



Evaluación de la actividad anti-Candida de péptidos quiméricos ramificados derivados de Lactoferricina Bovina y Buforina II.

Mateo Márquez Torres

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

Bogotá D.C, 2022



*Evaluación de la actividad anti-Candida de péptidos quiméricos ramificados derivados de
Lactoferricina Bovina y Buforina II.*

Mateo Márquez Torres

Orientador Interno

**MSc. Sandra Mónica Estupiñán Torres.
Profesora Facultad Ciencias De La Salud**

Orientador Externo

**Ph.D. Claudia Marcela Parra Giraldo
Pontificia Universidad Javeriana**

Co-orientador Externo

**MSc. Yerly Vargas Casanova
Pontificia Universidad Javeriana**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

Bogotá D.C, 2022



Evaluación de la actividad anti-Candida de péptidos quiméricos ramificados derivados de Lactoferricina Bovina y Buforina II.

APROBADA: LAUREADO

JURADOS: Edith Del Carmen Hernández Rojas

Luis Eduardo Vargas Díaz

ASESOR INTERNO: Sandra Mónica Estupiñán Torres.

ASESOR EXTERNO: Claudia Marcela Parra Giraldo

CO-ASESOR EXTERNO: Yerly Vargas Casanova

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

Bogotá D.C, 2022

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy gracias a Dios, por conceder el saber, la sabiduría y el impulso requerido día a día, por estar conmigo en momentos de debilidad y dificultad.

En la realización y construcción de este proyecto, participaron personas cuyos esfuerzos, capacidades y conocimientos guiaron a la consolidación de este trabajo de grado y merecen mi más sincera gratitud.

A mi padre y a mi madre, por su compañía, por ser los principales promotores de mis sueños y aspiraciones, gracias por infundir sobre mí el esfuerzo y la dedicación, son factores indispensables para alcanzar las metas, por confiar en mí y por inculcar valores que me han formado como persona. Gracias a mi hermano por ser mi apoyo incondicional durante mi vida.

Agradezco a mis asesores de tesis, las profesoras Claudia Marcela Parra y la Profesora Sandra Mónica Estupiñan Torres, así como un especial agradecimiento a mi co-asesora Yerly Vargas Casanova, por brindar y compartir conmigo la verdadera esencia de la investigación, por su paciencia, dirección, entrega y motivación que encaminaron mis pasos durante el proceso; orientación necesaria para la culminación de este trabajo de grado, gracias por ayudarme paso a paso con sus enseñanzas, cada una de estas las atesoro dentro de mi ser.

Gracias a los integrantes de los grupos de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas y Miosis Humanas y Proteómica de la Universidad nacional de Colombia y la Pontificia Universidad Javeriana, quienes contribuyeron y me acogieron durante mi formación. También agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y su personal docente por forjar mi conocimiento profesional.

Tabla de contenido

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	5
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 Generalidades <i>Candida albicans</i>	10
3.1.1 Patogenia	10
3.1.2 Manifestaciones clínicas	12
3.1.3 Antifúngicos para Candidiasis invasiva	12
3.1.4 Mecanismos de resistencia a antifúngicos	12
3.2 Péptidos antimicrobianos	13
3.3 Lactoferrina Bovina	14
3.3 Lactoferricina Bovina	14
3.5 Buforina I	16
3.6 Buforina II	16
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos	18
5. DISEÑO METODOLÓGICO	19
5.1. Materiales	19
5.1.1 <i>Candida albicans</i> SC5314 (Robin) Berkhout (ATCC® MYA- 2876™)	19
5.1.2 <i>Candida albicans</i> 256 HUSI-PUJ	20
3.2 Hipótesis	21
5.2. Estrategia de trabajo	21
5.3.1 Síntesis y caracterización de los péptidos	22
5.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	22
5.3.3 Concentración Mínima Fungicida	23
5.3.4 Curvas de letalidad	24
5.3.5 Determinación de la actividad hemolítica	24
5.3.6 Ensayo de titulación en tablero de ajedrez	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1 Etapa 1: Microdilución en caldo y CMF	27

6.2 Etapa 2: Cinética de actividad de péptidos quiméricos ramificados	30
6.3 Etapa 3: Efecto hemolítico de los péptidos quiméricos ramificados	34
6.4 Efecto combinado de los péptidos quiméricos ramificados mezclados con fluconazol.....	37
7. CONCLUSIONES	40
6. Referencias Bibliográficas.....	41
Anexos.....	50
Anexo 1. CMI y CMF.....	50
Anexo 2. Actividad hemolítica.....	52
Anexo 3. Titulación en tablero de ajedrez	53

Índice Figuras

	Pag
Figura 1. Secuencia de aminoácidos de LfcinB.....	15
Figura 2. Estructura de los péptidos quiméricos ramificados.....	21
Figura 3. Diseño metodológico.....	22
Figura 4. Ensayo de microdilución en caldo.....	23
Figura 5. Distribución de la caja de Petri para determina la CMF.....	24
Figura 6. Distribución de la placa multipozo para el ensayo de titulación en tablero de ajedrez.....	26
Figura 7. Curva de letalidad de <i>C. albicans</i> SC5314 cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR) ₂ KX R LLR.....	31
Figura 8. Curva de letalidad de <i>C. albicans</i> 256 HUSI-PUJ cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR) ₂ KX R LLR.....	32
Figura 9. Curva de letalidad de <i>C. albicans</i> SC5314 cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR) ₂ KX R LLRLLR.....	33
Figura 10. Curva de letalidad de <i>C. albicans</i> 256 HUSI-PUJ cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR) ₂ KX R LLRLLR.....	33
Figura 11. Porcentaje de hemólisis causados por las distintas concentraciones de los péptidos quiméricos ramificados.....	35
Figura 12. Representación de la microplaca del ensayo titulación en tablero de ajedrez.....	37

Índice Tablas

	Pag
Tabla 1. Descripción de <i>C.albicans</i> SC5314.....	19
Tabla 2. Resumen de las características de las cepas de <i>C.albicans</i>	20
Tabla 3. Valores de CMI y CMF para cada péptido quimérico ramificado y los motivos mínimos de LfcinB y BFII por separado en las dos cepas de <i>C. albicans</i>	27
Tabla 4. Actividad fungicida o fungistática de las quimeras ramificadas sobre dos cepas de <i>C.albicans</i>	34
Tabla 5. Porcentajes de hemólisis con respecto a los valores obtenidos de la CMI en <i>C.albicans</i> SC5314 y 256 HUSI-PUJ.....	36
Tabla 6. Efecto al combinar los péptidos quiméricos ramificados con fluconazol sobre las cepas de <i>C.albicans</i> SC5314 y 256 HUSI/PUJ.....	39

Lista Abreviaturas

Fmoc/tBu	9-Fluorenilmetiloxycarbonil/tertbutilo
ASD	Agar Sabouraud Dextrosa
FDA	Administración de Alimentos y Medicamento
Ahx	Ácido 6-amino-hexanoico
ARG	Arginina
BFI	Buforina I
BFII	Buforina II
CI	Candidiasis invasiva
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMF	Concentración mínima fungicida
GRAS	Categoría Generalmente Considerados como Seguros
FLC	Fluconazol
HUSI-PUJ	Hospital Universitarios San Ignacio Pontificia Universidad Javeriana
LFB	Lactoferrina Bovina
Lfcin B	Lactoferricina Bovina
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
OMS	Organización mundial de la salud
PAMs	Péptidos antimicrobianos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
UCI	Unidad de cuidados intensivos



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) se han considerado como una estrategia de tratamiento antimicótica prometedora, ya que cuentan con baja capacidad para inducir resistencia, poseen varios mecanismos de acción, son de amplio espectro y su combinación con antifúngicos convencionales puede generar efecto sinérgico, sin embargo, como desventajas se encuentra altos costos de producción, fácil degradación proteolítica, toxicidad en células eucariotas y hemólisis sobre los glóbulos rojos. La Lactoferrina Bovina (LfcinB) es un PAM generado tras la hidrólisis proteica de Lactoferrina Bovina (LFB), por su parte la Buforina II (BFII) es un PAM aislado del estómago del sapo *Bufo bufo gargarizans*. Los péptidos mencionados anteriormente se les ha atribuido un gran potencial antimicrobiano.

Con la finalidad de potenciar la actividad antifúngica, se diseñaron y sintetizaron quimeras ramificadas que contienen los motivos mínimos de ambos péptidos (LfcinB: RRWQWR y BFII: RLLR), además se evaluó su actividad hemolítica y el efecto de combinar estas quimeras con fluconazol. Como resultados se obtuvo que el péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR presentó mayor actividad antifúngica (Concentración mínima inhibitoria y fungicida) CMI/CMF 50 µg/mL (15.27 µM) en comparación con la quimera (RRWQWR)₂KXRLLR (CMI/CMF de 100 µg/mL (36.56 µM) contra *C. albicans* sensible y resistente a fluconazol. La quimera (RRWQWR)₂KXRLLR no exhibió actividad hemolítica mientras que (RRWQWR)₂KXRLLRLLR presentó porcentaje de hemólisis de 11.56% a la concentración de la CMI. Con respecto a la combinación de los péptidos quiméricos ramificados junto con fluconazol, se obtuvo sinergia con ambos péptidos cuando se evaluaron frente a *C. albicans* sensible a este antifúngico.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans*, lactoferrina bovina, buforinaII, péptidos antimicrobianos, quimeras.

Estudiante: Mateo Márquez Torres

1. INTRODUCCIÓN

C. albicans se ha descrito como un microorganismo comensal inofensivo que forma parte de la microbiota principalmente del tracto gastrointestinal, genitourinario, cavidad oral y conjuntiva, pero cuando el hospedero presenta complicaciones con el sistema inmune o se generan condiciones que conllevan al desequilibrio de la microbiota, esta levadura puede comportarse como patógeno y provoca desde infecciones superficiales (piel, mucosa de boca y vagina) hasta invasivas y potencialmente mortales en donde casi todos los órganos pueden infectarse después de la diseminación hematológica del hongo (1),(2).

La candidiasis invasiva (CI) es la enfermedad fúngica más prevalente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), representando el 75% del total de las infecciones causadas por hongos, lo cual afecta a cerca de 250.000 personas cada año y se estima que su tasa de mortalidad corresponde al 40%, siendo la candidemia el tipo de infección que más se presenta (3). En países desarrollados como en Estados Unidos, la candidemia representa la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes que se encuentran en UCI (4), así mismo, de las especies del género *Candida*, *C. albicans* se le atribuye un porcentaje cercano al 60% del total de candidiasis genital, oral, cutánea y es la causa más frecuente de CI (5).

En Colombia, particularmente en las UCI, la candidemia es una causa frecuente de infección del torrente sanguíneo y representa el 88% de las infecciones fúngicas en pacientes hospitalizados con una tasa de mortalidad entre 36 y 78%. Colombia reporta una incidencia general de candidemia de 1.18 casos por cada 1000 admisiones a hospitales, mientras que en otros países como Chile es de 0.33, siendo así una de las incidencias más altas en Latinoamérica. Con respecto a la aparición de resistencia a los antifúngicos utilizados para el tratamiento de candidemia, en Bogotá el 30% de los aislados son resistentes a fluconazol, mientras que en Medellín es el 22%, además se espera que estas cifras aumenten progresivamente (6).

Las infecciones fúngicas y especialmente aquellas causadas por *Candida*, han aumentado alrededor del mundo en las últimas décadas, lo cual, está relacionado con el incremento de población susceptible, como pacientes con enfermedad neoplásica, crecimiento exponencial de personas inmunosuprimidas (pacientes VIH positivos), uso prolongado de dispositivos médicos como sondas, catéteres, prótesis y válvulas, sumado al uso excesivo de antibióticos (7).

Por otro lado, en los últimos años se ha demostrado que la efectividad de las moléculas que se utilizan como tratamiento para estas infecciones está disminuyendo, representando un grave

problema al momento de contrarrestar estas enfermedades. Aunque los antifúngicos que se emplean en la clínica parecen ser diversos y numerosos, actualmente solo se disponen de unas pocas clases de estos agentes (azoles, equinocandinas y polienos) para el tratamiento de infecciones superficiales o sistémicas por *Candida* spp (8).

Otro problema importante en el escenario de las micosis oportunistas, es el uso inadecuado de agentes antifúngicos, lo que ha promovido el desarrollo de resistencia a estos fármacos, fomentando la prevalencia de infecciones causadas por patógenos resistentes; este panorama se relaciona con graves consecuencias en cuanto a la morbilidad, mortalidad y costos correspondientes a la atención médica en los hospitales (9). Asimismo, las células fúngicas al ser eucariotas, presentan gran similitud con las células de los mamíferos, semejanzas que van desde la organización de su material genético en cromosomas, hasta organelos citoplasmáticos y rutas biosintéticas similares; dichas similitudes representan una barrera para la terapia fúngica convencional, ya que, al presentar baja selectividad, generan alta toxicidad en el hospedero (10). Todos estos factores en conjunto limitan la segura administración de los antifúngicos y es por esta razón que la búsqueda de alternativas terapéuticas que superen los obstáculos existentes es de gran relevancia para la salud humana.

Adicional a lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que existe una grave falta de opciones terapéuticas y señala que se debe desarrollar urgentemente nuevos antimicrobianos que tengan la facultad para mitigar la amenaza que generan los patógenos multidrogosresistentes (11), así entonces, los PAMs, se han descrito como moléculas promisorias que podrían ser implementados para el tratamiento de infecciones micóticas, debido a que tienen ciertas ventajas con respecto a los antifúngicos tradicionales, especialmente porque presentan menor riesgo de inducir resistencia a fármacos, son de amplio espectro, sus mecanismos de acción son diversos, tienen alta especificidad y afinidad por objetivos intracelulares (12).

No obstante, algunas desventajas que presentan los PAMs están relacionados con su rápida degradación en el organismo y la toxicidad sobre algunas células del hospedero como los glóbulos rojos (13); para disminuir la toxicidad, superar los altos costos de producción, mejorar la estabilidad y potenciar la actividad antimicrobiana de los PAMs, se ha optado por realizar modificaciones en la secuencia nativa, que incluyen reducción de la cadena de aminoácidos, inserción de aminoácidos no naturales, aumentar la polivalencia de la molécula, combinar secuencias de dos o más PAMs (denominados híbridos o quimeras), entre otros, (14) por lo

tanto, este estudio evalúa la actividad antifúngica de péptidos quiméricos ramificados que contienen las secuencias de LfcinB (21-25): RRWQWR y de BFII: RLLR, contra las cepas *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ (15).

A partir de la problemática anterior, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué susceptibilidad muestran las cepas de *Candida albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ en respuesta al co-cultivo con diferentes péptidos quiméricos ramificados que contienen secuencias de LfcinB y BFII?

2. ANTECEDENTES

Existen múltiples barreras que restringen el uso adecuado de los antifúngicos dentro de la práctica clínica, esto debido a que presentan problemas de seguridad, toxicidad, eficacia y resistencia, como por ejemplo: la anfotericina B, ocasiona toxicidad renal aguda después de su administración prolongada y por otro lado, el fluconazol e itraconazol exhiben baja susceptibilidad contra algunas levaduras, son fungistáticos y ocasionan hepatotoxicidad (16). En este orden de ideas, los esfuerzos que se están realizando en la actualidad para encontrar moléculas con actividad antifúngica están encaminados a generar agentes que superen las limitaciones con las que cuentan los antifúngicos convencionales.

En este escenario, los PAMs toman protagonismo como novedosos agentes terapéuticos; estas moléculas son cadenas polipeptídicas cuyo tamaño generalmente es inferior a 60 residuos de aminoácidos, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas desde los organismos más simples como bacterias, hasta los más complejos como los animales vertebrados e invertebrados, y se han descrito como componentes clave del sistema inmunológico innato proporcionando protección contra patógenos invasores (17).

Los PAMs, son considerados como una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas porque presentan propiedades terapéuticamente importantes, dentro de las cuales destaca su amplio espectro de actividad contra hongos, bacterias, virus y parásitos, además se ha demostrado que algunos péptidos no son afectados por los mecanismos de resistencia con los que ya cuentan algunos microorganismos patógenos (10)(18), sin embargo, pese a los grandes avances en el conocimiento acerca de los PAMs, aún existen grandes desafíos que superar para lograr su correcta administración dentro de la práctica clínica. Dentro de los principales inconvenientes asociados al uso de PAMs se destaca su inestabilidad estructural, debido a que los péptidos son el objetivo de numerosas enzimas localizadas tanto en tejidos y fluidos corporales del hospedero como producidas por los microorganismos invasores, otros problemas relacionados con el uso de PAMs es la toxicidad que genera en células eucariotas al causar hemólisis y nefrotoxicidad, y su biodisponibilidad en algunas partes del cuerpo es bastante baja (13).

La LFB es una proteína presente en las distintas secreciones (luche, orina, saliva) de los bovinos; la hidrólisis de esta molécula causada por la pepsina gástrica produce un hidrolizado donde se destaca el péptido LfcinB, cuya secuencia de aminoácidos es FKRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF, por su parte el motivo mínimo de actividad

antimicrobiana dentro de la secuencia de LfcinB corresponde a la secuencia ²⁰RRWQWR²⁵ (19). La actividad antifúngica de la LFB está relacionada principalmente con su capacidad para unir y secuestrar hierro del medio, mientras que la apolactoferrina (variante de LFB sin hierro), puede eliminar tanto a *C. albicans* como a *C. krusei*, alterando la permeabilidad de su superficie celular (20).

En el estudio de Kuipers et al (21) se comparó la actividad antifúngica de la LFB y apolactoferrina bovina en aislados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, donde ambas moléculas exhibieron actividades equivalentes dentro del rango de 0.5 a 100 mg/mL para todas las especies de *Candida* evaluadas, adicionalmente, el efecto combinado de LFB con los azoles, demostró que usando 50 µg/mL de fluconazol junto con 10 mg/mL de LFB se inhibe completamente el crecimiento de *C. albicans*, mientras que las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) para cada uno por separado fue de 156 µg/mL y 31 mg/mL respectivamente, se observa entonces, que se disminuye la concentración que se necesita para inhibir al hongo cuando se utiliza la terapia combinada. Fernandes KE et al (22), evidenciaron que diferentes LFB (LF-S, LF-D1 y LF-D2) provenientes de lecherías o empresas, es activo contra una amplia variedad de levaduras incluyendo *Clavispora lusitaniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus gattii*, entre otros, al observarse CMIs en un rango entre 8 a 64 µg/mL.

También se ha evaluado en múltiples ocasiones la actividad antifúngica de la LfcinB, como en la investigación desarrollada por Wakabayashi et al (23) donde se muestra el resultado de exponer LFB y LfcinB contra diferentes cepas ATCC y aislados clínicos de *C. albicans* sensibles y resistentes a fluconazol e itraconazol, obteniendo como resultado, CMI más bajas (40-200 µg/mL) para las cepas resistentes a los azoles en comparación con las cepas sensibles a estos antifúngicos (400 µg/mL) en ambos casos; el mismo autor describió que en las cepas de referencia *C. albicans* y *T. mentagrophytes* se obtuvo CMIs de 25 y 12 µg/mL en caldo a base de peptona cuando se expone a la LfcinB (19). Secuencias análogas a LfcinB como LfcinB15, fragmento de los residuos 1-15 de LfcinB (posiciones 17-31 de LFB) cuya secuencia es FKRRWQWRMKKLG-NH₂, mostró CMIs de 6.25–12.5 µg/mL, en aislados clínicos y cepas de referencia de *C. albicans*, 6.25-12.5 µg/mL en *C. krusei*, 3.125-6.25 µg/mL en *C. tropicalis* y > 50 µg/mL en *C. tropicalis*, así mismo se identificó que LfcinB15 no solo exhibe actividad lítica sobre las membranas, sino que es capaz de acoplarse en vacuolas en el interior de las células e induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provoca

estrés oxidativo y daña componentes vitales de las células, causando la muerte de la levadura(24).

Quimeras peptídicas que contienen fragmentos de LfcinB se han diseñado y sintetizado con la finalidad de aumentar el potencial antifúngico y reducir el efecto hemolítico en comparación con las secuencias analizadas por separado, como lo demuestra la investigación de Feng et al, donde se sintetizó un péptido quimérico recombinante entre LfcinB (1-15) y Tanatina (4-21) denominado LFT33, y determinaron su potencial antimicrobiano tanto en bacterias Gram positivas y Gram negativas (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) como en levaduras (*C. albicans*), donde el valor de IC50 (concentración más baja del péptido que reduce el crecimiento en más de un 50%) se encuentra entre 16 – 32 g/mL para bacterias y en *C. albicans* el IC50 es de 64 g/mL, mientras que la LfcinB por si sola muestra valores de IC50 entre 16-64 g/mL en bacterias y en la levadura corresponde a 128 g/mL, lo que sugiere que LFT33 presenta mayor actividad en bacterias y en hongos en comparación que la LfcinB por sí sola, así mismo LFT33 no es tóxico para los glóbulos rojos debido a que no mostró actividad hemolítica a altas concentraciones (256 µg/mL)(25).

En otro estudio Xi et al (26), diseñaron y expresaron el péptido quimérico LHP7 en *Pichia pastoris*, la secuencia de esta molécula consta de 83 aminoácidos que abarcan variaciones de tres péptidos distintos (plectasina, LfcinB y proteína ribosómica L1 de *Helicobacter pylori*) unidos a través del enlazador de glicinas y serinas; LHP7 arrojó valores de CMI en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* de 5.83 µM, mientras que para el péptido plectasina es >29.09 µM, disminuyendo la concentración a más del doble la CMI para el péptido quimérico, por otro lado LHP7 presentó actividad hemolítica inferior al 3.5% a la concentración de 8 µg/mL y se mantuvo el porcentaje de hemólisis inferior al 5% a medida que las concentraciones aumentaron hasta 1000 µg/mL, lo cual demuestra que LHP7 presenta actividad antifúngica mejorada en comparación de los péptidos del cual se originan, manteniendo niveles de citotoxicidad bajos sobre los glóbulos rojos.

Distinto a los PAMs que generan perturbaciones directas sobre la membrana celular como es el caso de LfcinB, se han descrito PAMs que poseen mecanismos de acción alternos como el planteado para la buforina 1 (BFI), el cual transloca los ácidos nucleicos impidiendo procesos celulares fundamentales como la producción de proteínas. BFI presenta gran homología con los residuos amino-terminales de la histona H2A de las células gástricas del sapo *Bufo bufo gargarizans*, lo que le confiere afinidad de unión al ADN (27). BFI ha demostrado poseer

efecto fungistático a concentraciones de 8 µg/mL, mientras que a una concentración de 16 µg/mL alcanza un efecto fungicida en *A. oryzae* y *Rhodotorula glutinis*, este péptido también genera sinergia cuando se co-cultiva con nisina, arrojando valores de ICIF (índice de concentración inhibitoria fraccional) de 0.375 en *A. oryzae* (28).

La buforina 2 (BFII) es un péptido derivado de la BFI que se genera después de la digestión con la endoproteinasa Lys-C, dando como resultado la siguiente cadena de aminoácidos TRSSRAGLQWPVGRVHRLLRK, este péptido ha mostrado mayor actividad antimicrobiana que el péptido del cual se origina, así mismo, dentro de la secuencia de BFII el motivo mínimo de actividad antimicrobiana corresponde al fragmento RLLR (29). La BFII ha reportado tener actividad antimicótica tanto para hongos filamentosos como en levaduras al presentar valores de CMI entre 8-16 µg/mL para las cepas de referencia de *Fusarium oxysporum* y *Pyricularia oryzae*, mientras que para *C. albicans* y *C. neoformans* la CMI se encuentra dentro en el rango de 16-32 µg/mL (30).

En otro estudio se aprecia la inhibición completa de *Malassezia furfur* durante las primeras 24 h a concentraciones de 50 µM y 100 µM de BFII, y su efecto empieza a disminuir entre las 48 h y 72 h donde el hongo retoma su desarrollo normal. (31)

Park et al (32), describieron la actividad antimicrobiana de péptidos análogos a la BFII como por ejemplo la cadena polivalente del motivo mínimo (RLLR)₅, repetición de tres veces la secuencia (RVHRLLR)₃ y quimeras como BFII (5-13) - MG (1-14) compuestas de BFII y magainina II, en donde la CMI de la BFII en *C. albicans*, *C. neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae* es de 1 µg/mL, mientras que para el péptido (RLLR)₅ en las tres levaduras es de 8 µg/mL, en el caso de la secuencia (RVHRLLR)₃ corresponde a >256 µg/mL y para la quimera BFII (5-13) - MG (1-14) es 4 µg/mL, arrojando la mayor actividad la secuencia completa de BFII, por su parte el péptido BFII (5-13) - MG (1-14) penetra fácilmente la membrana celular y se acumula en el citoplasma, donde se estima que realiza su efecto antimicrobiano.

BFIIIc, un péptido análogo a la BFIIb (RAGLQFPVGRLLRLLRLLR) cuya secuencia de aminoácidos corresponde a KLLKQWPIGKLLKLLKLLK, presenta mejor actividad antifúngica en *C. albicans*, *C. neoformans* y *S. cerevisiae* en comparación del péptido del cual se origina al arrojar valores de CMI de 1 µg/mL en las tres levaduras, por otro lado BFIIb muestra porcentajes de hemólisis del 11.5% y eliminó al 35.8% de células de fibroblastos humanos a 200 µg/mL, mientras que BFIIIc fue completamente inactivo en glóbulos rojos y

en células de fibroblastos humanos, concluyendo que modificaciones de BFIIc potencia la actividad antifúngica y disminuye su citotoxicidad en células humanas (27).

Previamente en el grupo de investigación de Micosis Humanas y Proteómica (MICOH-P) y el grupo Síntesis y Aplicación De Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Pontificia Universidad Javeriana y de la Universidad Nacional de Colombia respectivamente, se demostró que modificaciones del motivo de la LfcinB pueden potenciar la actividad antibacteriana y antifúngica comparado con la secuencia nativa, como es el caso del péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal}: RWQWRWQWR, y péptidos monoméricos, diméricos, tetraméricos y cíclicos que contienen el motivo RRWQWR (15),(33).

También dentro de los grupos de investigación mencionados anteriormente se han diseñado y evaluado péptidos quiméricos lineales que poseen secuencias cortas derivadas tanto de LfcinB como de BFII, las cuales corresponden al motivo mínimo de LfcinB: RRWQWR, y los motivos palindrómicos BFII: RLLR y RLLRLLR, estos segmentos se unieron por medio del espaciador ácido 6-amino-hexanoico (Ahx), dando como resultado quimeras como: RLLRLLR-Ahx-RRWQWR, que presenta CMI's entre 6 – 23 μ M en *E.coli* y *P. aeruginosa*, mientras que para *S. aureus* y *E. faecalis* la CMI es de 46 μ M, estas CMI's son más bajas en comparación con los péptidos nativos individuales (91-222 μ M), así mismo los péptidos quiméricos lineales presentaron actividad hemolítica disminuida (entre 2-13%) en contraste con el motivo mínimo de Lfcin B, BFII y el palíndromo RLLRLLR de BFII (1-63%) (34).

La actividad antifúngica de las quimeras lineales mencionadas anteriormente se determinó en *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. auris* en donde la quimera que posee el motivo mínimo de la LfcinB en la cual se sustituyeron las Argininas (R) por Lisinas (K) junto con el palíndromo de la BFII (RLLRLLR) presentó la mayor actividad al arrojar valores de CMI entre 50 μ g/mL (24 μ M) y > 200 μ g/mL (96 μ M) respectivamente(35). Se ha descrito que la ramificación, repetición y aumento (polivalencia) de las secuencias que conforman a los PAMs potencia la actividad antimicrobiana al conferirle al péptido mayor atracción y capacidad de unión sobre sus objetivos celulares (36), por esta razón, teniendo en cuenta los resultados previos con las quimeras lineales, en este trabajo se plantea evaluar la actividad antifúngica de péptidos quiméricos ramificados que contienen fragmentos de la secuencia de LfcinB y BFII contra cepas de referencia y resistentes a fluconazol de *Candida albicans*, así mismo se plantea determinar si los péptidos generan hemólisis sobre glóbulos rojos humanos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades *Candida albicans*

Candida spp son levaduras cuya estructura levaduriforme puede variar según la especie: globosas, ovoides, elípticas y cilíndricas; su reproducción asexual o anamórfica es por blastoconidios (holoblástica) y la mayoría de las especies patógenas pueden formar pseudohifas e hifas verdaderas, con excepción de *C. glabrata* y *C. auris* (37).

C. albicans se caracteriza por presentar varias formas morfológicas (blastoconidias, pseudohifas e hifas); durante el proceso de gemación, se genera un nuevo brote en la superficie de la levadura del material celular que dará origen a la progenie, cuando se finaliza la fase de crecimiento, las levaduras se dividen y la célula hija se separa de su madre exhibiendo cada una morfología celular ovalada o redonda de aproximadamente 7-8 μm . La filamentación de *C. albicans* es inducida por condiciones del medio donde se encuentre, principalmente se presenta cuando la temperatura es mayor o igual a 37°C, pH alcalino ≥ 6.5 , altas concentraciones de CO₂, privación de nutrientes, presencia de N-acetilglucosamina y baja concentración de nitrógeno. Por su parte, las hifas consisten en células tubulares que permanecen unidas posterior a la citocinesis y presentan septos especializados que permiten el paso y flujo de material intracelular; por otro lado, la pseudohifa es un tipo de forma filamentosa compuesta de levaduras elipsoidales alargadas que permanecen conectadas en forma de cadena con constricciones donde se encuentran los septos (38),(39).

La pared celular de este hongo está compuesta principalmente por glucanos (50-60%), quitina (1-20%) y glicoproteínas (30-50%), su función es proteger a la célula de condiciones de estrés provenientes del entorno donde se encuentre, como por ejemplo cambios osmóticos, temperatura y pH, adicionalmente tiene funciones importantes como controlar la permeabilidad celular y proteger a la célula del sistema inmune (40); la principal diferencia entre la composición de la forma levaduriforme y la hifa en *C. albicans* es que la pared de las hifas tiene un contenido mayor de quitina en comparación que la levadura (41).

3.1.1 Patogenia

El género *Candida* abarca más de 200 especies, pero tan solo el 25% son de interés clínico y alrededor de ocho son las más frecuentes de encontrar causando distintos tipos infecciones. *C.*

albicans sobresale siendo responsable del 40 hasta 75% de los casos de infecciones causado por este género (37).

C. albicans es un hongo comensal inocuo que coloniza distintas cavidades del cuerpo humano, este microorganismo en condiciones normales se encuentra limitado por la microbiota local, barreras epiteliales y el sistema inmunológico, sin embargo, puede causar infecciones localizadas y sistémicas si se perturba o compromete los factores mencionados anteriormente, promoviendo el crecimiento excesivo del hongo que lo lleva a invadir nuevos tejidos generando daño tisular, transformado su comportamiento a patógeno oportunista (42). Las infecciones por *C. albicans*, generalmente surgen de la microbiota endógena en lugar de contaminación por otras fuentes, en contraste a otros hongos patógenos importantes como *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Histoplasma* que se encuentran en el ambiente y han desarrollado rasgos de patogenicidad en humanos (43).

C. albicans está presente en forma de levadura en el microbioma humano, y se considera que su transición de levadura a la forma filamentosa uno de sus principales factores de patogenicidad puesto que las hifas tienen la capacidad de invadir e ingresar al tejido del hospedero, así mismo, la expresión de la toxina candidalisina producida por su forma filamentosa, está relacionada con la aparición de infecciones sistémicas y con aumento de la mortalidad durante el curso de la infección, ya que cuenta con la capacidad de dañar directamente la membrana epitelial por medio de la formación de poros que resulta en la desestabilización de la permeabilidad celular y con la posterior fuga del contenido citoplasmático (44).

Otro factor relacionado con la patogenicidad de *C. albicans* es su capacidad para formar biopelículas; matriz extracelular compuesta de polisacáridos que contiene en su interior levaduras, hifas y pseudohifas y posee la capacidad de adherirse a superficies bióticas (mucosas y revestimientos celulares del hospedero) y abióticas (catéteres, válvulas cardíacas, marcapasos, etc) (45). La formación de biopelícula empieza con la adhesión del hongo a la superficie, el contacto con la superficie estimula la formación de hifas que van a promover la producción de la matriz extracelular que madura y se organiza gracias a la producción de adhesinas como la Hwp1, posterior a la maduración, continúa la dispersión de las levaduras que se encuentra en el interior de la biopelículas, lo que resulta en la diseminación sistémica del hongo (46).

3.1.2 Manifestaciones clínicas

La candidiasis comprende varias categorías de infección por *Candida* spp, abarca desde infecciones locales superficiales, hasta invasivas y sistémicas concomitantes o no con candidemia (infección por *Candida* en el torrente sanguíneo). Por su parte, la candidiasis mucocutánea superficial como la oral y/o esofágica, se caracterizan por el crecimiento excesivo del hongo que puede llevar a descamar las células epiteliales, formar acúmulos de queratina, bacterias y tejido necrótico, lesiones comúnmente denominadas aftas y aparecen por lo general durante la vejez y la infancia (47); la candidiasis vulvovaginal se caracteriza por presentar prurito e irritación debido a edemas en la mucosa junto con manchas blancas similares a las observadas en la candidiasis oral; por otro lado, las principales formas por las cuales *Candida* llega al torrente sanguíneo son atravesando la mucosa del tracto gastrointestinal, por medio de la implantación de catéteres intravasculares y por infecciones graves localizadas principalmente en pacientes inmunosuprimidos (48).

3.1.3 Antifúngicos para Candidiasis invasiva

Existen tres familias de antifúngicos (polienos, azoles y equinocandinas) utilizados comúnmente para tratar la enfermedad fúngica invasiva (EFI) por *Candida* spp. (49). (i) Los polienos presentan actividad fungicida al unirse con el ergosterol de la membrana de los hongos, estos fármacos tiene la capacidad de crear poros que debilitan la superficie celular alterando la permeabilidad, lo que resulta con la posterior fuga del contenido citoplasmático y muerte celular (50). (ii) Los azoles son la clase más grande de antifúngicos que se utilizan en la práctica clínica, son fármacos fungistáticos que inhiben la biosíntesis de ergosterol actuando sobre la enzima 14- α -lanosterol desmetilasa, necesaria para la conversión de lanosterol a ergosterol, proceso requerido para la formación de la membrana del hongo. Por último, (iii) las equinocandinas son lipopéptidos que afectan el crecimiento celular al inhibir la síntesis de D-glucano al unirse con la subunidad Fskp de la enzima β -(1,3)-D-glucano sintasa, su inhibición conduce al agotamiento del glucano en la pared celular de las células fúngicas (51), (52).

3.1.4 Mecanismos de resistencia a antifúngicos

El mecanismo más común de resistencia a los polienos se asocia con alteraciones en la composición de esteroides en la membrana de las células fúngicas a causa de mutaciones en genes relacionados con la síntesis de ergosterol (genes *ERG*); en *C. albicans* las mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* generan cambios de esteroides en la membrana dando como resultado

la implantación de anosterol, eburicol 4 y 14-dimetilzimosterol disminuyendo el blanco de estos fármacos en la superficie del hongo (53). La resistencia a los azoles por parte de *C. albicans*, surge como resultado de alteraciones o mutaciones a nivel del gen *ERG11* (encargado de producir la enzima 14- α -lanosterol desmetilasa), dichos cambios disminuyen la afinidad del fluconazol por su enzima blanco o pueden sobre expresar el sitio de unión lo que reduce el efecto del fármaco (54). La resistencia a equinocandinas es cada vez es más frecuente de encontrar y se relaciona con la sustitución de los aminoácidos Ser⁶⁴⁵ y Phe⁶⁴¹ en la región definida como “hot-stop” o punto caliente (región donde las mutaciones son muy frecuentes) dentro de la subunidad Fks1, esta variación se relaciona con el aumento de más de 20 veces de la CMI en las cepas que tienen cambios en estos residuos de aminoácidos (55).

3.2 Péptidos antimicrobianos

Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos al medio ambiente, esto implica que existe el riesgo constante de adquirir infecciones, por esta razón para defenderse del entorno que los rodea, se han desarrollado múltiples mecanismos de defensa los cuales conforman el sistema inmune, siendo los PAMs uno de los principales componentes que hacen parte de la primera línea de defensa de la inmunidad innata de animales (56).

Los PAMs son moléculas de oligopéptidos que pueden clasificarse según su estructura secundaria y su composición en: péptidos lineales, de hélice alfa (cecropinas, magaininas y melitina), los enriquecidos con aminoácidos específicos, aquellos que contienen puentes disulfuro (defensinas y protegrinas) y los fragmentos de otras proteínas (LfcinB derivado de la LFB) (57).

Los PAMs han tomado protagonismo, debido a que poseen cualidades llamativas en comparación de los medicamentos convencionales como lo son sus múltiples mecanismos de acción que reducen la aparición de resistencia, no producen reacciones adversas severas debido a que son componentes del propio sistema inmune, y tienen un amplio espectro de acción, que incluye virus, bacterias, parásitos, hongos entre otros (58).

Los PAMs poseen características en común que se relacionan con su capacidad de destruir o eliminar los microorganismos, dentro de las cuales se encuentran: secuencia relativamente corta, contienen un alto número de residuos de aminoácidos hidrófobos (> 50%), la carga neta del péptido por lo general es catiónica (otorgado por aminoácidos como lisina, arginina e histidina) y la manera como adopta la estructura secundaria, así mismo se ha determinado que

los PAMs poseen distintos mecanismos por los cuales logra promover muerte celular a los microorganismos, el principal está relacionado con su capacidad de dirigirse directamente a la membrana celular y formar poros que ocasionan daño o desestabilizan esta estructura, otros mecanismos que se han descrito incluyen la facultad que tienen de interferir en algunos procesos como la síntesis de proteínas al destruir el ARN o daño directo sobre el ADN (59).

3.3 Lactoferrina Bovina

La LFB es una glicoproteína de 80 kDa producida por las células epiteliales de las mucosas y por los neutrófilos, pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro denominada transferrinas y también tiene un papel importante como proteína de defensa no específica (23). Este péptido ha demostrado poseer propiedades anti-microbianas, anti-oxidantes y anti-anémicas (60); por consiguiente dentro de las aplicaciones industriales, ha sido utilizado dentro de formulaciones de i) crema, enjuague, hilo dental y como goma de mascar por su capacidad de eliminar microorganismos patógenos, por disminuir la inflamación local y ayudar a combatir infecciones de la cavidad oral como gingivitis, ii) en cápsulas y bebidas como nutracéutico favoreciendo la absorción de hierro iii) como componente de soluciones oftálmicas que eliminan la resequeidad ocular crónica severa iv) soluciones utilizadas como promotores de crecimiento celular *in vitro*; así mismo existen productos a base de LFB categorizados dentro de la categoría GRAS (Generalmente Considerados como Seguros) otorgado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos), como LFB de Ventures LLC de Kansas City Missouri, aplicado como agente antimicrobiano en forma de spray en reses sacrificadas y en cortes de carne cruda (61).

3.3 Lactoferricina Bovina

La LfcinB es un fragmento peptídico de 25 residuos de longitud, situado en la región N-terminal de la LFB (Figura 1), y es generado durante la hidrólisis de esta proteína con la pepsina gástrica. LfcinB, adopta forma de bucle por medio de un puente disulfuro entre dos cisteínas (Cys¹⁹-Cys³⁶), posee una carga neta de +8 y una proporción de residuos hidrófobos del 48%, su estructura es anfipática y en forma de lámina β (62). En comparación de la proteína de la cual se origina, la LfcinB no muestra capacidad de unión al hierro, sin embargo, presenta mayor actividad antimicrobiana que la LFB (63).

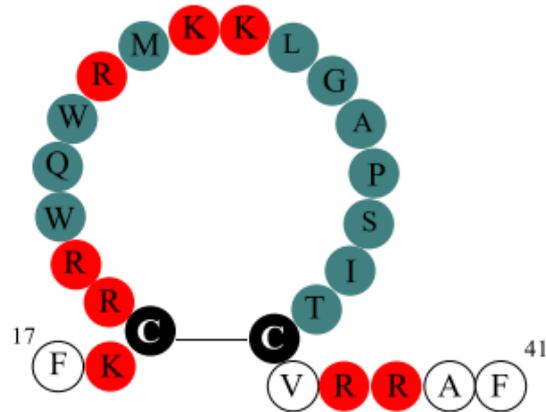


Figura 1. Estructura de aminoácidos de LfcinB, la imagen corresponde al bucle generado por el puente disulfuro entre las dos cisteínas (C), círculos negros. Los residuos con carga catiónica arginina (R) y lisina (K) se representan por los círculos en color rojo y la numeración corresponde a la posición dentro de la LFB (64).

El principal mecanismo de acción descrito para la LfcinB está relacionado con su interacción electrostática inicial de las cadenas laterales catiónicas con los componentes con carga negativa de las membranas celulares, posterior a la unión, los residuos hidrófobos como el triptófano causan disrupción y desestabilizan la membrana celular (64). Para el caso de *C. albicans*, adicional al daño directo sobre la membrana plasmática, se ha observado agregación del material citoplasmático que demuestra interacción de la LfcinB con estructuras internas de las blastoconidias que da como resultado la síntesis y liberación de ATP mitocondrial al medio extracelular (65). Secuencias análogas como Lfcin15 han demostrado que en *C. albicans* no provoca solamente daño sobre la superficie celular, sino que el péptido tiene la capacidad de entrar a las células, se acumula principalmente en vacuolas y es capaz de activar ROS. (24)

La secuencia más corta derivada de la LfcinB que tiene actividad antimicrobiana es ²⁰RRWQWR²⁵ denominado motivo mínimo; es a partir de esta secuencia que se han realizado múltiples variaciones como por ejemplo inserción de aminoácidos catiónicos e hidrófobos, aumentar la polivalencia del motivo, incluir aminoácidos no naturales, producir secuencias palindrómicas y quiméricas que incluyan el motivo mínimo con la finalidad de potenciar su actividad antimicrobiana, disminuir su toxicidad en células del hospedero, mejorar la estabilidad de la molécula y evitar la degradación enzimática (66).

3.5 Buforina I

Las buforinas son una familia de péptidos derivados de las histonas e incluye principalmente a la BFI y BFII, sin embargo, estos PAMs no tienen ningún papel involucrado en la replicación o empaquetamiento del material genético a diferencia de las estructuras de las cuales provienen, por el contrario, los péptidos extracelulares derivados de histonas poseen propiedades antimicrobianas (67).

BFI es un PAM aislado por primera vez del estómago del sapo asiático *Bufo bufo gargarizans*, este péptido consta de 39 aminoácidos de los cuales 37 de estos residuos presentan homología con la secuencia amino-terminal de la histona H2A (68). Respecto al proceso de síntesis de BFI, se estima que en las células de la mucosa gástrica la histona H2A se sintetiza en exceso de la cantidad requerida para empaquetar el ADN, por lo cual se acumula en gránulos secretorios citoplasmáticos, una fracción del total de histonas sintetizadas se acetila, las cuales se dirigen al núcleo para formar la cromatina, mientras que la histona H2A no acetilada se libera a la luz gástrica donde es procesada con isoenzimas de pepsina C para producir BFI, el péptido generado permanece adherido a la mucosa que recubre la superficie del estómago proporcionando una capa protectora antimicrobiana que inhibe el crecimiento de microorganismos provenientes del alimento consumido (29).

3.6 Buforina II

BFII es péptido que consta de 21 residuos producidos mediante el tratamiento de BFI con la endoproteinasa Lys-C, conteniendo los residuos de Thr¹⁶ hasta Lys³⁶ del péptido del cual precede; BFII tiene una estructura de hélice-bisagra-hélice, la hélice extendida N-terminal incluye los residuos Arg⁵ a Phe¹⁰, y la hélice C-terminal incluye los residuos Val¹² a Lys²¹, las hélices están separadas por un residuo de Pro situado en la posición de aminoácido 11 (32).

A diferencia de la mayoría de PAMs, BFII posee mecanismos de acción alternos a la permeabilización directa de la membrana celular, a pesar que posee características fisicoquímicas similares a otros péptidos α -helicoidales como la magainina II (69); BFII cuenta con la capacidad de producir inicialmente poros toroidales transitorios sin generar lisis del microorganismo o daño significativo en este organelo, esta característica se encuentra conferida por el residuo de Pro¹¹ ya que este aminoácido no forma los enlaces de hidrógeno necesarios para estabilizar una hélice α , lo cual induce flexibilidad y distorsión de la región N-terminal del péptido, propiedad que ayuda a penetrar a BFII en el citosol; posterior a la entrada en la

célula, BFII se une y genera daño sobre los ácidos nucleicos (ADN y ARN) por medio de interacciones electrostáticas inespecíficas entre ambas moléculas que inducen la posterior muerte celular, sin embargo cabe la posibilidad que tenga otros dianas intracelulares(68).

El motivo mínimo de actividad descrito para BFII es RLLR, que corresponde a la secuencia más corta dentro del péptido que posee actividad antimicrobiana y es a partir de allí que se han hecho modificaciones con la finalidad de potenciar su efecto (71).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de péptidos quiméricos ramificados que contienen fragmentos de la secuencia de LfcinB y BFII contra las cepas *Candida albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ frente a los péptidos quiméricos.
- Identificar el efecto fungicida y/o fungistático de los péptidos quiméricos sintéticos sobre las cepas *Candida albicans* SC5314 y PUJ256.
- Determinar la actividad hemolítica de los péptidos quiméricos ramificados

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Materiales

5.1.1 *Candida albicans* SC5314 (Robin) Berkhout (ATCC® MYA- 2876™)

Corresponden a una cepa de referencia para la cual, anteriormente se ha descrito que presenta CMI a fluconazol de 1 µg/mL y para caspofungina de 0.06 µg/mL (15), también se ha determinado la CMI de péptidos quiméricos que contienen secuencias de motivo mínimo de LfcinB y BFII como : para RRWQWR-**Ahx-RLLR** es >200 µg/mL, RRWQWR**RLLR** es 200 µg/mL, y **RLLR-Ahx**-RRWQWR >200 µg/mL, mientras que para los motivos mínimos por separado la CMI para RRWQWR corresponde a 200 µg/mL(>203 µM) y para **RLLR**RLLR**** es >200 µg/mL (>183 µM) (35). La tabla 1 represente las características de *C. albicans* SC5314.

Categoría del producto	Hongos
Tipo de producto	Levadura
Clasificación	Reino: <i>Fungi</i> División: <i>Ascomycota</i> , Clase: <i>Saccharomycetes</i> , Orden: <i>Saccharomycetales</i> Familia: <i>Saccharomycetaceae</i> Género: <i>Candida</i>
Clasificación de la cepa	SC5314
Cepa secuenciada del genoma	Cepa de secuenciación del genoma (Centro de tecnología del genoma de Stanford, Universidad de Stanford, EE. UU.; Universidad farmacéutica de China, China). Genoma mitocondrial secuenciado.
Fuente de aislamiento	Espécimen clínico humano
Condiciones de almacenaje	-80 °C o más

Tabla 1. Descripción de *C. albicans* SC5314

5.1.2 *Candida albicans* 256 HUSI-PUJ

Aislado clínico de mucosa oral del Hospital San Ignacio y depositado en el banco de cepas del grupo MICOH-P de la PUJ (Pontificia Universidad Javeriana). *Candida albicans* resistente a fluconazol con CMI de 64 µg/mL y para caspofungina de 0.06 µg/mL (15), previamente se ha determinado la CMI de péptidos quiméricos que contienen secuencias de motivo mínimo de LfcinB y BFII como : para RRWQWR-Ahx-RLLR es >200 µg/mL, RRWQWRLLR es 200 µg/mL, RLLR-Ahx-RRWQWR >200 µg/mL y para las secuencias que constituyen las quimeras evaluadas por separado la CMI de RRWQWR corresponde a 200 µg/mL(>203 µM) y para RLLRLLR es >200 µg/mL (>183 µM) (35). La tabla 2 contiene los fenotipos de susceptibilidad (sensibilidad y resistencia) de las dos cepas de *C. albicans*.

Cepa	Código	Fuente	Susceptibilidad		
			FLU	CAS	AMB
<i>Candida albicans</i>	SC5314	Sangre	S	S	S
<i>Candida albicans</i>	256 HUSI-PUJ	Hisopado bucal	R	S	S

Tabla 2. Resumen de las características de las cepas de *C. albicans*. FLU: Fluconazol CAS: Caspofungina AMB: Anfotericina R: Resistente S: Sensible CMI: Concentración Mínima Inhibitoria CMF: Concentración Mínima Fungicida

5.1.3 Péptidos de estudio

Péptidos quiméricos ramificados que contienen los motivos de LfcinB y BFII: en la figura 2, el péptido a) consta de dos veces el motivo mínimo de LfcinB **RRWQWR** ramificado, ambos unidos por medio del espaciador ácido **6-amino-hexanoico** al motivo mínimo de la BFII **RLLR**, el otro péptido b) consiste en dos veces el motivo mínimo de LfcinB **RRWQWR** ramificado

unidos por medio del espaciador **6-amino-hexanoico** a una secuencia polivalente palindrómica lineal que está formada por dos veces el motivo mínimo de la BFII **RLLR**.

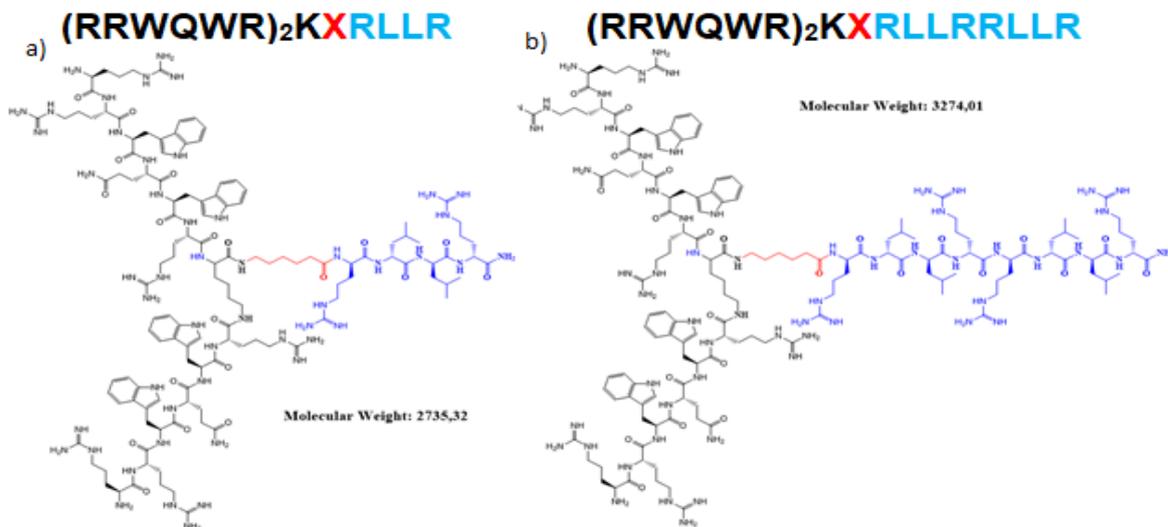


Figura 2. Estructura de los péptidos quiméricos ramificados; en color negro corresponde a las dos moléculas del motivo mínimo de la **LfcinB**, ramificadas, en rojo el espaciador **6-amino-hexanoico** (X) y la secuencia en azul es el motivo mínimo de la **BFII** a) una vez, b) dos veces.

3.2 Hipótesis

Péptidos quiméricos ramificados que contienen los motivos mínimos de LfcinB y BFII presentan actividad antifúngica mejorada en comparación con péptidos quiméricos lineales y que los motivos evaluados por separado, así mismo los péptidos ramificados conservan porcentajes de hemólisis similares a sus análogos lineales.

5.2. Estrategia de trabajo

Con la finalidad de cumplir con los objetivos propuestos, el presente trabajo se desarrolló en tres etapas: La primera etapa consistió en la evaluación antifúngica de los péptidos quiméricos ramificados al determinar los valores de CMI y CMF. En la segunda etapa se analizó la cinética de la actividad mediante el diseño de curvas de letalidad durante 48 h de incubación. La tercera etapa está constituida por el cálculo del porcentaje de hemólisis de ambos péptidos (Figura 3).

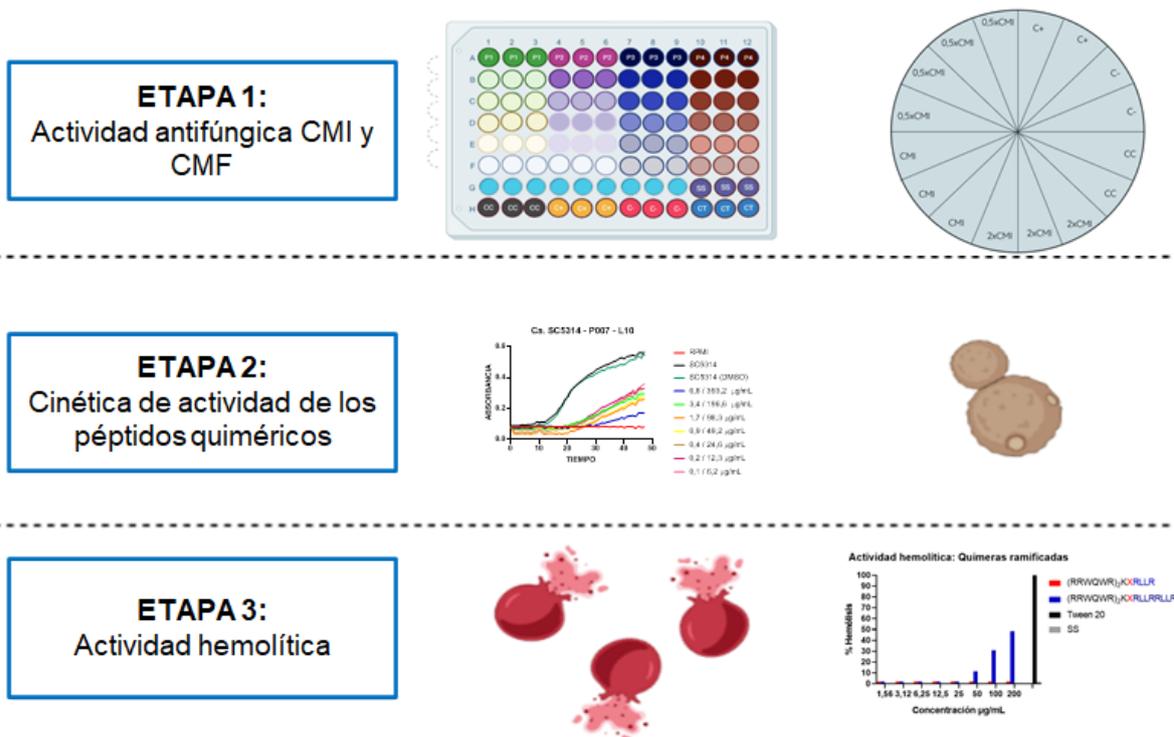


Figura 3. Diseño metodológico.

5.3.1 Síntesis y caracterización de los péptidos.

Los péptidos quiméricos ramificados de LfcinB y BFII se sintetizaron mediante la síntesis de péptidos en fase sólida 9-Fluorenilmetiloxicarbonil/tertbutilo (Fmoc/tBu) y se caracterizaron por RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. La producción de los péptidos fue realizada por el grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP).

5.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

El ensayo se realizó acorde al método de microdilución en caldo según las normas Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (72, 73). Se partió de un cultivo de *Candida* spp incubado por 24 horas a 37°C, de este cultivo se realizó un inóculo en solución salina (0.9%) tomando colonias y suspendiendo las hasta alcanzar 0.5 McFarland DO: 595 nm 0.082-0.12, luego se diluyó en 1/50 y 1/20 en medio RPMI (según el volumen final que se requiera) con la finalidad de alcanzar un inóculo final de $0.5 - 2.5 \times 10^3$ UFC/mL.

En placas de 96 pozos, se dispensó 100 μ L de medio RPMI y 100 μ L del péptido y se llevaron a cabo diluciones $\frac{1}{2}$ a partir de una concentración de 200 μ g/mL hasta 6.25 μ g/mL del péptido, cambiando de punta en cada dilución, seguido a esto se agregó 100 μ L del inóculo ajustado. La

placa se incubó a 37°C por 48 horas. Después de la incubación se realizó lectura visual a las 24 y 48 horas con ayuda del espejo invertido y se midió las absorbancias por medio del espectrofotómetro (DO 595 nm). Se utilizó como control positivo medio RPMI más agua destilada e inóculo, el control negativo consta de fluconazol al doble de la CMI e inóculo, los controles de técnica o de esterilidad consisten en RPMI y solución salina individuales. Se realizaron por triplicado. (Figura 4).



Figura 4. Distribución de la microplaca de 96 pozos, las diluciones del péptido se realizan de manera vertical en donde la fila A contiene las concentraciones más altas (200 µg/mL) de cada uno de los péptidos (P1 y P2), mientras que en la fila F están las más bajas, los números representan las concentraciones finales de los péptidos quiméricos. Control positivo (C+), control negativo (C-), control de la técnica (CT), solución salina (SS).

5.3.3 Concentración Mínima Fungicida

Después de haber medido las absorbancias a las 48 horas del ensayo anterior, se realizó un subcultivo en agar SD tomando una porción de cada una de las concentraciones de los péptidos donde no se observó crecimiento de la levadura y de los controles, acorde a la distribución ilustrada en la Figura 5, luego se incubó la caja por 24 horas a 37°C.

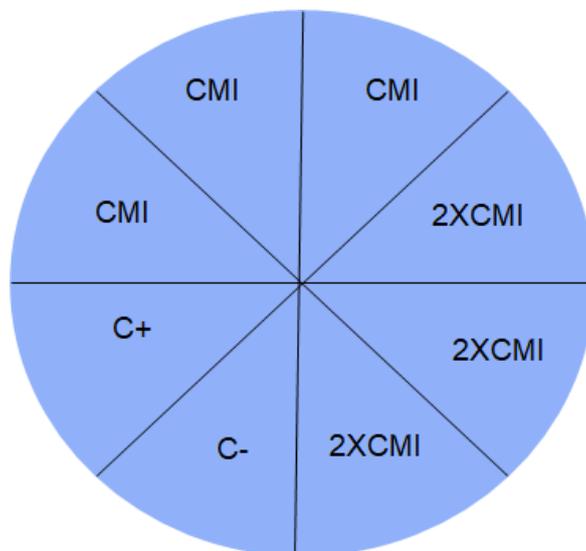


Figura 5. Distribución de la caja de Petri para determina la CMF. Los números indican la concentración final del péptido. Control negativo (C-), Control positivo (C+), Control de la técnica (CT).

5.3.4 Curvas de letalidad

Teniendo en cuenta la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los péptidos, se realizó diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ en medio RPMI hasta 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los pozos seleccionados de la microplaca, luego se agrega 150 μL del inóculo ajustado ($0.5 - 2.5 \times 10^3$ UFC/mL) de la misma manera como se realiza en el procedimiento de microdilución en caldo, para obtener un volumen final de 300 μL . Las muestras se incubaron por 48 horas y la absorbancia se midió cada hora en el equipo Bioscreen C a 600 nm. El control negativo utiliza un antifúngico a la CMI, como control positivo medio RPMI con inóculo de la levadura y como control de esterilidad medio RPMI solo (72).

5.3.5 Determinación de la actividad hemolítica

Este ensayo se realizó basándose en el estudio de Solarte (74). Se obtuvo sangre de una persona sana cuyo grupo sanguíneo corresponde a O+ en tubos con anticoagulante EDTA, luego se centrifugan a 2000 rpm durante 15 minutos con la finalidad de separar el plasma de los glóbulos rojos y se eliminó el sobrenadante, posterior a esto, se realizaron tres lavados de los glóbulos rojos con solución salina al 0.9% o hasta que el sobrenadante quedara translúcido después de haber centrifugado los tubos a 2000 rpm durante 10 minutos, para preparar una solución cuya concentración sea de hematocrito al 4%. Tomar una placa de 96 pozos y realizar diluciones

seriadas ½ de los péptidos a evaluar en solución salina, partiendo de una concentración de 200 µg/mL hasta 6.2 µg/mL dejando un volumen final en cada pozo de 100 µL, una vez realizadas las diluciones se agrega 100 µL de la solución de glóbulos rojos, se incuba la microplaca durante 2 h a 37 °C; pasado este tiempo se centrifuga la microplaca a 3500 rpm por 5 minutos, se retira el sobrenadante y se vierte en una nueva placa para leer la absorbancia a 450 nm (74).

El control positivo consistió en Tween 20% junto con glóbulos rojos (100% de hemólisis), para el control negativo se utilizó solución salina más glóbulos rojos (no se produce ningún efecto hemolítico). Para determinar el porcentaje de hemólisis se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia control negativo}}{\text{Absorbancia control positivo} - \text{Absorbancia control negativo}} * 100$$

Una estrategia prometedora para combatir las micosis por hongos resistentes, eliminar biopelículas fúngicas, extender la vida útil y la eficacia de los antifúngicos convencionales, es a través de la terapia combinada. La principal ventaja de la sinergia entre moléculas sobre la monoterapia radica en reducir o incluso eliminar la aparición de resistencia de las células fúngicas, incluso el enfoque sinérgico puede alterar la actividad fungistática de muchos compuestos y potenciar su efecto antifúngico (75). Es a partir de allí y adicional a las técnicas descritas anteriormente, se decidió realizar el ensayo de tablero de ajedrez con la finalidad de determinar la interacción que se genera al combinar los péptidos quiméricos ramificados junto con distintas concentraciones de fluconazol sobre las cepas de *C. albicans*.

5.3.6 Ensayo de titulación en tablero de ajedrez

Se utilizó este método para evaluar el efecto de los péptidos en combinación con fluconazol sobre ambas cepas de *C. albicans*; para el caso del fluconazol se realizan diluciones seriadas a partir de 2X CMI teniendo en cuenta si la cepa es resistente o no a este antifúngico, para el péptido se evaluaron concentraciones finales a partir de 2xCMI hasta 0.06xCMI teniendo en cuenta que la concentración más alta utilizada es de 100 µg/mL en ambos casos. En cada pozo se agregó 50 µL del péptido quimérico, 50 µL de la de Fluconazol y 100 µL de inóculo ajustado ($0.5 - 2.5 \times 10^3$ UFC/mL) para un volumen final por pozo de 200 µL (Figura 6) (76).

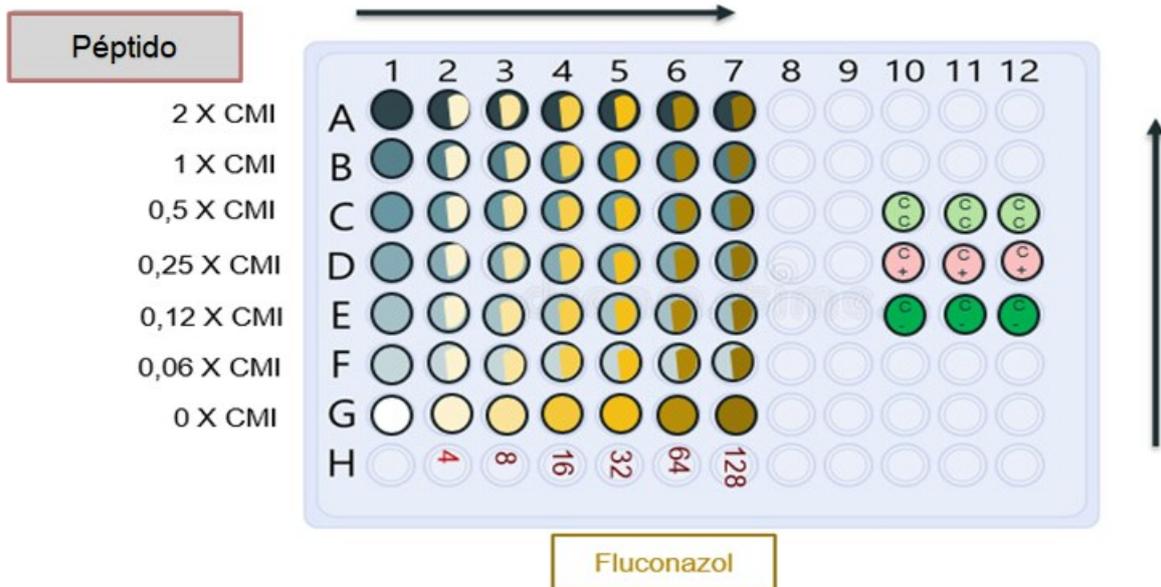


Figura 6. Distribución de la placa multipozo para el ensayo de titulación en tablero de ajedrez, en amarillo se muestra la manera como se distribuye las concentraciones de fluconazol, en azul las concentraciones del péptido quimérico, el control positivo (C+) corresponde a la cepa en medio RPMI, el control negativo (C-) es inóculo de la levadura junto con fluconazol a 2xCMI.

Después de la incubación por 48h a 37°C, se determinó el valor de ICIF (Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional) para establecer el efecto que se presenta entre el péptido y fluconazol, EL índice CIF se obtiene aplicando la siguiente fórmula: $ICIF = [(A) / (CMI a)] + [(B) / (CMI b)]$. Se considera que los valores de IFIC = 0,5 indican sinergismo; 0,5- 1,0, aditividad; 1-4, indiferencia; $y > 4$, antagonismo (77).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Etapa 1: Microdilución en caldo y CMF

Los péptidos quiméricos ramificados se evaluaron en una cepa de referencia sensible (*C.albicans* SC5314) y en un aislado clínico resistente a fluconazol (*C.albicans* 256 HUSI PUJ), estas cepas se eligieron por un lado debido a que es necesario buscar alternativas terapéuticas que superen las barreras relacionadas con la resistencia antifúngica, y por otro lado, *C. albicans* es la especie que se atribuye el mayor número de casos de candidiasis localizadas y sistémicas (5).

C. albicans es una levadura de gran importancia clínica, atribuido principalmente a las múltiples manifestaciones clínicas que comprenden desde infecciones superficiales hasta profundas e invasivas con compromiso de uno o varios órganos, ligado a alta mortalidad. Adicionalmente comprende aproximadamente el 65% de las infecciones causadas por este género (37).

Péptido	<i>C. albicans</i>			
	SC5314		256 HUSI-PUJ	
	CMI µg/mL (µM)	CMF µg/mL (µM)	CMI µg/mL (µM)	CMF µg/mL (µM)
RRWQWR*	200 (203)	200 (203)	200 (203)	200 (203)
RLLRLLR*	>200(>183)	>200(>183)	>200(>183)	>200(>183)
RRWQWR-Ahx-RLLR*	200 (122)	200 (122)	200 (122)	200 (122)
(RRWQWR)₂KXRLLR	100 (37)	100 (37)	100 (37)	100 (37)
(RRWQWR)₂KXRLLRLLR	50 (15)	50 (15)	50 (15)	50 (15)

Tabla 3. Valores de CMI y CMF para cada péptido quimérico ramificado y los motivos mínimos de LfcinB y BFII por separado en las dos cepas de *C. albicans*. En negritas corresponde a los péptidos evaluados en este estudio. * Péptidos control, evaluados previamente dentro de los grupos de investigación donde se desarrolló este trabajo (35). Valores de absorbancias e imágenes de CMF en **Anexo 1.**

Ensayos realizados anteriormente arrojan que el motivo mínimo de la LfcinB RRWQWR presenta valores de CMI >200 µg/mL (>203 µM) en *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ, a su vez el péptido dimérico del motivo mínimo de BFII (RLLRLLR) arrojó valores de CMI de >200 (>183 µM) en las mismas cepas (35). Al comparar la actividad antifúngica de las secuencias por separado con los resultados obtenidos de las quimeras ramificadas entre LfcinB y BFII ramificadas de este estudio, se observa una disminución de más de cuatro veces el valor

de la CMI para el péptido (RRWQWR)₂KX**RLLR** (50 µg/mL (15 µM)) y de más de dos veces para (RRWQWR)₂KX**RLLR** (100 µg/mL (37 µM)), demostrando que se aumenta la actividad antifúngica considerablemente cuando se unen los motivos mínimos (monoméricos o dinmpericos) de LfcinB y BFII. En la tabla 3 se observan los valores de CMI y CMF de cada una de las moléculas.

El desarrollo de PAMs polivalentes y ramificados presentan ventajas en comparación de sus análogos monoméricos lineales, las cuales incluyen mayor afinidad por blancos celulares a través del reconocimiento simultáneo de múltiples sitios de unión, mayor capacidad de permeabilizar membranas, actividad antibacteriana y antifúngica mejorada, son más resistentes a la degradación proteolítica y a entornos fisiológicos (36). De esta manera lo describe la investigación realizada por Lakshminarayanan (78), donde secuencias monoméricas y palindrómicas lineales de la secuencia RGRKVRRR muestran actividad disminuida (CMI de 78µM - >78µM) sobre *C. albicans* y *Fusarium solani* en comparación con el péptido tetramérico ramificado B4010 ensamblado a partir de dos copias del dímero RGRKVRRRKRGRKVRRR a través de lisinas ramificadas (CMI de 5.6µM – 0.34µM). Los resultados del presente estudio se correlacionan con los obtenidos previamente dentro del grupo de investigación (SAMP Y MICOH-P), en la cual se demuestra que péptidos constituidos con secuencias de LfcinB y BFII presentan actividad antibacteriana y antifúngica mejorada cuando se aumenta la polivalencia del motivo mínimo de BFII (34),(35).

Los péptidos quiméricos ramificados en este estudio exhiben mayor efecto antifúngico en comparación con las quimeras lineales constituidas por el motivo mínimo de LfcinB y BFII, por ejemplo, el péptido lineal RRWQWR-Ahx-RLLR que posee el mismo enlazador que las quimeras ramificadas, en estudios anteriores mostró CMI de 200 µg/mL (122 µM), mientras que el valor de CMI disminuye al doble para (RRWQWR)₂KX**RLLR** y cuatro veces la concentración para (RRWQWR)₂KX**RLLR** en contraste con la secuencia lineal sobre las mismas cepas de *C. albicans* (tabla 3), este fenómeno puede estar relacionado con el aumento de la polivalencia o repetición de fragmentos tanto del motivo mínimo de LfcinB para los dos quimeras ramificadas, como de BFII para el caso de (RRWQWR)₂KX**RLLR**, así como por la disposición o estructura ramificada de los péptidos evaluados.

Los resultados del ensayo de microdilución en caldo y CMF arrojan que la mayor actividad antifúngica corresponde al péptido quimérico ramificado que contiene un dímero ramificado del motivo mínimo de LfcinB en la región N-terminal y un dímero del motivo mínimo de BFII

en el extremo C-terminal ((RRWQWR)₂KX~~RLLR~~RLLR), al exhibir valores de CMI/CMF de 50 µg/mL (15 µM), mientras que para el péptido ramificado (RRWQWR)₂KX~~RLLR~~ la CMI/CMF es de 100 µg/mL (37 µM) en ambas cepas de *C. albicans*.

Analizando las características de los péptidos que podrían estar relacionados con el incremento del efecto antifúngico, se ha descrito que el logP o comportamiento de partición de los compuestos lipofílicos en octanol/agua es un parámetro físico-químico que representa cuantitativamente el grado de lipofilia o hidrofobicidad de una molécula (79). De esta manera se ha planteado que las moléculas lipofílicas y catiónicas poseen alta afinidad por las membranas celulares, y su inserción promueve cambios en la organización de los lípidos que pueden llegar a comprometer la estabilidad de la bicapa y consigu la integridad celular, esto sugiere que el aumento de la actividad antimicrobiana de los PAMs se podría relacionar con el incremento en el número de residuos hidrófobos como Leu y catiónicos como Arg (80). Arfa et al (81), describieron que compuestos con logP >3 se relacionan con actividad antimicrobiana mejorada en comparación de aquellos que con logP <3.

Teniendo en cuenta la relevancia de la hidrofobicidad en la actividad antimicrobiana, se identificó teóricamente la lipofilia de los péptidos quiméricos ramificados mediante la plataforma ADMETlab. El valor de logP para la quimera (RRWQWR)₂KX~~RLLR~~ es 3.18, mientras que para ((RRWQWR)₂KX~~RLLR~~RLLR) es -0.013. Los valores de hidrofobicidad y la actividad antimicrobiana obtenida en este estudio, no concuerda con las características descritas con las reportadas con otras moléculas, lo cual sugiere que la hidrofobicidad no es un factor determinante sobre el efecto antifúngico de las quimeras ramificadas, así mismo, pese a que los dos péptidos poseen carga catiónica, no se encontró variaciones significativas con respecto a la carga neta que poseen las quimeras, ya que las cargas corresponden a 12.44 y 12.62 respectivamente y no es posible relacionar la diferencia en el efecto antifúngico de cada quimera ramificada con la carga debido a que sus valores son similares.

Es necesario analizar la actividad antifúngica de los péptidos de manera multifactorial, es decir, se debe abarcar simultáneamente múltiples características propias de cada péptido como lo son estructura, repetición de los motivos mínimos, posición de los aminoácidos, anfipaticidad, entre otros, con la finalidad de comprender claramente que factores se deben tener en cuenta para potenciar la actividad antimicrobiana de los péptidos quiméricos ramificados.

Por el lado de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ, aunque posee resistencia a fluconazol, esta cepa exhibe la misma susceptibilidad frente a los péptidos que *C. albicans* SC5314 que no es resistente a FLC, lo cual sugiere que la actividad antifúngica de ambas quimeras peptídicas no se ve afectada por los mecanismos de resistencia que presentan las levaduras a dicho antifúngico. Esta particularidad es de gran relevancia, ya que estos péptidos podrían funcionar dentro de la práctica clínica como posibles tratamientos contra levaduras resistentes a FLC.

Adicionalmente, en este trabajo se utilizaron quimeras compuestas de secuencias de dos PAMs con mecanismos de acción diferente. Por un lado, se ha descrito que LfcinB actúa directamente permeabilizando los componentes de la superficie celular (64), por otro lado, BFII transloca los ácidos nucleicos inhibiendo procesos de replicación del material genético y traducción de proteínas que conllevan a la muerte celular (70); otra razón que podría explicar el aumento de la actividad antifúngica de las quimera ramificadas estaría relacionado con la conjugación de ambos mecanismos de acción que posiblemente desarrollen daños tanto en estructuras de la superficie celular como intracitoplasmáticas (82). Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para determinar los blancos a los cuales se dirigen dichos péptidos.

Por último, otra característica relevante que se ha descrito al generar quimeras con péptidos que poseen mecanismos de acción diferente, es la baja probabilidad de inducir resistencia a estas moléculas, asociado a la dificultad de la célula por adaptarse a las múltiples perturbaciones recibidas (83).

Así entonces, ambas quimeras ramificadas exhibieron mayor actividad que sus secuencias originales, frente a las dos cepas de *C. albicans* sensible y resistente a FLC, evaluadas en este estudio lo que sugiere que la síntesis de quimeras peptídicas y su ramificación es una estrategia que potencia la actividad antifúngica y además que estas moléculas pueden ser promisorias para el su uso terapéutico en infecciones ocasionadas por esta especie de levadura.

6.2 Etapa 2: Cinética de actividad de péptidos quiméricos ramificados

Se realizaron curvas de letalidad para observar la relación tiempo-efecto que presentan ambas cepas de *C. albicans* en respuesta al co-cultivo con Los péptidos quiméricos ramificados.

En el caso de *C. albicans* SC5314 se obtuvo efecto fungicida cuando estuvo en contacto con concentraciones de 2X CMI (200 µg/mL (74 µM)) del péptido (RRWQWR)₂KXRLLR durante 48h de incubación, la concentración de la CMI ((100 µg/mL (37 µM)) logró inhibir el

crecimiento de la levadura hasta la hora 23, aproximadamente. Pasadas las 48h se observa una reducción cercana al 40% del crecimiento de la levadura cuando se expone a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ (18 μM), mientras que a 25 $\mu\text{g/mL}$ (9 μM) se inhibe el crecimiento en un 16% comparado con el control de crecimiento (Figura 7).

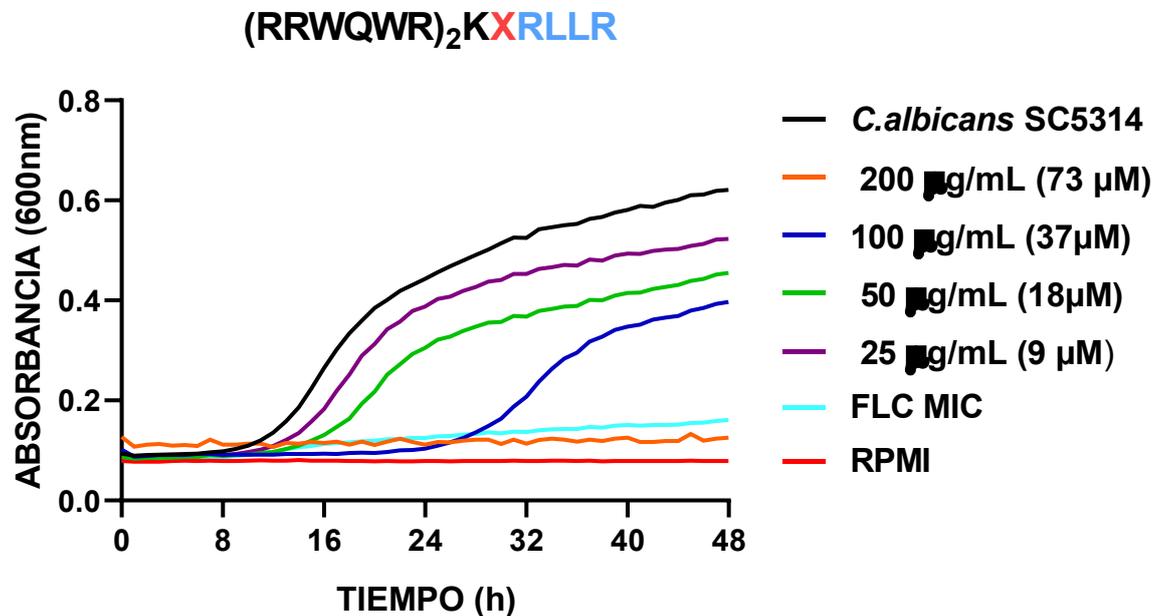


Figura 7. Curva de letalidad de *C. albicans* SC5314 cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR)₂KXRLLR, la línea negra hace referencia al control de crecimiento de *C. albicans* SC5314 sin tratamiento, la línea naranja (200 $\mu\text{g/mL}$), azul oscuro (100 $\mu\text{g/mL}$), verde (50 $\mu\text{g/mL}$) y morado (25 $\mu\text{g/mL}$), corresponden a las distintas concentraciones del péptido, la línea azul claro es el control de fluconazol a la CMI (1 $\mu\text{g/mL}$), y la línea roja corresponde al control de esterilidad de la técnica.

Para el caso de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ se generó efecto fungicida a las 48 h de incubación cuando se utilizaron concentraciones de 200 $\mu\text{g/mL}$ (73 μM) y 100 $\mu\text{g/mL}$ (37 μM) del péptido (RRWQWR)₂KXRLLR, lo anterior se relaciona con la CMI/CMF obtenidas en los ensayos anteriores en los cuales se identifica efecto fungicida a 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, con concentraciones por debajo de la CMI el crecimiento de la levadura se reduce en aproximadamente 21% a 50 $\mu\text{g/mL}$ (18 μM) (Figura 8).

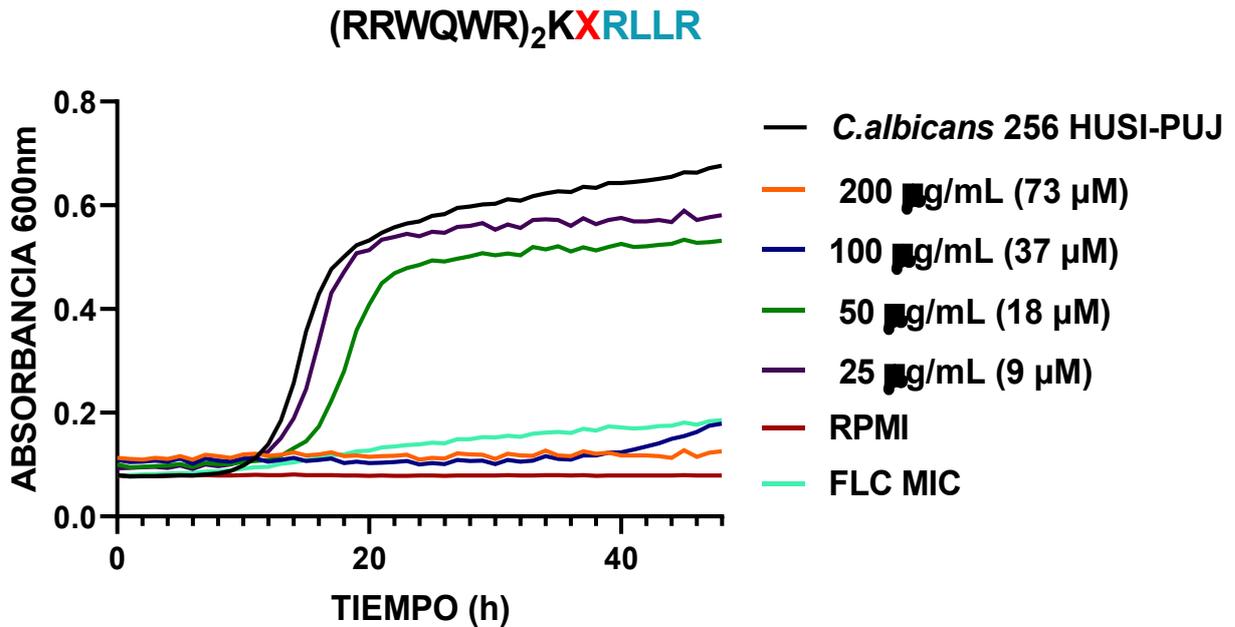


Figura 8. Curva de letalidad de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR)₂KXRLLR, la línea negra hace referencia al control de crecimiento de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ sin tratamiento, la línea naranja (200 µg/mL), azul oscuro (100 µg/mL), verde (50 µg/mL) y morado (25 µg/mL), corresponden a las distintas concentraciones del péptido, la línea azul claro es el control de fluconazol a la CMI (64 µg/mL), y la línea roja corresponde al control de esterilidad de la técnica.

El péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR expone actividad fungicida en las concentraciones entre 200µg/mL(60µM) y 50µg/mL(15µM) sobre *C. albicans* SC5314, esto contrasta con los resultados de la CMI/CMF, lo anterior sugiere mejor actividad sobre *C. albicans* SC5314 en comparación de la quimera (RRWQWR)₂KXRLLR que mostró un efecto fungistático hasta la hora 23 a 100µg/mL(37µM). La concentración de 25µg/mL(8µM) muestra una inhibición del crecimiento de la levadura de aproximadamente 35% en comparación del control de crecimiento pasada las 48 horas (Figura 9).

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR

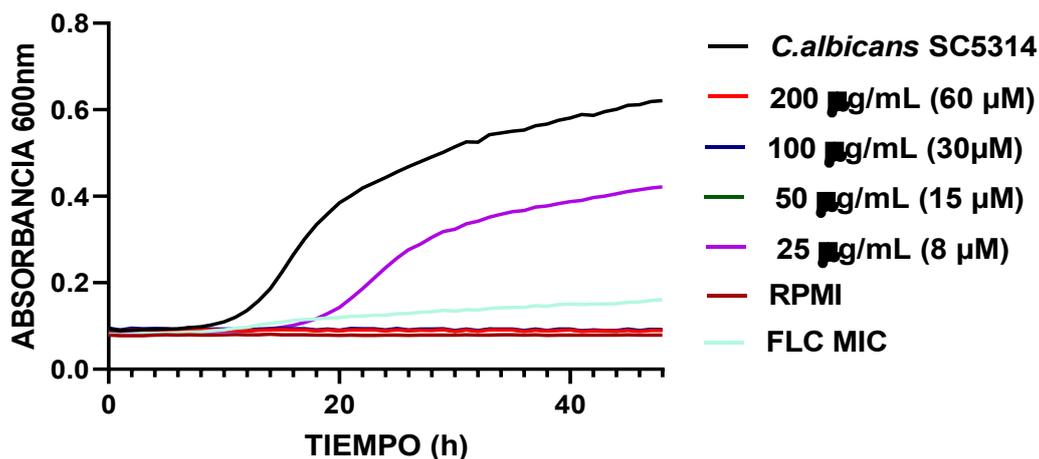


Figura 9. Curva de letalidad de *C. albicans* SC5314 cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR)₂KXRLLRLLR. La línea negra hace referencia al control de crecimiento de *C. SC5315*, sin tratamiento, la línea naranja (200 µg/mL), azul oscuro (100 µg/mL), verde (50 µg/mL) y morado (25 µg/mL), corresponden a las distintas concentraciones del péptido, la línea azul claro es el control de fluconazol a la CMI (1 µg/mL), y la línea roja corresponde al control de esterilidad de la técnica.

Se obtiene efecto fungicida sobre *C. albicans* 256 HUSI-PUJ cuando se cultivó junto con el péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR a concentraciones entre 200 µg/mL (60 µM) y 50 µg/mL (15 µM), mientras que a 25 µg/mL (8 µM) mostró efecto fungistático hasta la hora 18 aproximadamente, es decir su efecto fue fungistático a esta concentración (figura 10).

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR

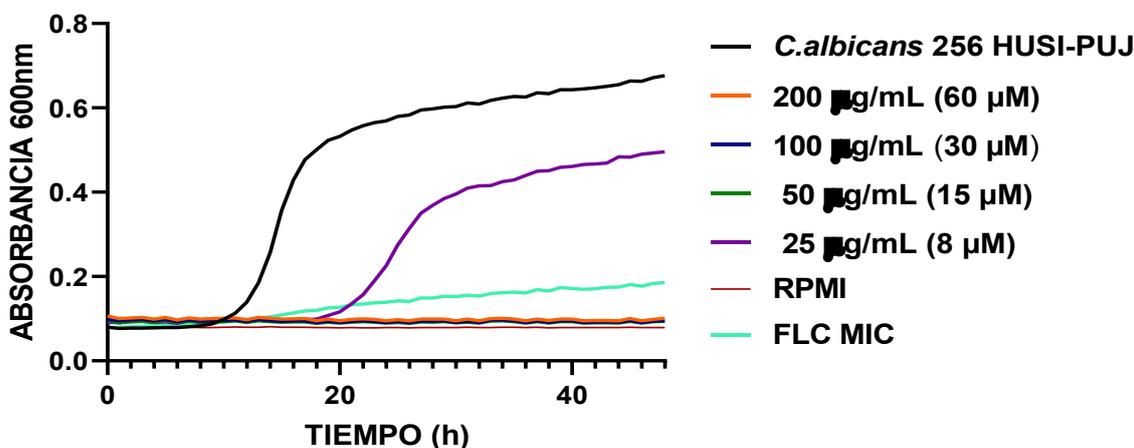


Figura 10. Curva de letalidad de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ cultivada con la quimera ramificada (RRWQWR)₂KXRLLRLLR. La línea negra hace referencia al control de crecimiento de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ, las líneas naranja (200 µg/mL), azul oscuro (100 µg/mL), verde (50 µg/mL) y morado (25 µg/mL), corresponden a las distintas concentraciones del péptido, la línea azul claro es el control de fluconazol a la CMI (64 µg/mL), y la línea roja corresponde al control de esterilidad de la técnica.

En la tabla 4 se observa las concentraciones necesarias para alcanzar efecto fungistático o fungicida de los péptidos quiméricos ramificados, así mismo, se aprecia que el péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR requiere de concentraciones más bajas para eliminar o inhibir el crecimiento de las dos cepas de *C. albicans* 256 HUSI-PUJ

Péptido	<i>C. albicans</i>	CMI µg/mL (µM)	Efecto µg/mL(µM)	
			Fungistático	Fungicida
(RRWQWR) ₂ KXRLLR	SC5314	100(37)	100 (37)	200 (74)
	256HUSI-PUJ	100(37)	50(19)	100 (37)
(RRWQWR) ₂ KXRLLRLLR	SC5314	50(15)	25 (8)	50 (15)
	256HUSI-PUJ	50(15)	25 (8)	50 (15)

Tabla 4. Actividad fungicida o fungistática de las quimeras ramificadas sobre dos cepas de *C. albicans*.

Con los resultados obtenido tanto en la etapa 1 como en la 2, se logra observar que las quimeras peptídicas exhiben una actividad tanto fungistática como fungicida que se conservó en las 48 horas de incubación evaluadas.

6.3 Etapa 3: Efecto hemolítico de los péptidos quiméricos ramificados

El efecto hemolítico se determinó al medir espectrofotométricamente la hemoglobina liberada tras la ruptura de los glóbulos rojos posterior al contacto con distintas concentraciones de los péptidos quiméricos ramificados. Este parámetro se utiliza con la finalidad de establecer la seguridad que poseen estas moléculas al momento de juntarse con los eritrocitos humanos (26).

Las concentraciones de los péptidos utilizados para este ensayo oscilaron entre 1.56 µg/mL y 200 µg/mL. El péptido (RRWQWR)₂KXRLLR en todas las concentraciones evaluadas no presentó efecto hemolítico sobre los eritrocitos, incluso en las concentraciones donde se presenta efecto fungicida (200 µg/mL), esto indica que este péptido no es tóxico para los glóbulos rojos humanos. El péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR a 50µg/mL(15µM) muestra hemólisis del 11.56%, la concentración de 100 µg/mL (30µM) genera hemólisis del 30.72% y para 200 µg/mL (60µM) el efecto hemolítico equivale a 48.38%, cabe resaltar que a 50 µg/mL

se logra obtener efecto fungicida sobre *C. albicans* y simultáneamente a esta concentración provoca 11.56% de hemólisis (Figura 11).

Actividad hemolítica: Quimeras ramificadas

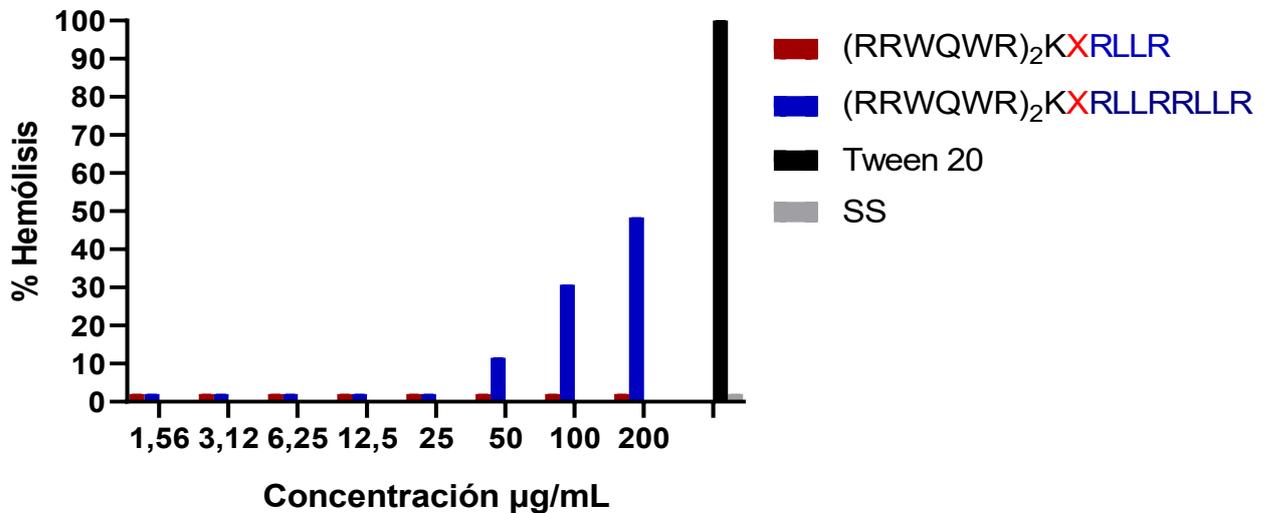


Figura 11. Porcentaje de hemólisis causados por las distintas concentraciones de los péptidos quiméricos ramificados. Las barras en rojo muestran el porcentaje hemolítico del péptido (RRWQWR)₂KXRLLR, las barras azules corresponden al péptido (RRWQWR)₂KXRLLRRLLR, la barra negra es tween 20% utilizado como control positivo o de hemólisis total y la barra roja es el control negativo que contiene solución salina.

En contraste con otras quimeras peptídicas, Xi et al (26) demostraron que el híbrido LHP7 (LfcinB – plectasina) mantuvo actividad hemolítica menor del 5% a medida que las concentraciones del péptido aumentaban hasta 1000 µg/mL, indicando mejores resultados que el péptido (RRWQWR)₂KXRLLRRLLR. La actividad hemolítica de quimeras lineales que contienen los motivos mínimos de LfcinB y BFII fueron evaluadas previamente dentro del grupo de investigación SAMP por Pineda (84), donde se demostró que a concentraciones entre 6.2 µg/mL y 200 µg/mL el péptido RRWQWR-Ahx-RLLR presentó de 3 a 2% de hemólisis y para RRWQWR-Ahx-RLLRRLLR los valores corresponden del 5 al 9%, así mismo el cambio de lisinas por argininas en el péptido RRWQWR-Ahx-KLLKLLK mantuvo la actividad hemolítica de 2 al 9%; por su parte el palíndromo BFII (32-35)_{pal} RLLRRLLR, BFII (32-35) RLLR y LfcinB(20-25) RRWQWR utilizados como controles, arrojaron porcentajes de hemólisis de 63%, 2-1% y 1% respectivamente, en contraste, el péptido quimérico ramificado (RRWQWR)₂KXRLLR en el presente estudio arrojó que a concentraciones de 200 µg/mL no

presenta hemólisis, siendo el péptido que no lisa los glóbulos rojos comparado con las quimeras lineales y los motivos mínimos evaluados por separados (Tabla 5).

Péptido	% Hemólisis	CMI $\mu\text{g/mL}$ (μM)	
		<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. albicans</i> 256 HUSI-PUJ
(RRWQWR)₂KXRLLR	0	100 (37)	100 (37)
(RRWQWR)₂KXRLLRLLR	12	50 (15)	50 (15)
RRWQWR*	1	200(203)	200(203)
RLLRLLR*	2-1	>200(>183)	>200(>183)
RLLR*	63	ND	ND
RRWQWR- ahx-RLLR*	3-2	200 (122)	200 (122)

ND: No determinado

Valores de absorbancia e imágenes de la actividad hemolítica en el Anexo 2

Tabla 5. Porcentajes de hemólisis con respecto a los valores obtenidos de la CMI en *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ de péptidos quiméricos ramificados, lineales y los motivos mínimos evaluados individualmente (34). En negritas corresponde a los péptidos evaluados en este estudio. *Péptidos control, evaluados previamente en nuestro grupo (35).

Al contrastar los porcentajes de hemólisis y los valores de la CMI de los péptidos ramificados con los motivos mínimos determinados individualmente y la quimera lineal RRWQWR-**ahx-RLLR**, se observa que ambas quimeras ramificadas lograron mantener porcentajes de hemólisis similares a sus secuencias análogas lineales y motivos mínimos, sin embargo, las quimeras de este estudio presentaron mejor actividad antifúngica en comparación con los controles.

Vega-Chaparro SC et al (85) determinaron el efecto hemolítico de la ramificación y la polivalencia del motivo mínimo de LfcinB, en este caso péptidos diméricos y palindrómicos a base de esta secuencia no alcanzaron lisis del 50% (ó hemólisis 50%) de los eritrocitos humanos, sin embargo, el péptido tetramérico ramificado expuso 49% de hemólisis a 100 μM , mientras que el motivo mínimo RRWQWR no mostró actividad hemolítica significativa (<7%) a la misma concentración, sugiriendo que el aumento de la polivalencia se relaciona con mayor actividad hemolítico, no obstante el tetrámero ramificado posee mejor actividad antibacteriana comparado con el monómero (85). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en este estudio debido a que (RRWQWR)₂KX**RLLRLLR** que posee un dímero de BFII en el extremo

C-terminal, en comparación que (RRWQWR)₂KX**RLLR** lisa con mayor facilidad los glóbulos rojos, pero tiene mejor actividad antifúngica.

Determinar el efecto hemolítico de un medicamento corresponde a un abordaje inicial *in vitro* de seguridad que una molécula presenta en el organismo, por lo tanto es importante resaltar que el péptido (RRWQWR)₂KX**RLLR** no muestra actividad hemolítica incluso a concentraciones superiores a la CMI/CMF en ambas cepas de *C.albicans*, considerando a este péptido como una posible molécula promisorio para el tratamiento de candidiasis invasiva debido a que no destruye los glóbulos rojos, sin embargo es necesario realizar más estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para tener un panorama más amplio acerca de seguridad.

6.4 Efecto combinado de los péptidos quiméricos ramificados mezclados con fluconazol.

El índice ICIF es la expresión matemática que representan el efecto de combinar agentes antimicrobianos. El ensayo de titulación de tablero de ajedrez da como resultado una serie de ICIF, este valor se calcula reemplazando los valores de la CMI de cada una de las moléculas evaluadas en la siguiente ecuación $ICIF = [(A) / (CMI\ a)] + [(B) / (CMI\ b)]$. Los parámetros dentro de los cuales se determina el efecto obtenido son los siguientes: i) indiferencia se expresa cuando el resultado obtenido al juntar ambas moléculas, se limita a ser igual a la actividad del agente de mayor actividad cuando actúa independientemente, ii) adición es el efecto que resulta de la suma de las actividades de dos antimicrobianos que actúan por separado, iii) antagonismo es la relación negativa en la que el efecto de la combinación es significativamente menor que el efecto de cada compuesto cuando actúa por separado y iv) sinergia, que hace referencia a que el efecto combinado excede la suma de las actividades individuales de los antimicrobianos (77).

a)

(RRWQWR) ₂ KX RLLR	<i>C. albicans</i> SC5314				
100 µg/mL					
50 µg/mL					
25 µg/mL	SINERGIA				
12,5 µg/mL					
6,25 µg/mL					
3,12 µg/mL					
FLC	0,125 µg/mL	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL

b)

(RRWQWR) ₂ KX RLLR	<i>C. albicans</i> 256					
100 µg/mL						
50 µg/mL						
25 µg/mL			ADITIVIDAD			
12,5 µg/mL						
6,25 µg/mL						
3,12 µg/mL						
FLC	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL

c)

(RRWQWR) 2KX R LLR	<i>C. albicans</i> SC5314				
200 µg/mL					
100 µg/mL					
50 µg/mL					
25 µg/mL	SINERGIA				
12,5 µg/mL					
6,25 µg/mL					
FLC	0,125 µg/mL	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL

d)

(RRWQWR) 2KX R LLR	<i>C. albicans</i> 256					
200 µg/mL						
100 µg/mL						
50 µg/mL				Indiferencia		
25 µg/mL						
12,5 µg/mL						
6,25 µg/mL						
FLC	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL

Figura 12. Representación de la microplaca del ensayo titulación en tablero de ajedrez. La imagen a y b corresponden a la combinación de las distintas concentraciones del péptido (RRWQWR)₂KX~~R~~LLR~~R~~LLR junto con fluconazol (FLC) en *C. albicans* SC5314 y 256 respectivamente. La imagen c y d representa el péptido (RRWQWR)₂KX~~R~~LLR junto con fluconazol (FLC) en *C. albicans* SC5314 y 256 respectivamente. Las casillas de color rojo claro hacen referencia a los pozos donde hay un crecimiento <50%, las casillas en rojo oscuro son aquellas donde hay un desarrollo similar al del control de crecimiento, y la casilla verde corresponde al mayor efecto que se obtuvo al mezclar ambos tratamientos. Valores de absorbancia de cada pozo se observa en el Anexo 3.

Teniendo en cuenta los desafíos y limitaciones que presentan los antifúngicos convencionales, un enfoque alternativo y prometedor es mejorar o potenciar la actividad de estos medicamentos al combinarlos con otros agentes antimicrobianos, en este caso moléculas de carácter peptídico (PAMs). Mezclar agentes antimicóticos puede aumentar la eficacia, reducir la dosis terapéutica, y al actuar sobre múltiples blancos celulares, se puede evitar el desarrollo de resistencia (86),(28).

Como se observa en la tabla 6, la quimera (RRWQWR)₂KX~~R~~LLR~~R~~LLR es el péptido con mayor actividad anti-Candida. La combinación de esta quimera ramificada junto con FLC, evidenció efecto sinérgico cuando se mezcla concentraciones de 50 µg/mL del péptido y 0.125 µg/mL para FLC, arrojando como valor ICIF= 0.5 en *C. albicans* SC5314, también se observa reducción de dos y cuatro veces la CMI respectivamente. En *C. albicans* 256 HUSI/PUJ se observa efecto aditivo cuando se combinan las dos moléculas a concentraciones Sub-CMI. Este último resultado está acorde con el obtenido previamente con el péptido lineal KKWQWK-

Ahx-**RLLRLLR** al cual se le sustituyó las Arg por Lys que registra aditividad al co-cultivarse con las mismas concentraciones de FLC junto *C.albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ (35), sin embargo, la quimera (RRWQWR)₂K**XRLLRLLR** en el presente estudio logró obtener relación se sinergia de la quimera ramificada en la cepa de referencia.

El péptido (RRWQWR)₂K**XRLLR** mostró el mismo efecto que la quimera mencionada anteriormente sobre *C. albicans* SC5314, ya que exhibió sinergia en esta cepa, sin embargo, la combinación de la quimera ramificada en *C.albicans* HUSI-PUJ 256 se presentó indiferencia.

Resultados sinergia							
Cepa	Péptido	CMI _a	CMI _b	A	B	ICIF	CMI _a /A
<i>C.albicans</i> SC5314	KKWQWK-Ahx - RLLRLLR *	50	1	0.5	25	1.0-1.5	2
	(RRWQWR) ₂ K XRLLR	200	0.5	25	0.125	0.38	8
	(RRWQWR) ₂ K XRLLRLLR	100	0.5	25	0.125	0.5	4
<i>C.albicans</i> 256 HUSI/PUJ	KKWQWK-Ahx - RLLRLLR *	50	64	25	32	0.6-1.0	2
	(RRWQWR) ₂ K XRLLR	100	32	50	32	1.5	2
	(RRWQWR) ₂ K XRLLRLLR	50	32	25	16	1	2

Tabla 6. Efecto al combinar los péptidos quiméricos ramificados con fluconazol sobre las cepas de *C.albicans* SC5314 y 256 HUSI/PUJ. CMI_a y CMI_b corresponde a la CMI (µg/ml) del péptido quimérico ramificado y fluconazol respectivamente, A y B son los valores de CMI al combinar los péptidos y el fluconazol. Índice de concentración mínima fraccional (ICIF) y la CMI_a/A, representa la diferencia al evaluar los péptidos individualmente y en combinación con fluconazol * Péptido control, evaluados previamente en nuestro grupo (35).

Al identificar efecto sinérgico entre los péptidos quiméricos ramificados junto con fluconazol, se potencia considerablemente la actividad anti-Candida para ambas moléculas, demostrando que se necesitan concentraciones mas bajas tanto del péptido como del fluconazol para eliminar o inhibir el crecimiento de las dos cepas fúngicas comparado cuando se determina su actividad individualmente. Esta característica manifiesta que se podría utilizar la anterior interacción como posible terapia combinada para *C. albicans*.

7. CONCLUSIONES

Las cepas de *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ sensible y resistente a fluconazol respectivamente, muestran la misma susceptibilidad frente a cada uno de las quimeras ramificadas, esto evidencia que la actividad antifúngica de los péptidos evaluados no se afecta por los mecanismos de resistencia a los antifúngicos convencionales.

Los péptidos quiméricos ramificados presentan mayor actividad antifúngica comparado con péptidos quiméricos lineales y los motivos mínimos de LfcinB y BFII cuando se evalúan por separado, siendo la ramificación y la polivalencia factores que pueden potenciar la actividad antifúngica de PAMs.

Se identificó un efecto fungicida y fungistático para ambas quimeras evaluadas a concentraciones de 50 µg/mL (15µM) para (RRWQWR)₂KXRLLRLLR, y (100µg/mL (37µM)) para.(RRWQWR)₂KXRLLR.

No se exhibió actividad hemolítica para el péptido (RRWQWR)₂KXRLLR incluso a concentraciones por encima de la CMI, de la misma manera, se logró mantener la actividad antifúngica de las quimeras peptídicas en comparación con las secuencias lineales análogas y los motivos evaluados por separado.

Se observó relación de sinergia cuando se evaluaron ambos péptidos quiméricos ramificados en combinación con fluconazol en *C. albicans* SC5314, disminuyendo dos veces la CMI para los péptidos y cuatro veces para el fluconazol, esta característica hace que se pueda potenciar la actividad antifúngica de ambas moléculas, siendo importante este resultado para el uso de terapias combinadas.

Se presentó efecto aditivo al momento de combinar el péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR con fluconazol e indiferencia cuando se evaluó (RRWQWR)₂KXRLLR con el mismo antifúngico en la cepa *C. albicans* 256 HUSI-PUJ.

6. Referencias Bibliográficas.

1. Gudat W, Heizmann W, Hockertz S, Nolting S. Candida Albicans. *Z Allgemeinmed.* 1998;74(17–18):782–5.
2. Basmaciyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P, Dalle F. “Candida Albicans Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier.” *Tissue Barriers* [Internet]. 2019;7(2):1–31. Available from: <https://doi.org/10.1080/21688370.2019.1612661>
3. Oberoi JK. Invasive candidiasis [Internet]. Campion EW, editor. Vol. 23, *Journal International Medical Sciences Academy*. 2010 [cited 2021 Feb 19]. p. 25–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>
4. Bartlett JG. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Infect Dis Clin Pract.* 2004;12(6):376.
5. Bedout C de, Gómez BL. Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio.* 2010;14(94):159–71.
6. Valencia A, Páez A, Sampedro M, Ávila C, Cardona J, Mesa C. Candidemia en Colombia. *Biomédica.* 2020;40(1):1–33.
7. Maestre Vera JR, Alou Cervera L. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico [Internet]. Vol. 14, *Revista Espanola de Quimioterapia*. 2001 [cited 2021 Feb 19]. p. 232–7. Available from: https://seq.es/seq/html/revista_seq/0301/rev1.html
8. Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
9. Parente-Rocha JA, Bailão AM, Amaral AC, Taborda CP, Paccez JD, Borges CL, et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. *Mediators Inflamm.* 2017;2017.
10. K. Mazu T, A. Bricker B, Flores-Rozas H, Y. Ablordeppey S. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini-Reviews Med Chem.* 2016;16(7):555–78.
11. Organización Mundial de la Salud. Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos [Internet]. Who. 2017 [cited 2021 Feb 19]. p. 1–3. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
12. Bondaryk M, Staniszewska M, Zielińska P, Urbańczyk-Lipkowska Z. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. Vol. 3, *Journal of Fungi*. 2017.

13. Lachowicz JI, Szczepski K, Scano A, Casu C, Fais S, Orrù G, et al. The Best Peptidomimetic Strategies to Undercover Antibacterial Peptides. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 7349 [Internet]. 2020 Oct 5 [cited 2021 Sep 15];21(19):7349. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7349/htm>
14. Moghaddam MM, Abolhassani F, Babavalian H, Mirnejad R, Barjini KA, Amani J. Comparison of in vitro antibacterial activities of two cationic peptides CM15 and CM11 against five pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*. *Probiotics Antimicrob Proteins* [Internet]. 2012 Jun 4 [cited 2021 Dec 2];4(2):133–9. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/article/10.1007/s12602-012-9098-7>
15. Vargas-Casanova Y, Carlos Villamil Poveda J, Jenny Rivera-Monroy Z, Ceballos Garzón A, Fierro-Medina R, Le Pape P, et al. Palindromic Peptide LfcinB (21-25)Pal Exhibited Antifungal Activity against Multidrug-Resistant *Candida*. *ChemistrySelect*. 2020;5(24):7236–42.
16. EL LARGO CAMINO HACIA EL ANTIFÚNGICO IDEAL [Internet]. [cited 2021 Feb 19]. Available from: <https://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/99235>
17. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*. 2014;7(5):545–94.
18. Brogden NK, Brogden KA, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011;38(3):217–25. Available from: <http://clinicaltrials.gov/>
19. Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, Teraguchi S, Takase M, Hayasawa H. N-acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activityfile:///C:/Users/mateo/Downloads/25.pdf. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1267–9.
20. Rodríguez-Franco DA, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev Latinoam Microbiol*. 2005;47(3–4):102–11.
21. Kuipers ME, De Vries HG, Eikelboom MC, Meijer DKF, Swart PJ. Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(11):2635–41.
22. Fernandes KE, Weeks K, Carter DA. Lactoferrin Is Broadly Active against Yeasts and Highly Synergistic with Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Sep 15];64(5). Available from: [/pmc/articles/PMC7179636/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37179636/)

23. Wakabayashi H, Abe S, Teraguchi S, Hayasawa H, Yamaguchi H. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(7):1587–91.
24. Chang C-K, Kao M-C, Lan C-Y. Antimicrobial Activity of the Peptide LfcinB15 against *Candida albicans*. *J Fungi* 2021, Vol 7, Page 519 [Internet]. 2021 Jun 29 [cited 2021 Sep 15];7(7):519. Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/7/519/htm>
25. Feng X, Liu C, Guo J, Song X, Li J, Xu W, et al. Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2012 Sep 22 [cited 2021 Dec 2];95(5):1191–8. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/article/10.1007/s00253-011-3816-z>
26. Xi D, Teng D, Wang X, Mao R, Yang Y, Xiang W, et al. Design, expression and characterization of the hybrid antimicrobial peptide LHP7, connected by a flexible linker, against *Staphylococcus* and *Streptococcus*. *Process Biochem*. 2013 Mar 1;48(3):453–61.
27. Jang SA, Kim H, Lee JY, Shin JR, Kim DJ, Cho JH, et al. Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. *Peptides* [Internet]. 2012 [cited 2021 Dec 2];34(2):283–9. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0196978112000368>
28. Roshanak S, Shahidi F, Yazdi FT, Javadmanesh A, Movaffagh J. Evaluation of Antimicrobial Activity of Buforin I and Nisin and the Synergistic Effect of Their Combination as a Novel Antimicrobial Preservative. *J Food Prot* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Dec 2];83(11):2018–25. Available from: <https://doi.org/10.4315/JFP-20-127>
29. Cho JH, Sung BH, Kim SC. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(8):1564–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.025>
30. Jang WS, Kim HK, Lee KY, Kim SA, Han YS, Lee IH. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Lett*. 2006;580(5):1490–6.
31. González L, Muñoz C, Celis A. Evaluación de la actividad inhibidora de los péptidos antimicrobianos Buforina II y Frenatin 2.3S ante *Malassezia* spp [Internet].

- instname:Universidad de los Andes. Uniandes; 2019 [cited 2021 Feb 19]. Available from: <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/45818>
32. Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Jul 18 [cited 2021 Dec 2];97(15):8245–50. Available from: [/pmc/articles/PMC26932/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)
 33. Huertas Méndez NDJ, Vargas Casanova Y, Gómez Chimbi AK, Hernández E, Leal Castro AL, Melo Diaz JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules* [Internet]. 2017 Mar 12 [cited 2021 Dec 2];22(3):452. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/3/452/htm>
 34. Pineda-Castañeda HM, Huertas-Ortiz KA, Leal-Castro AL, Vargas-Casanova Y, Parra-Giraldo CM, García-Castañeda JE, et al. Designing Chimeric Peptides: A Powerful Tool for Enhancing Antibacterial Activity. *Chem Biodivers* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Dec 2];18(2):e2000885. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbdv.202000885>
 35. Aguirre-guataqui K, Pineda-castañeda H, Ceballos-garzon A, Vargas-casanova Y, García-castañeda J, Parra-giraldo CM. Chimeric peptides derived from Bovine Lactoferricin and Buforin II : antifungal activity against reference strains and clinical isolates of *Candida* spp. 2021;1–16.
 36. Liu SP, Zhou L, Lakshminarayanan R, Beuerman RW. Multivalent antimicrobial peptides as therapeutics: Design principles and structural diversities. *Int J Pept Res Ther*. 2010;16(3):199–213.
 37. Romo JA, Pierce CG, Esqueda M, Hung C-Y, Saville SP, Lopez-Ribot JL. In Vitro Characterization of a Biaryl Amide Anti-virulence Compound Targeting *Candida albicans* Filamentation and Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 Jul 10 [cited 2021 Sep 15];8(JUL). Available from: [/pmc/articles/PMC6048184/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
 38. Chow EWL, Pang LM, Wang Y. From Jekyll to Hyde: The Yeast–Hyphal Transition of *Candida albicans*. *Pathog* 2021, Vol 10, Page 859 [Internet]. 2021 Jul 7 [cited 2021 Sep 15];10(7):859. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/7/859/htm>
 39. C d'Enfert. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2021 Sep 15];12(4):358–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19541532/>
 40. S H, S M, B H. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host

- defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Sep 15];54(3):149–69. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26920876/>
41. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front Microbiol*. 2020 Jan 9;0:2993.
 42. C d'Enfert, AK K, LR A, S C, N C, M D, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 15];45(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33232448/>
 43. LN M, IM van der H, SF C, AP S, RA S, S G, et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* [Internet]. 2009 [cited 2021 Sep 15];72(1):9–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19303662/>
 44. J T, M J, T M, E P, S B, I K, et al. *Candida albicans*- The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J fungi (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Sep 15];7(2):1–19. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499276/>
 45. Pereira R, Fontenelle RO dos S, Brito EHS de, Morais SM de. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2021 Sep 15];131(1):11–22. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14949>
 46. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos [Internet]. [cited 2021 Sep 15]. Available from:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052012000100005
 47. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2017 161 [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2021 Sep 15];16(1):19–31. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.107>
 48. Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathol* 2014 1775 [Internet]. 2014 May 1 [cited 2021 Sep 15];177(5):223–40. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-014-9749-1>
 49. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P.

- Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019 Dec 1;52:1–6.
50. Rivera-Toledo E, Uriel Jiménez-Delgadillo A, Manzano-Gayosso P, para correspondencia A, Rivera Toledo E. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. 2020 [cited 2021 Sep 15];63. Available from: <http://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02>
 51. Cortés L JA, Russi N JA. Equinocandinas. *Rev Chil infectología* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Sep 15];28(6):529–36. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000700004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 52. Cervera C. Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012 Oct 1;30(8):483–91.
 53. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Dijk P Van. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *J Fungi* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Sep 15];6(4):1–20. Available from: </pmc/articles/PMC7724567/>
 54. Fattouh N, Hdayed D, Geukgeuzian G, Tokajian S, Khalaf RA. Molecular mechanism of fluconazole resistance and pathogenicity attributes of Lebanese *Candida albicans* hospital isolates. *Fungal Genet Biol.* 2021 Aug 1;153:103575.
 55. Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of *fks1* Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: Implications for Interpretive Breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009 Jan [cited 2021 Sep 15];53(1):112. Available from: </pmc/articles/PMC2612148/>
 56. Shwaiki LN, Lynch KM, Arendt EK. Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application – A focus on synthetic peptides. *Trends Food Sci Technol.* 2021 Jun 1;112:312–24.
 57. Alberto Téllez G, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos Antimicrobial peptides. 2010 [cited 2021 Sep 15];14(1):55–67. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
 58. Mwangi J, Hao X, Lai R, Zhang ZY. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res.* 2019;40(6):488–505.
 59. Lima PG, Oliveira JTA, Amaral JL, Freitas CDT, Souza PFN. Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sci.* 2021 Aug 1;278:119647.
 60. Agüero E, Quijada P, García-Novo MD. Adición de lactoferrina a las fórmulas de inicio. *An Pediatría Contin* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2022 Jan 30];6(2):103–7.

Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-adicion-lactoferrina-formulas-inicio-S1696281808748613>

61. Mexicana AF, México AC, Serrano D, Elisa M. 3, julio-septiembre. *Rev Mex Ciencias Farm* [Internet]. 2007 [cited 2022 Jan 30];38:30–8. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938306>
62. Zhang T, Yang W, Liu N. Effect of loop structure of bovine lactoferricin on apoptosis in Jurkat cells. *BioMetals* 2010 233 [Internet]. 2010 Mar 17 [cited 2021 Sep 16];23(3):555–61. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-010-9324-2>
63. Wang L, Wang YL, Lv ZL, Zhang E peng, Guo A zhen. Design of bovine lactoferricin-derived peptide and its expression and activity in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jan 1;534:822–9.
64. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*. 2003 Nov 1;40(7):395–405.
65. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties [Internet]. Vol. 62, Cellular and Molecular Life Sciences. *Cell Mol Life Sci*; 2005 [cited 2021 Sep 16]. p. 2588–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16261252/>
66. Huertas N de J, Monroy ZJR, Medina RF, Castañeda JEG. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Mol A J Synth Chem Nat Prod Chem* [Internet]. 2017 Jun 14 [cited 2021 Sep 16];22(6). Available from: </pmc/articles/PMC6152618/>
67. Roshanak S, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Javadmanesh A, Movaffagh J. Buforin I an alternative to conventional antibiotics: Evaluation of the antimicrobial properties, stability, and safety. *Microb Pathog* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2021 Dec 2];161:105301. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401021005751>
68. Park CB, Kim MS, Kim SC. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo* gargarizans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 5;218(1):408–13.
69. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Mar 6;244(1):253–7.
70. Pavia KE, Spinella SA, Elmore DE. Novel Histone-Derived Antimicrobial Peptides

- Use Different Antimicrobial Mechanisms. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Dec 2];1818(3):869. Available from: [/pmc/articles/PMC3273674/](#)
71. Castañeda HM. Péptidos Quiméricos Derivados De La Lactoferricina Bovina Y La Buforina: Síntesis, Caracterización Y Evaluación De Su Actividad Antibacteriana. Tesis Maest [Internet]. 2019 [cited 2021 Dec 2];34. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76691>
 72. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. [Internet]. CLSI document M07-A9(2012.). [cited 2021 Sep 16]. Available from: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
 73. M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline This document provides procedures for determining the lethal activity of antimicrobial agents. 1999 [cited 2021 Sep 16]; Available from: www.clsi.org.
 74. Solarte VA, Rosas JE, Rivera ZJ, Arango-Rodríguez ML, García JE, Vernot JP. A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin exhibits specific cytotoxic effects against oral squamous-cell carcinoma cell lines. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/630179>
 75. Ježíková Z, Pagáč T, Vígláš J, Pfeiferová B, Šoltys K, Bujdáková H, et al. Synergy Over Monotherapy. *Curr Microbiol* [Internet]. 2019 Apr 2 [cited 2022 Feb 16];76(6):673–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-019-01678-9>
 76. Wei G-X, Campagna AN, Bobek LA. Factors affecting antimicrobial activity of MUC7 12-mer, a human salivary mucin-derived peptide. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007 61 [Internet]. 2007 Nov 11 [cited 2021 Sep 16];6(1):1–10. Available from: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-6-14>
 77. Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology E, Diseases I. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2022 Jan 21];6(9):503–8. Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14631578/fulltext>
 78. Lakshminarayanan R, Liu S, Li J, Nandhakumar M, Aung TT, Goh E, et al. Synthetic Multivalent Antifungal Peptides Effective against Fungi. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 3 [cited 2022 Feb 24];9(2):87730. Available from: [/pmc/articles/PMC3912015/](#)

79. Yang C, Guo S, Wu X, Yang P, Han L, Dai X, et al. Multiscale study on the enhancing effect and mechanism of borneolum on transdermal permeation of drugs with different log P values and molecular sizes. *Int J Pharm.* 2020 Apr 30;580:119225.
80. Klubthawee N, Adisakwattana P, Hanpithakpong W, Somsri S, Aunpad R. A novel, rationally designed, hybrid antimicrobial peptide, inspired by cathelicidin and aurein, exhibits membrane-active mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1). Available from: www.nature.com/scientificreports
81. Arfa A Ben, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure.
82. Wade HM, Darling LEO, Elmore DE. Hybrids Made from Antimicrobial Peptides with Different Mechanisms of Action Show Enhanced Membrane Permeabilization. *Biochim Biophys acta Biomembr* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Jan 21];1861(10):182980. Available from: [/pmc/articles/PMC6721965/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3182980/)
83. Arias M, McDonald LJ, Haney EF, Nazmi K, Bolscher JGM, Vogel HJ. Bovine and human lactoferricin peptides: Chimeras and new cyclic analogs. *BioMetals* [Internet]. 2014 Sep 5 [cited 2022 Jan 21];27(5):935–48. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/article/10.1007/s10534-014-9753-4>
84. Pineda HM. PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE LA LACTOFERRICINA BOVINA Y LA BUFORINA: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. 2019;
85. Vega Chaparro SC, Valencia Salguero JT, Martínez Baquero DA, Rosas Pérez JE. Effect of Polyvalence on the Antibacterial Activity of a Synthetic Peptide Derived from Bovine Lactoferricin against Healthcare-Associated Infectious Pathogens. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jan 21];2018. Available from: [/pmc/articles/PMC6015718/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3015718/)
86. Lai YW, Campbell LT, Wilkins MR, Pang CNI, Chen S, Carter DA. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Oct 1;48(4):388–94.

Anexos.

Anexo 1. CMI y CMF.

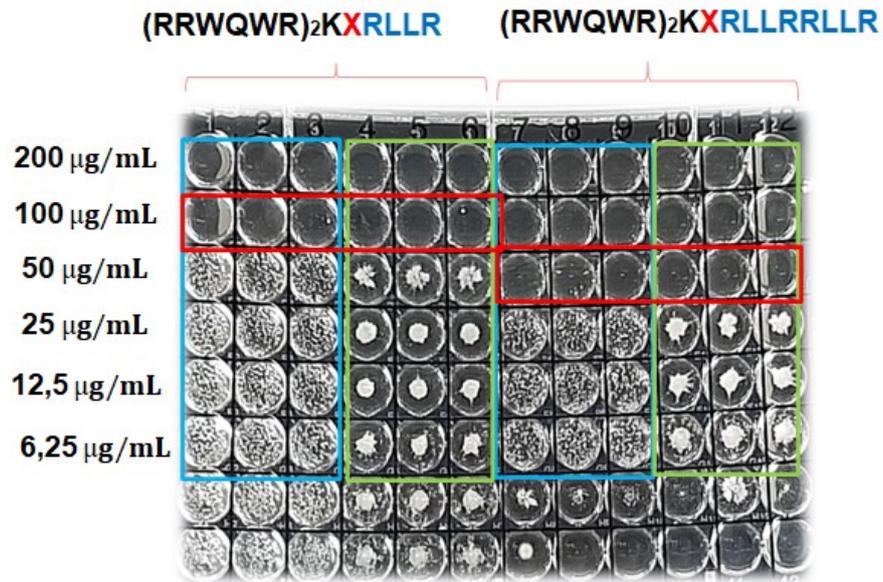
Valores de absorbancia obtenidas a una longitud de onda de 595 nm. En verde se observa el valor de la CMI.

a. *C.albicans* SC5314

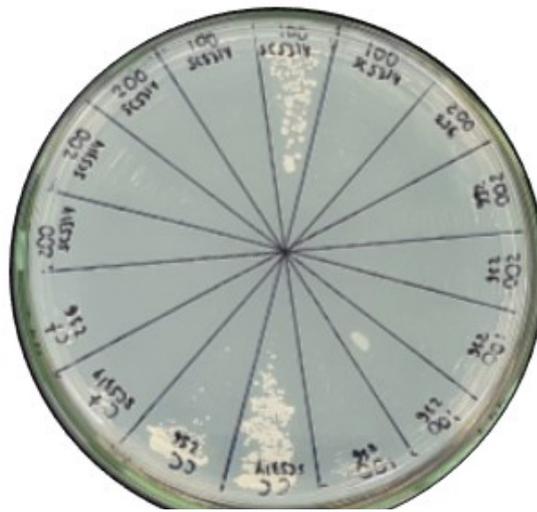
(RRWQWR) ₂ KX R LLLR										
Inóculo 0.5 – 2.5x 10 ³ UFC/mL										
Péptido (µg/mL)	200	100	50	25	12.5	6.25	C+	C-	CT	CC
Rep 1	0.049	0.046	0.274	0.207	0.222	0.201	0.083	0.200	0.096	0.169
Rep 2	0.046	0.049	0.254	0.274	0.187	0.254	0.067	0.184	0.076	0.160
Rep 3	0.052	0.046	0.291	0.268	0.228	0.226	0.115	0.254	0.050	0.170
(RRWQWR) ₂ KX R LLLRLLLR										
Inóculo 0.5 – 2.5x 10 ³ UFC/mL										
Rep 1	0.201	0.059	0.054	0.241	0.201	0.126	0.083	0.200	0.096	0.169
Rep 2	0.067	0.055	0.058	0.256	0.211	0.225	0.067	0.184	0.076	0.160
Rep 3	0.054	0.05	0.05	0.267	0.234	0.16	0.115	0.254	0.050	0.170

b. *C.albicans* PUJ256

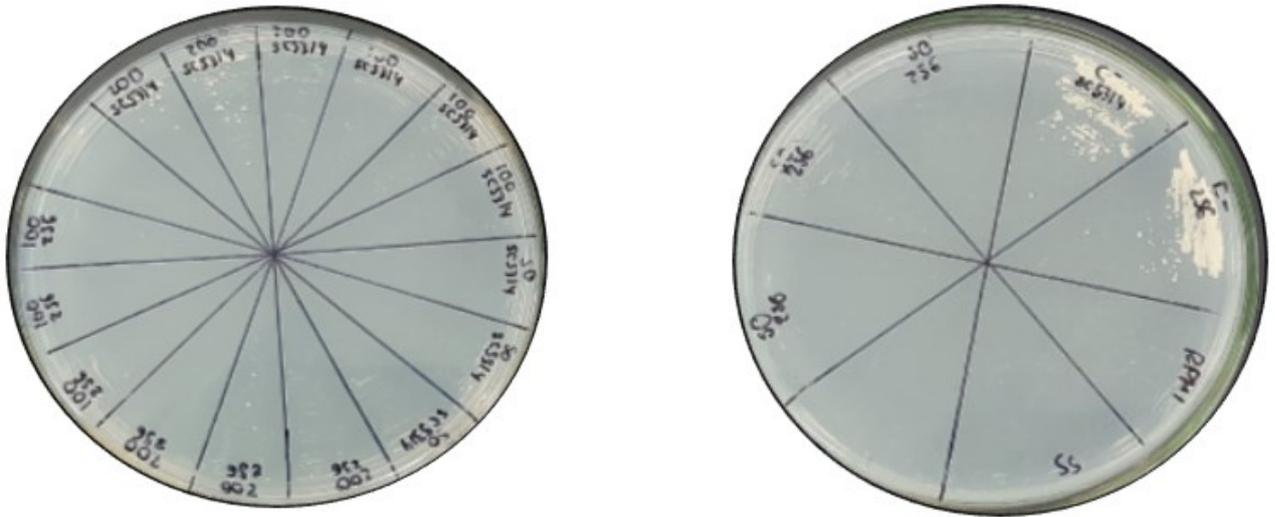
(RRWQWR) ₂ KX R LLLR										
Inóculo 0.5 – 2.5x 10 ³ UFC/mL										
Péptido (µg/mL)	200	100	50	25	12.5	6.25	C+	C-	CT	CC
Rep 1	0,057	0,044	0,211	0,241	0,225	0,266	0,096	0,306	0,096	0,306
Rep 2	0.052	0.047	0.252	0.225	0.231	0.271	0.076	0.288	0.076	0.288
Rep 3	0.054	0.063	0.246	0.23	0.245	0.275	0.175	0.308	0.050	0.309
(RRWQWR) ₂ KX R LLLRLLLR										
Inóculo 0.5 – 2.5x 10 ³ UFC/mL										
Rep 1	0.06	0.05	0.056	0.24	0.266	0.302	0.096	0.306	0.096	0.306
Rep 2	0.057	0.05	0.048	0.229	0.278	0.29	0.076	0.288	0.076	0.288
Rep 3	0.054	0.05	0.05	0.234	0.276	0.312	0.175	0.308	0.050	0.309



Distribución de la placa multipozo para el ensayo de microdilución en caldo, los cuadros color verde hacen referencia a *C.albicans* 256 HUSI-PUJ, en azul a *C.albicans* SC5314 y en rojo la CMI para cada uno de los péptidos.



CMF de (RRWQWR)₂KXRLLR



CMF de (RRWQWR)₂KXRLLRLLR

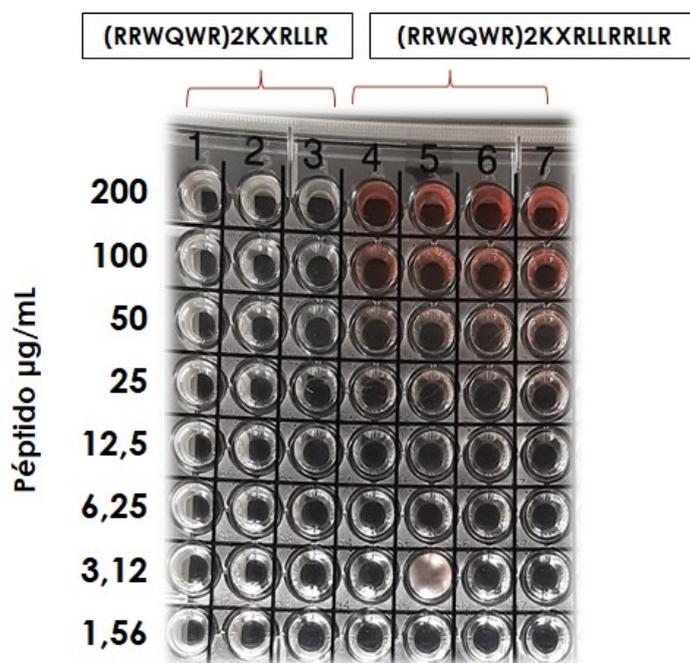
Placas de agar sabouraud distribuidas para determinar CMF

Anexo 2. Actividad hemolítica.

Valores de absorbancia obtenidas a una longitud de onda de 450 nm.

Péptido (µg/mL)	(RRWQWR) ₂ KXRLLR			(RRWQWR) ₂ KXRLLRLLR		
	Rep 1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep 3
200	0,052	0,06	0,045	0,523	0,618	0,514
100	0,045	0,048	0,045	0,347	0,381	0,368
50	0,053	0,052	0,049	0,147	0,181	0,162
25	0,04	0,04	0,042	0,086	0,117	0,108
12.5	0,043	0,043	0,041	0,045	0,088	0,054
6.25	0,04	0,042	0,041	0,04	0,066	0,045
3.12	0,042	0,05	0,045	0,042	0,05	0,041
1.26	0,046	0,063	0,044	0,051	0,044	0,043
Twen 20	1,031	1,097	1,16	1,031	1,097	1,16
Solución Salina	0,039	0,037	0,048	0,039	0,037	0,048

Sobrenadantes de la solución de glóbulos rojos con los péptidos



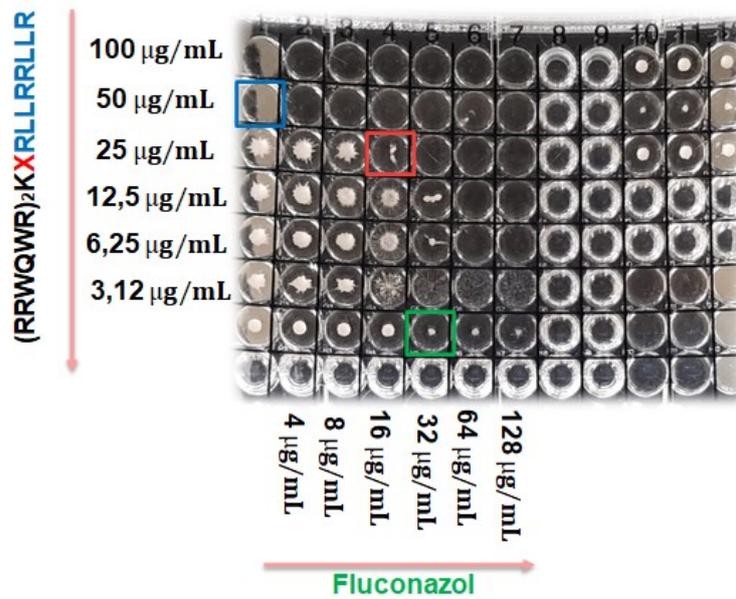
Sobrenadantes de la solución de glóbulos rojos con las quimeras peptídicas ramificadas posterior a la incubación.

Anexo 3. Titulación en tablero de ajedrez

Valores de absorbancia obtenidas a una longitud de onda de 595 nm. En rojo se hace referencia a los valores de las concentraciones de los péptidos, en azul corresponde a los a las concentraciones de fluconazol, en negro las absorbancias obtenidas de cada una de las combinaciones y en verde se presenta el control de crecimiento. Las casillas amarillas indican la CMI de cada una de las moléculas y en morado la CMI cuando se combinan.

a. *C. albicans* 256 HUSI-PUJ

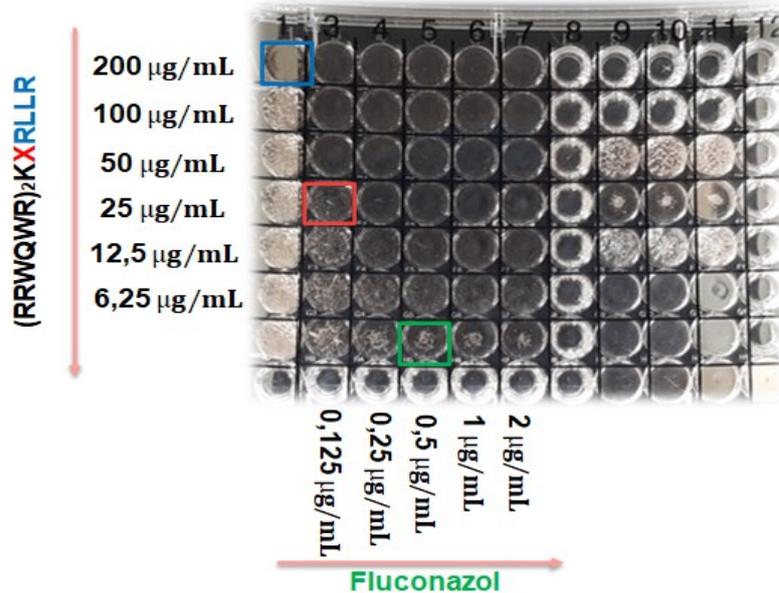
(RRWQWR)2KXRLLRLLL	2XCMI	2XCMI+0.06	2XCMI+0.12	2XCMI+0.25	2XCMI+0.5	2XCMI+CMI	2XCMI+2XCMI
	0,058	0,046	0,062	0,053	0,058	0,062	0,061
	CMI	CMI+0.06	CMI+0.12	CMI+0.25	CMI+0.5	CMI+CMI	CMI+2XCMI
	0,089	0,053	0,073	0,059	0,058	0,099	0,057
	0.5CMI	0.5CMI+0.06	0.5CMI+0.12	0.5CMI+0.25	0.5CMI+0.5	0.5CMI+CMI	0.5CMI+2XCMI
	0,317	0,285	0,257	0,109	0,057	0,055	0,052
	0.25	0.25+0.06	0.25+0.12	0.25+0.25	0.25+0.5	0.25+CMI	0.25+2XCMI
	0,321	0,303	0,274	0,248	0,173	0,056	0,056
0.12	0.12+0.06	0.12+0.12	0.12+0.25	0.12+0.5	0.12+CMI	0.12+2XCMI	
0,327	0,306	0,294	0,255	0,129	0,085	0,067	
0.06	0.06+0.06	0.06+0.12	0.06+0.25	0.06+0.5	0.06+CMI	0.06+2XCMI	
0,308	0,296	0,266	0,2	0,108	0,101	0,104	
CC	0.06	0.12	0.25	0.5	CMI	2XCMI	
0,304	0,276	0,268	0,224	0,087	0,079	0,09	
Fluconazol							



Absorbancias y distribución de la placa al combinar del péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR junto con Fluconazol en *C.albicans* 256 HUSI-PUJ.

b. *C.albicans* SC5314.

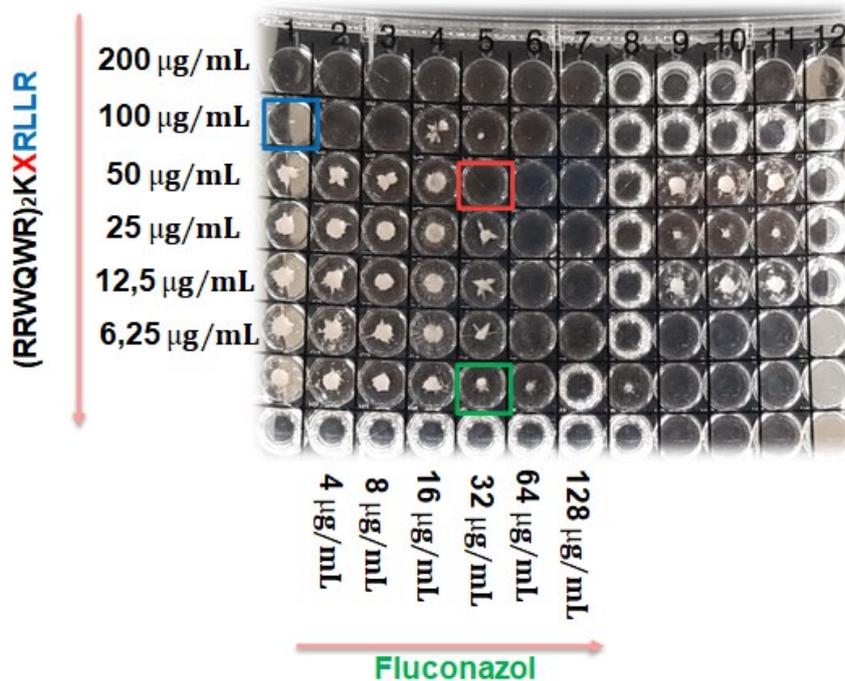
(RRWQWR) ₂ KXRLLR	2XCMI 0,07	2XCMI+0.12 0,062	2XCMI+0.25 0,057	2XCMI+0.5 0,057	2XCMI+CMI 0,057	2XCMI+2XCMI 0,055
	CMI 0,191	CMI+0.12 0,06	CMI+0.25 0,067	CMI+0.5 0,069	CMI+CMI 0,062	CMI+2XCMI 0,062
	0.5CMI 0,189	0.5CMI+0.12 0,07	0.5CMI+0.25 0,07	0.5CMI+0.5 0,081	0.5CMI+CMI 0,073	0.5CMI+2XCMI 0,072
	0.25 0,153	0.25+0.12 0,092	0.25+0.25 0,064	0.25+0.5 0,087	0.25+CMI 0,082	0.25+2XCMI 0,091
	0.12 0,134	0.12+0.12 0,167	0.12+0.25 0,094	0.12+0.5 0,105	0.12+CMI 0,091	0.12+2XCMI 0,079
	0.06 0,126	0.06+0.12 0,189	0.06+0.25 0,132	0.06+0.5 0,11	0.06+CMI 0,096	0.06+2XCMI 0,084
	CC 0,117	0.12 0,211	0.25 0,154	0.5 0,105	CMI 0,093	2XCMI 0,093
	Fluconazol					



Absorbancias y distribución de la placa al combinar del péptido (RRWQWR)₂KXRLLR junto con Fluconazol en *C.albicans* SC5314.

c. *C.albicans* 256 HUSI-PUJ.

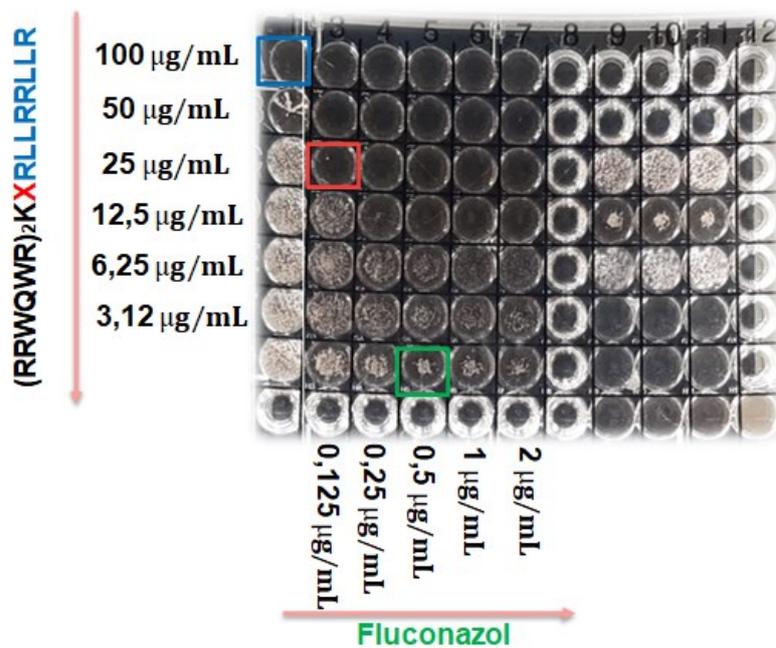
(RRWQWR) ₂ KXRLLR	2XCMI	2XCMI+0.06	2XCMI+0.12	2XCMI+0.25	2XCMI+0.5	2XCMI+CMI	2XCMI+2XCMI
	0,048	0,052	0,056	0,049	0,049	0,047	0,046
	CMI	CMI+0.06	CMI+0.12	CMI+0.25	CMI+0.5	CMI+CMI	CMI+2XCMI
	0,086	0,065	0,057	0,203	0,072	0,099	0,054
	0.5CMI	0.5CMI+0.06	0.5CMI+0.12	0.5CMI+0.25	0.5CMI+0.5	0.5CMI+CMI	0.5CMI+2XCMI
	0,297	0,273	0,263	0,287	0,052	0,05	0,048
	0.25	0.25+0.06	0.25+0.12	0.25+0.25	0.25+0.5	0.25+CMI	0.25+2XCMI
	0,273	0,294	0,285	0,246	0,212	0,048	0,053
0.12	0.12+0.06	0.12+0.12	0.12+0.25	0.12+0.5	0.12+CMI	0.12+2XCMI	
0,327	0,319	0,277	0,246	0,225	0,053	0,06	
0.06	0.06+0.06	0.06+0.12	0.06+0.25	0.06+0.5	0.06+CMI	0.06+2XCMI	
0,316	0,296	0,274	0,257	0,196	0,06	0,056	
CC	0.06	0.12	0.25	0.5	CMI	2XCMI	
0,359	0,336	0,323	0,259	0,17	0,061	0,045	
Fluconazol							



Absorbancias y distribución de la placa al combinar del péptido (RRWQWR)₂KXRLLR junto con Fluconazol en *C.albicans* 256 HUSI-PUJ .

d. *C. albicans* SC5314

(RRWQWR) ₂ KXRLLR	2XCMI 0,054	2XCMI+0.12 0,049	2XCMI+0.25 0,047	2XCMI+0.5 0,051	2XCMI+CMI 0,047	2XCMI+2XCMI 0,048
	CMI 0,208	CMI+0.12 0,048	CMI+0.25 0,052	CMI+0.5 0,051	CMI+CMI 0,05	CMI+2XCMI 0,055
	0.5CMI 0,291	0.5CMI+0.12 0,049	0.5CMI+0.25 0,051	0.5CMI+0.5 0,054	0.5CMI+CMI 0,05	0.5CMI+2XCMI 0,051
	0.25 0,224	0.25+0.12 0,157	0.25+0.25 0,075	0.25+0.5 0,072	0.25+CMI 0,061	0.25+2XCMI 0,065
	0.12 0,183	0.12+0.12 0,21	0.12+0.25 0,17	0.12+0.5 0,125	0.12+CMI 0,089	0.12+2XCMI 0,083
	0.06 0,172	0.06+0.12 0,169	0.06+0.25 0,162	0.06+0.5 0,133	0.06+CMI 0,112	0.06+2XCMI 0,105
	CC 0,185	0.12 0,224	0.25 0,168	0.5 0,112	CMI 0,11	2XCMI 0,097
Fluconazol						



Absorbancias y distribución de la placa al combinar del péptido (RRWQWR)₂KXRLLRLLR junto con Fluconazol en *C. albicans* SC5314.