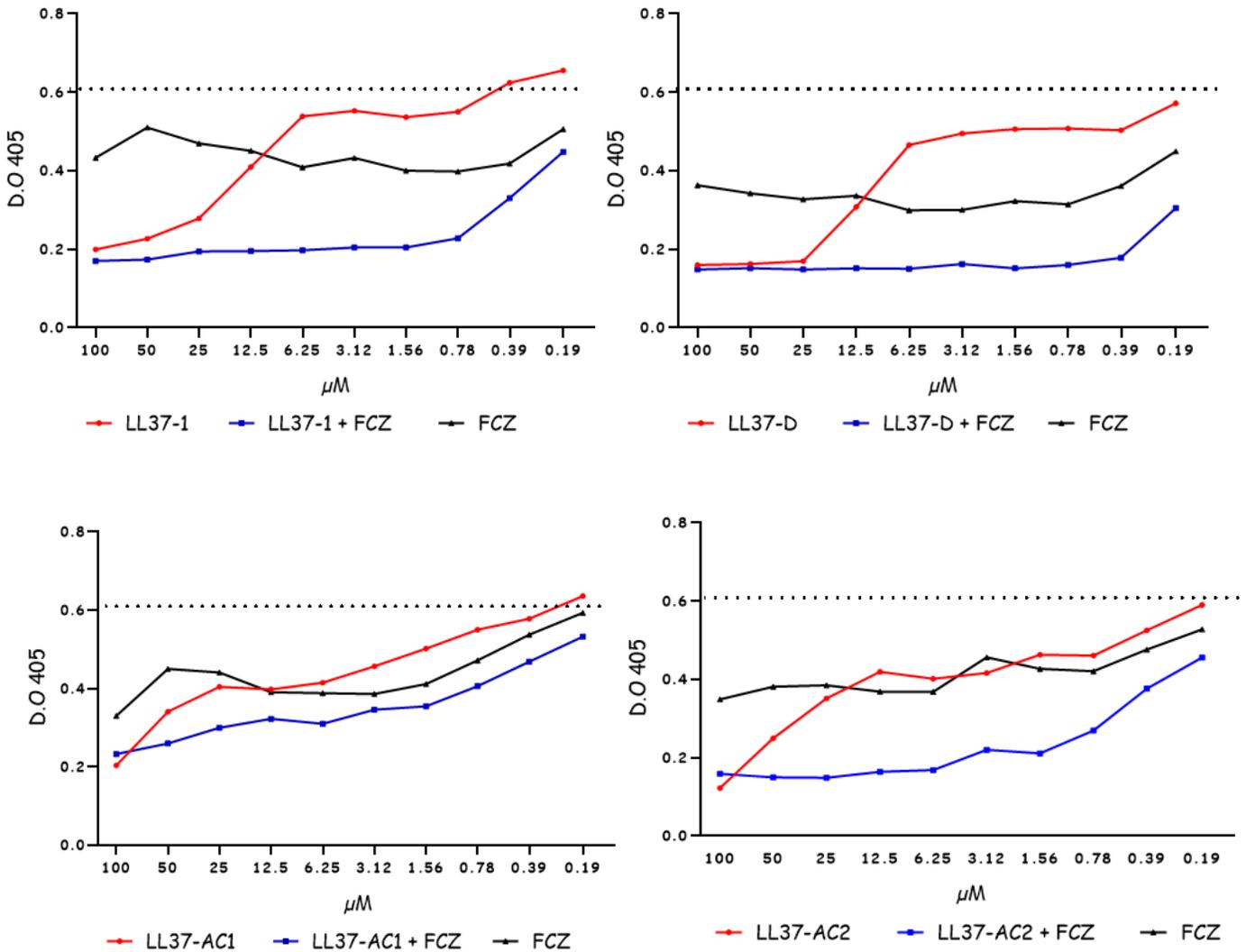


Figura 22. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 221749 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 2532

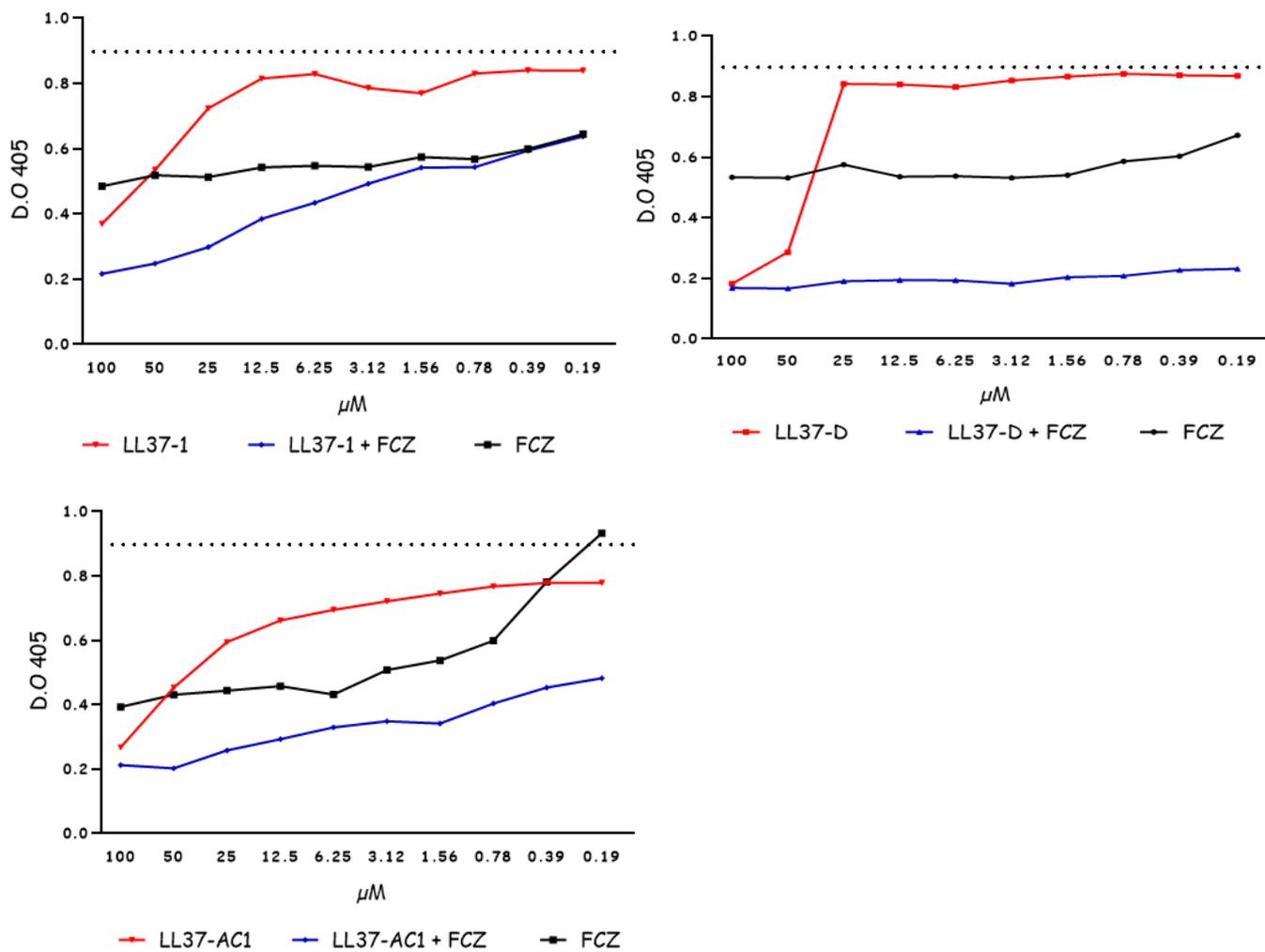


Figura 23. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 2532 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 3251

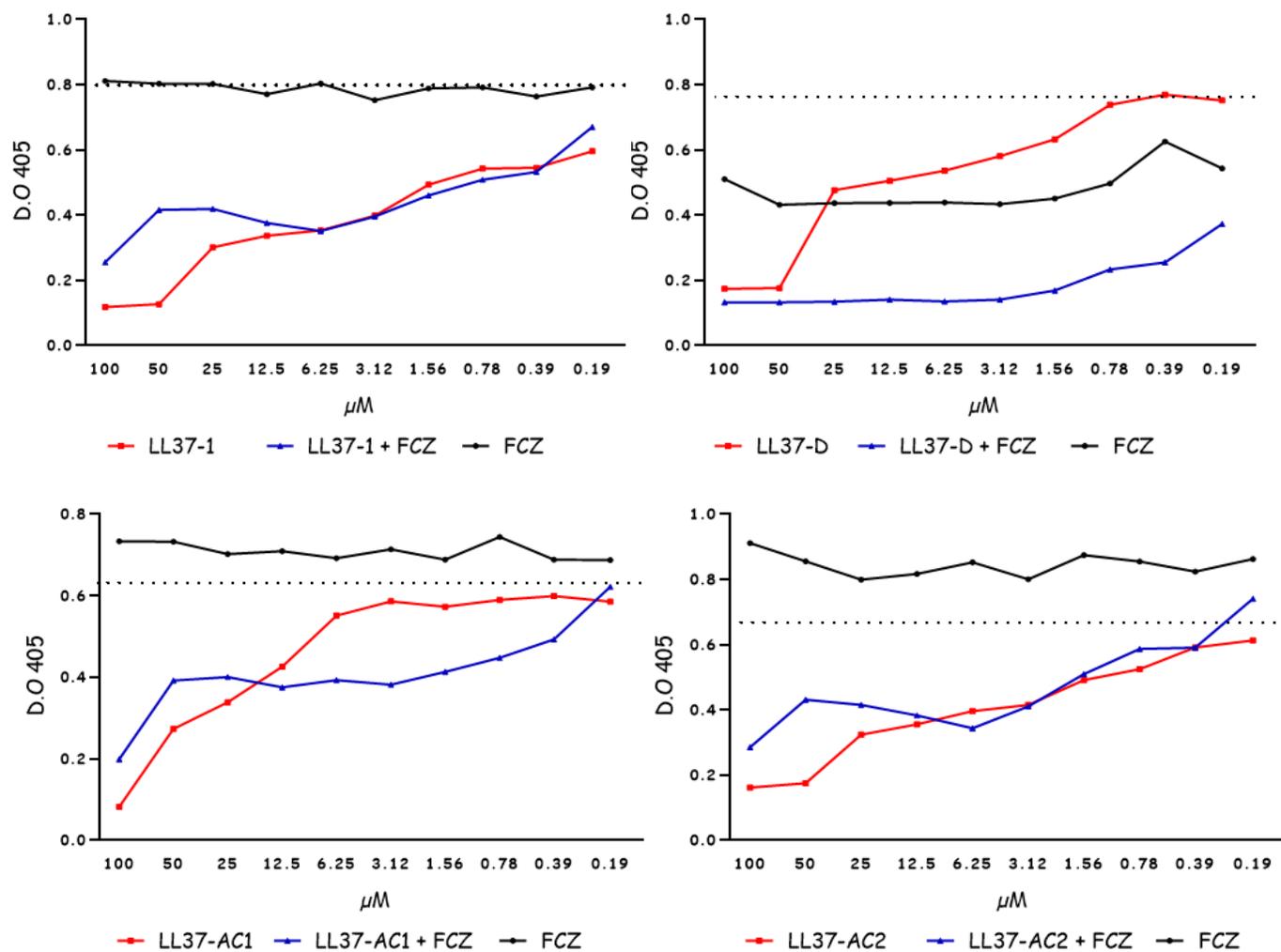


Figura 25. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 3251 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 5221

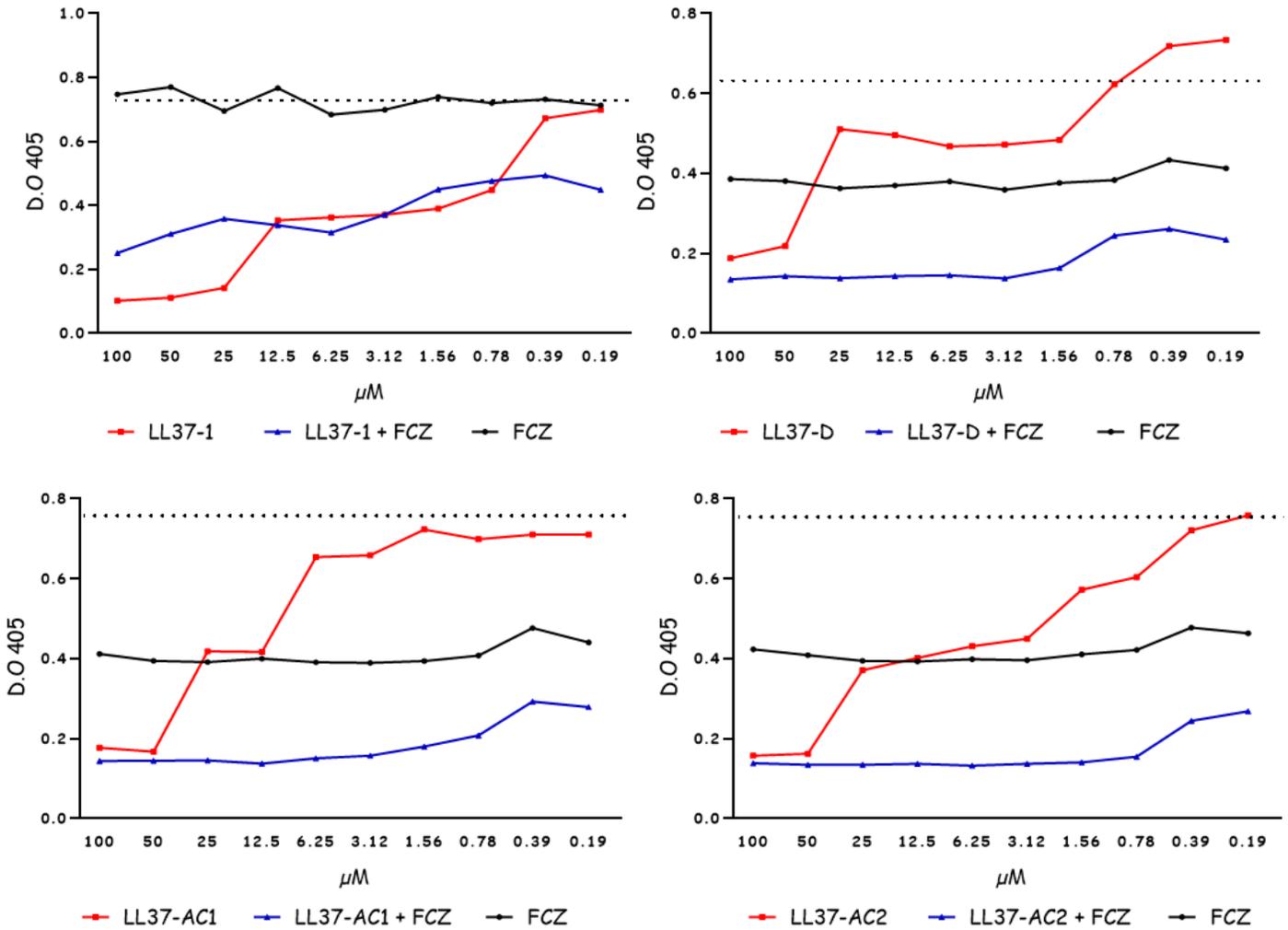


Figura 26. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 5221 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 194

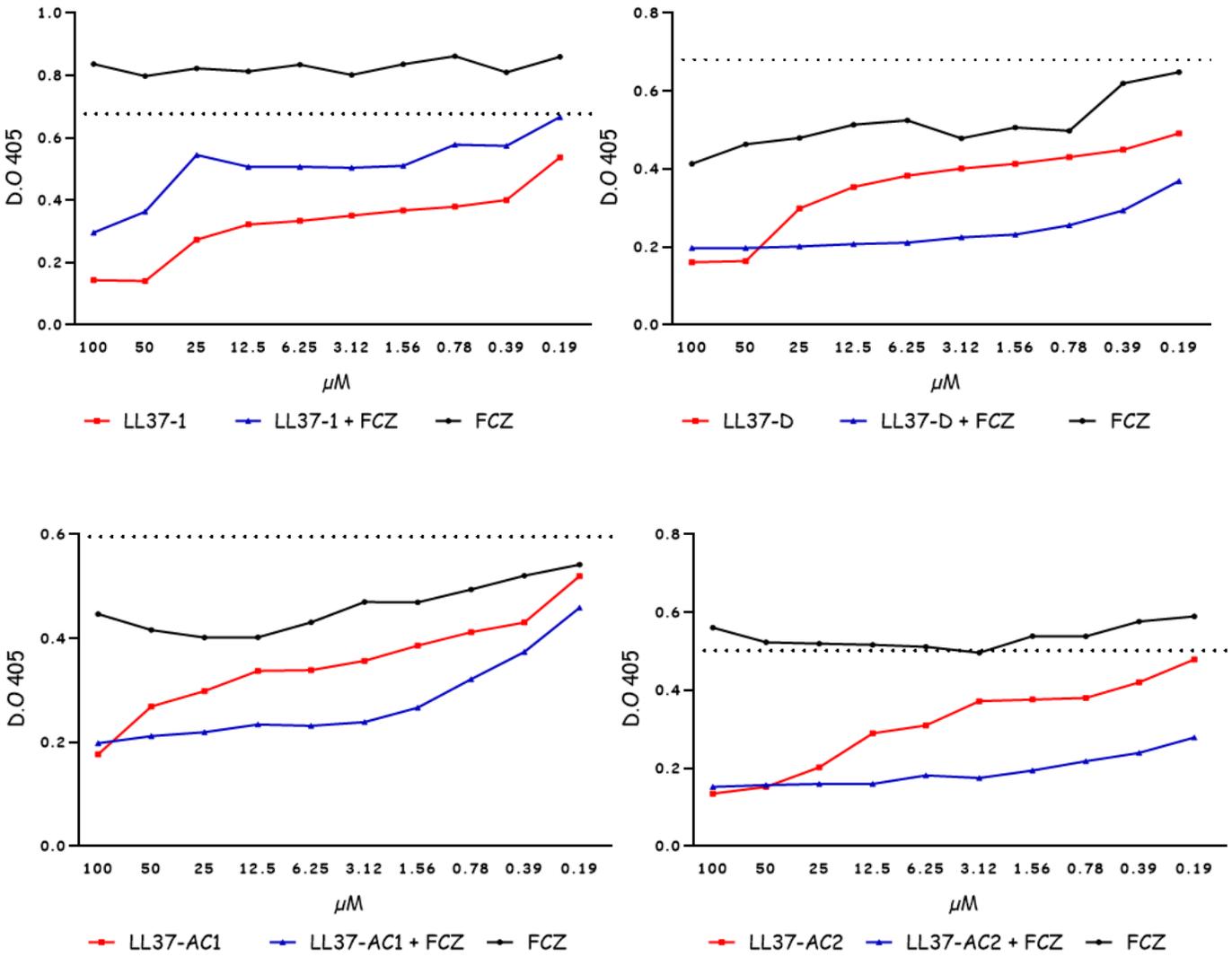


Figura 27. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 194 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 206069

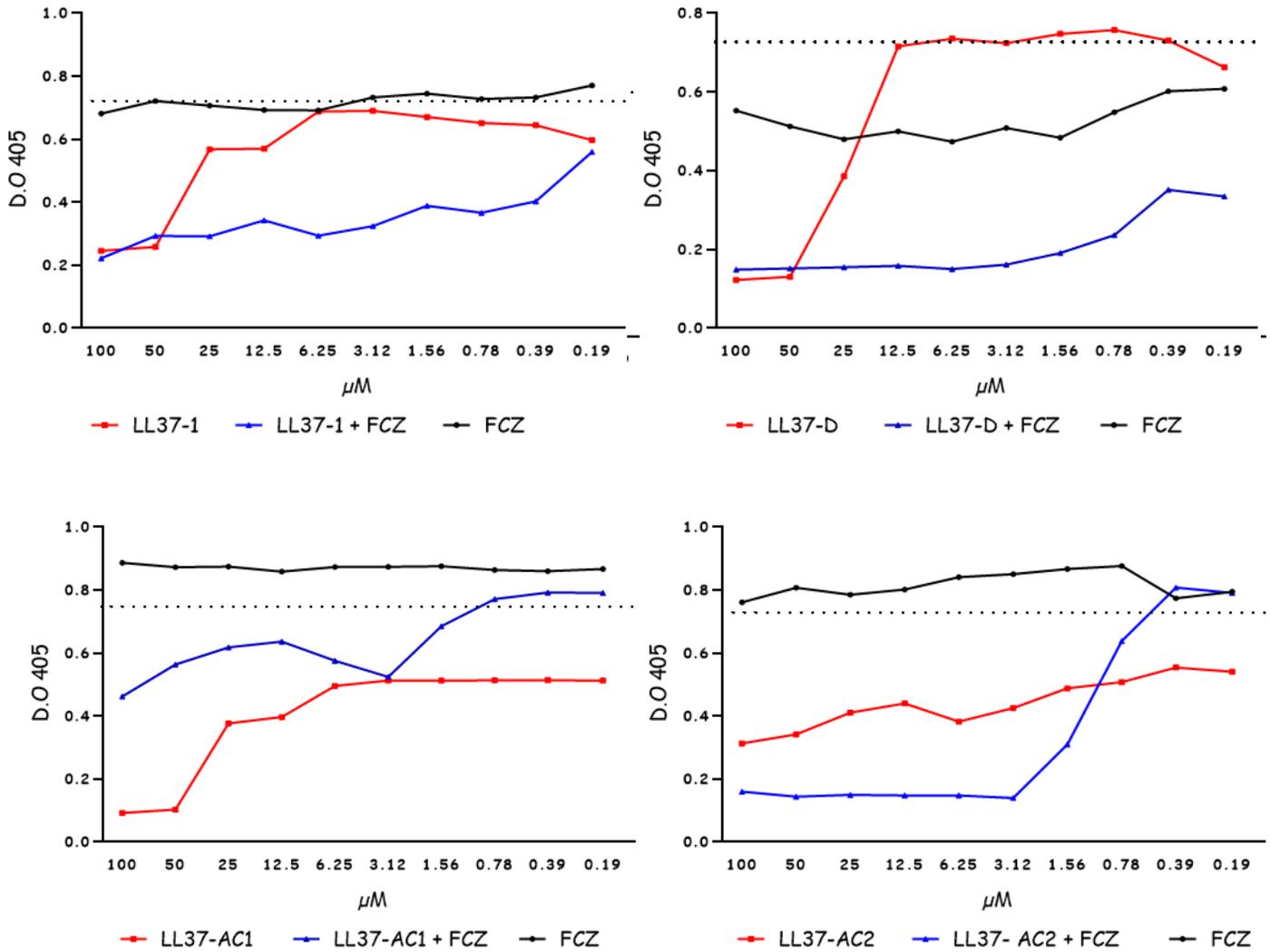


Figura 28. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 206069 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 2272

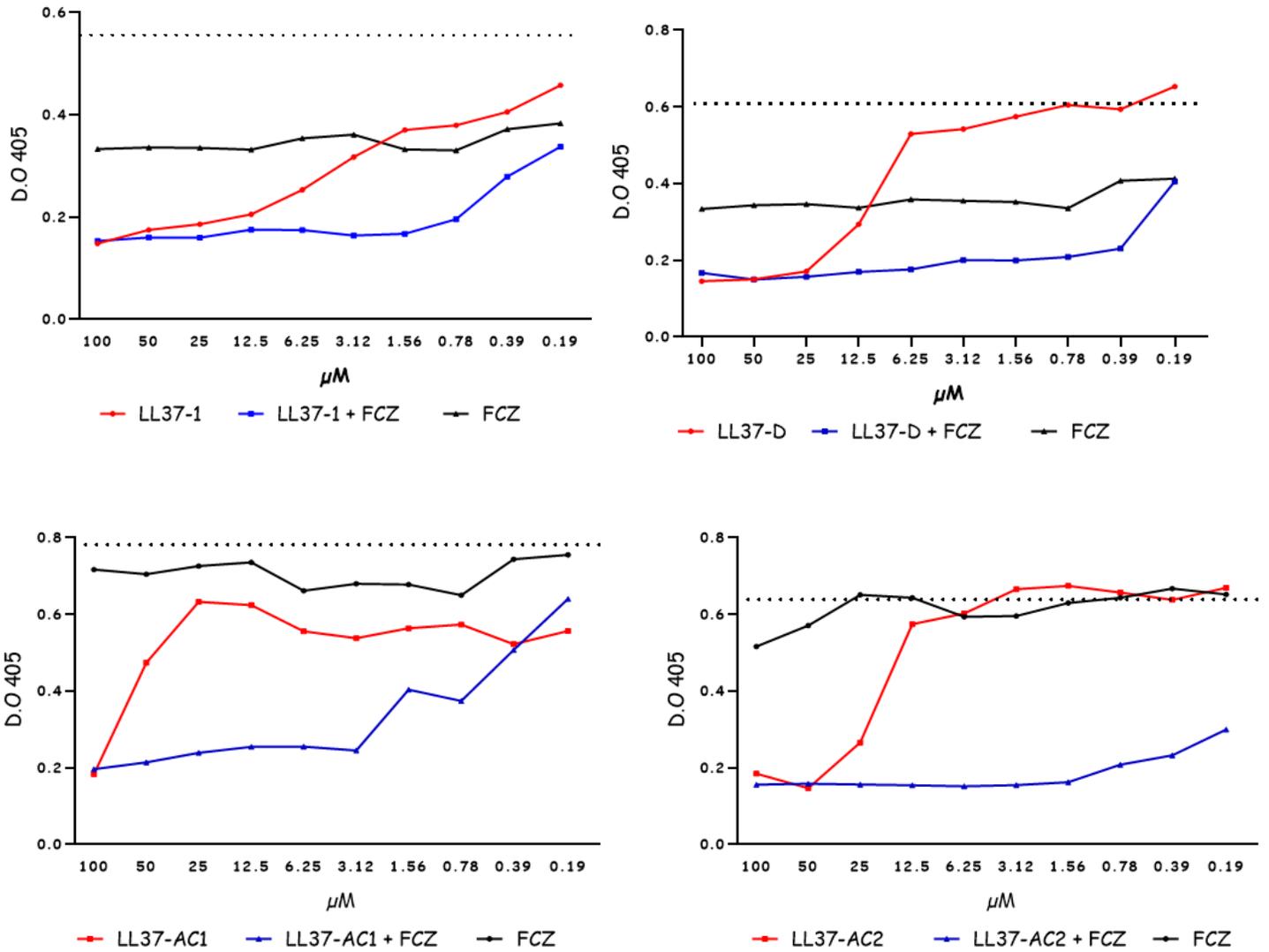


Figura 29. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 2272 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida albicans 1738

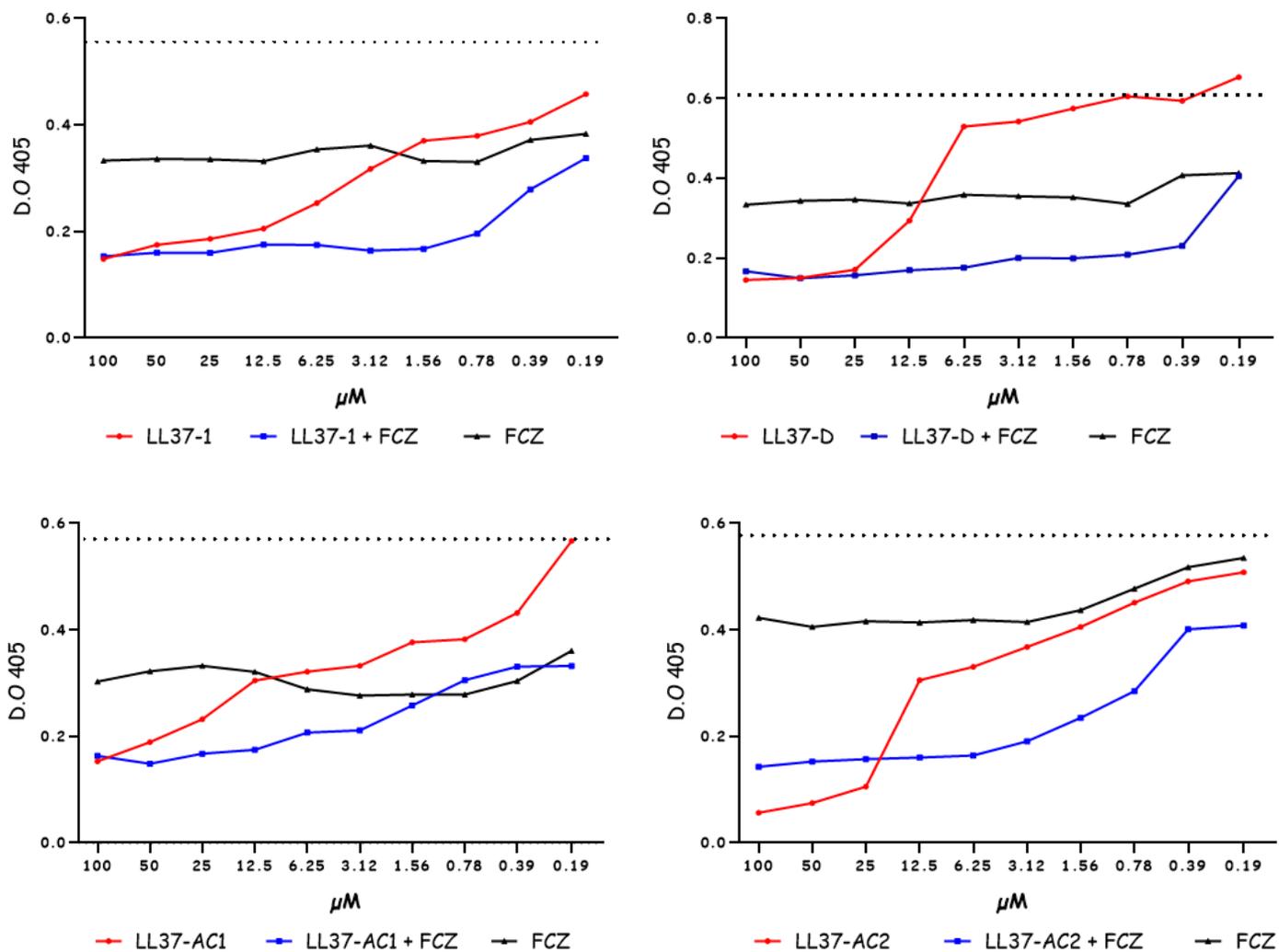


Figura 30. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida albicans* 1738 frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).

Candida Krusei

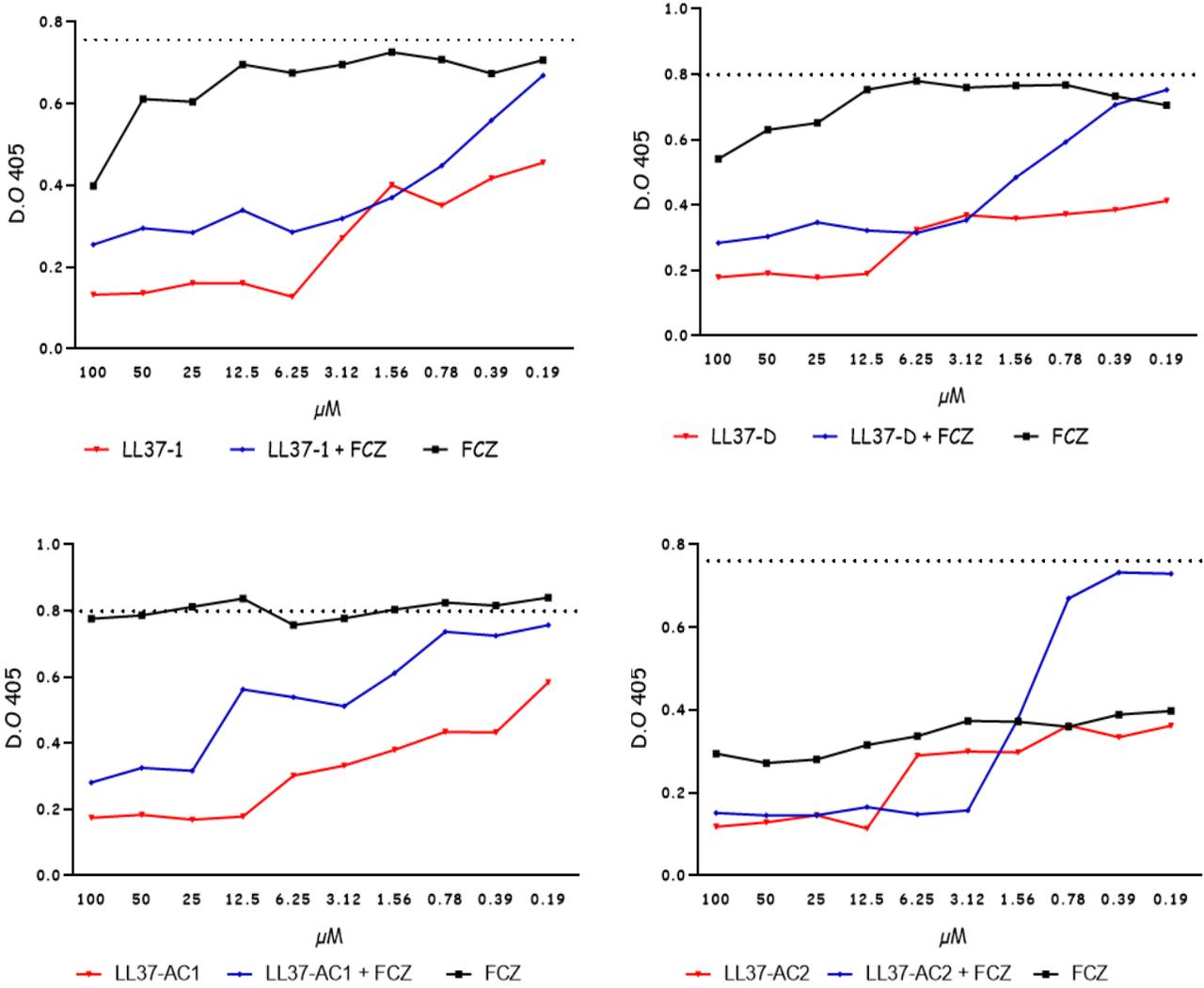


Figura 31. Gráfica de concentración mínima inhibitoria de la levadura *Candida krusei* frente a varias concentraciones de los péptidos análogos al LL37, y en sinergia con varias concentraciones de fluconazol Control (Fase de crecimiento en presencia de fluconazol).