

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

Presentado por:

Mateo Márquez Torres

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

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

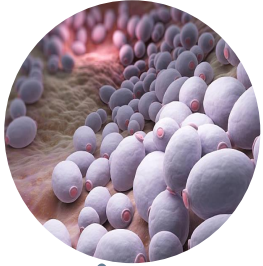
MSc. Yerly Vargas Casanova

Pontificia Universidad Javeriana



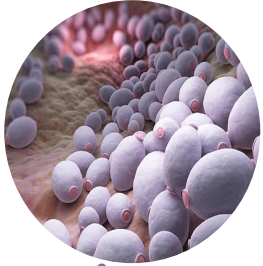
Contenido

INTRODUCCIÓN



Contenido

INTRODUCCIÓN

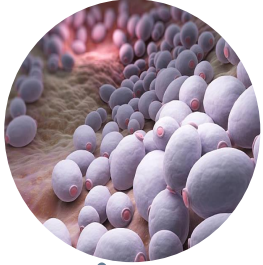


ANTECEDENTES

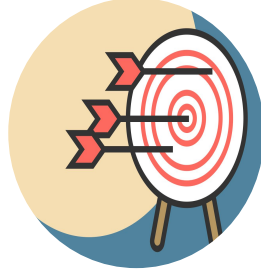


Contenido

INTRODUCCIÓN



PREGUNTA PROBLEMA Y
OBJETIVOS

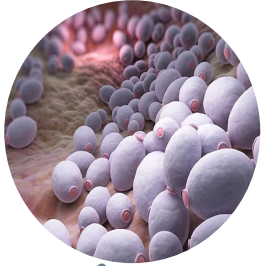


ANTECEDENTES

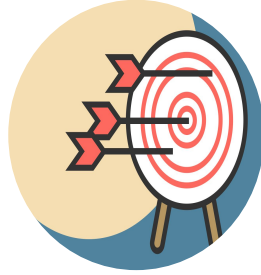


Contenido

INTRODUCCIÓN



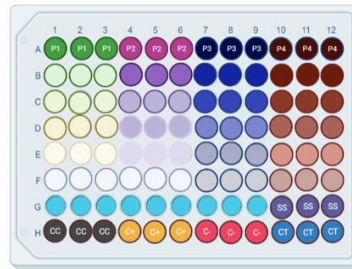
PREGUNTA PROBLEMA Y
OBJETIVOS



ANTECEDENTES

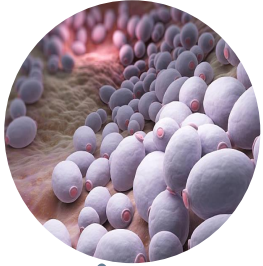


METODOLOGÍA

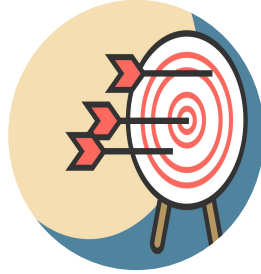


Contenido

INTRODUCCIÓN



PREGUNTA PROBLEMA Y
OBJETIVOS



RESULTADOS Y
DISCUSION



ANTECEDENTES

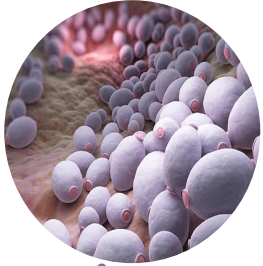


METODOLOGÍA

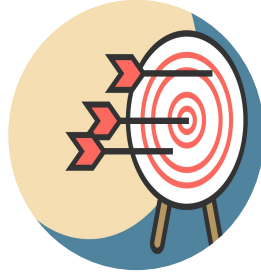


Contenido

INTRODUCCIÓN



PREGUNTA PROBLEMA Y
OBJETIVOS



RESULTADOS Y
DISCUSION



ANTECEDENTES



METODOLOGÍA



CONCLUSIONES



Características *Candida albicans*

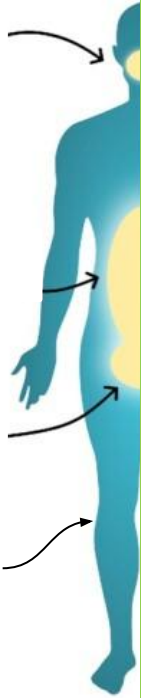
Comportamiento comensal

Cavidad oral

Tracto gastrointestinal

Tracto genital

Piel



Características *Candida albicans*

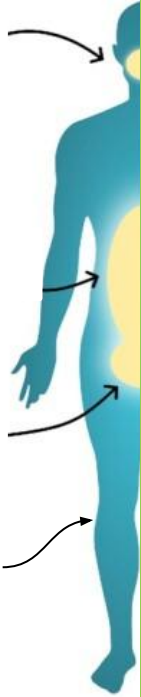
Comportamiento comensal

Cavidad oral

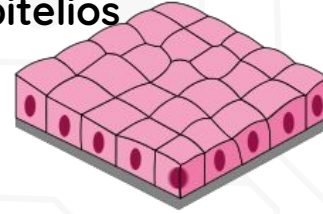
Tracto gastrointestinal

Tracto genital

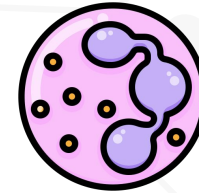
Piel



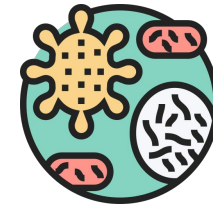
Perturbación de epitelios



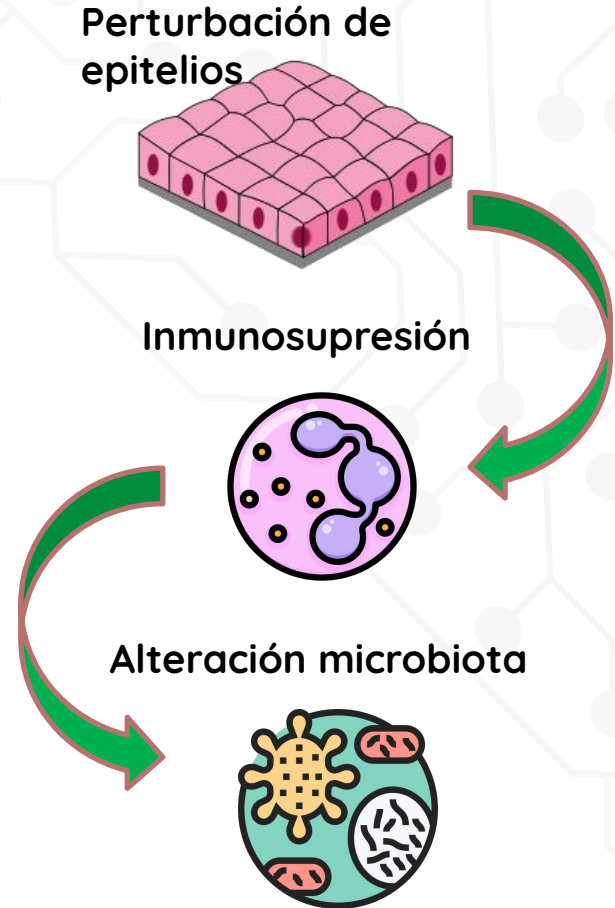
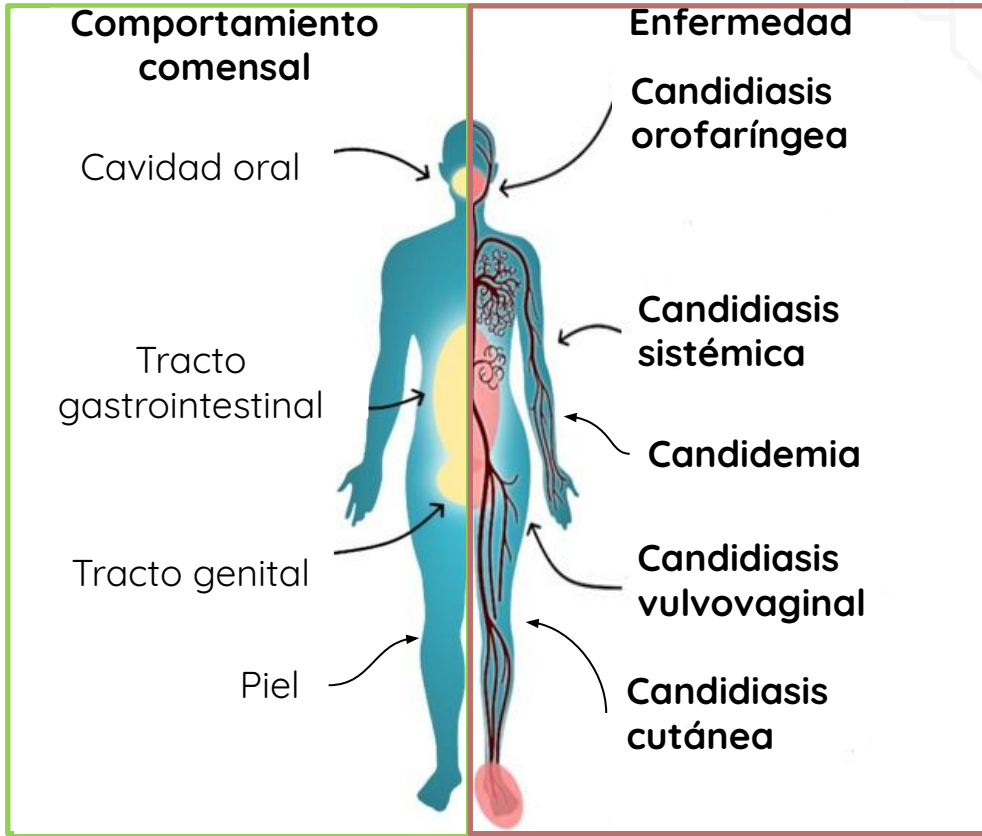
Inmunosupresión



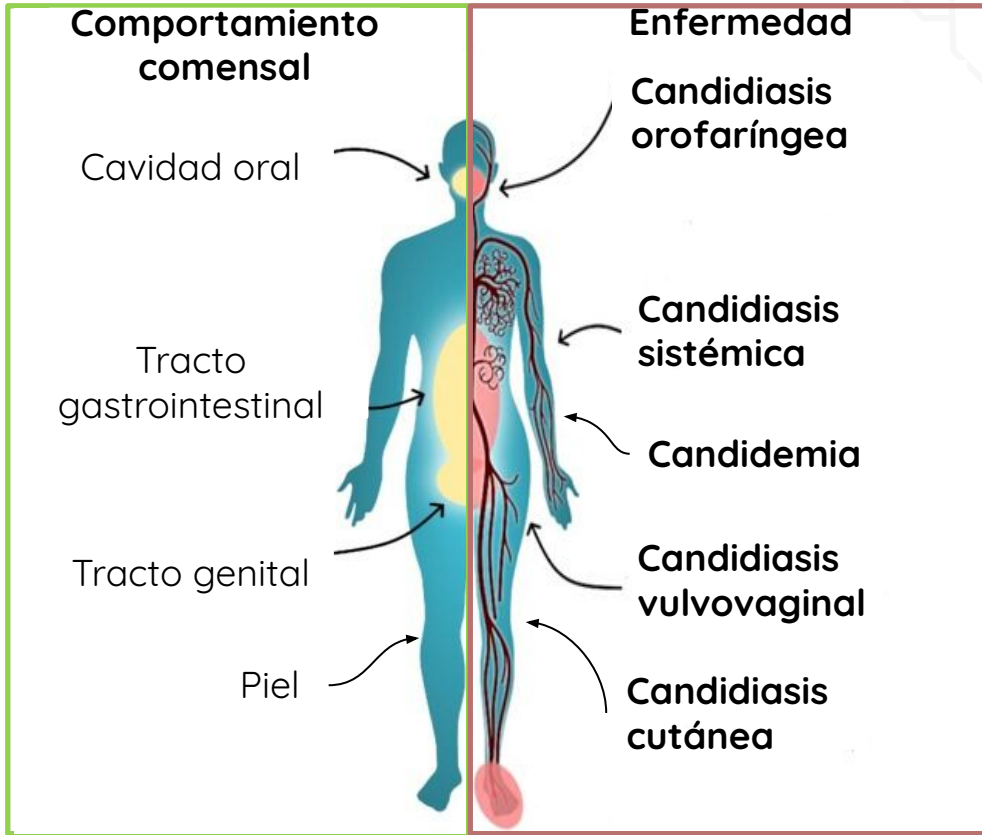
Alteración microbiota



Características *Candida albicans*



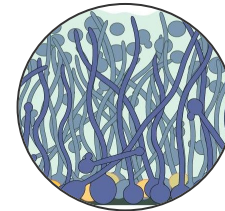
Características *Candida albicans*



Polimorfismo



Forma biopelículas



Epidemiología Candidiasis

C. albicans es responsable del 45 - 65% de candidiasis invasivas



Epidemiología Candidiasis

EE.UU: Incidencia de candidemia de 0,96 casos por 1000 pacientes



C. albicans es responsable del 45 - 65% de candidiasis invasivas

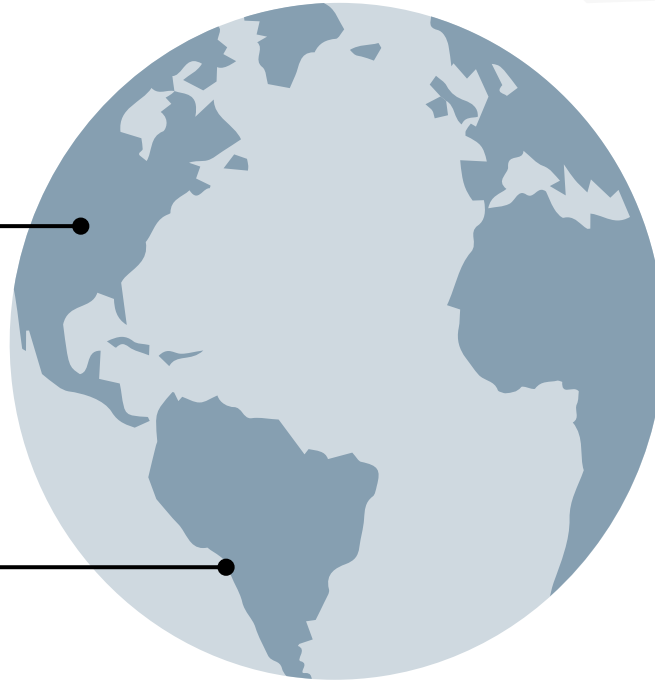


Epidemiología Candidiasis

EE.UU: Incidencia de candidemia de 0,96 casos por 1000 pacientes



Chile: Incidencia de candidemia de 0,33 casos por 1000 pacientes

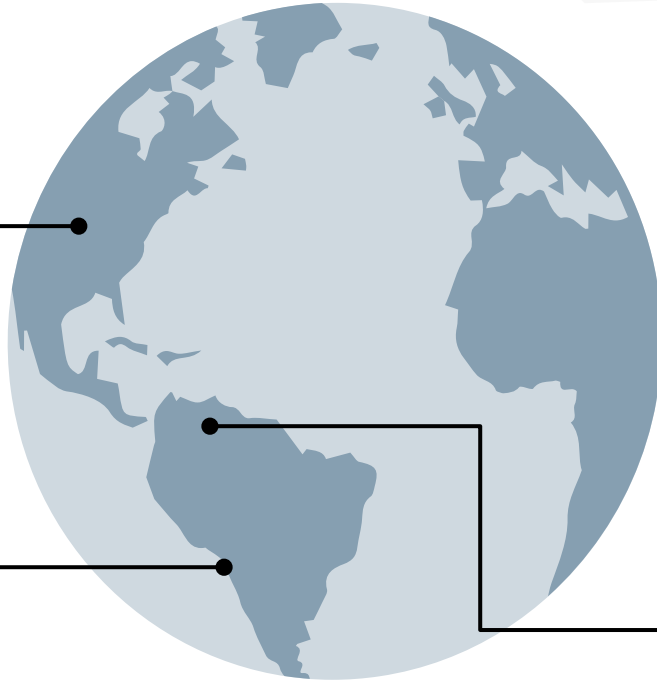
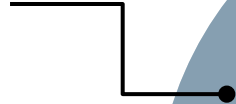


C. albicans es responsable del 45 - 65% de candidiasis invasivas



Epidemiología Candidiasis

EE.UU: Incidencia de candidemia de 0,96 casos por 1000 pacientes



Chile: Incidencia de candidemia de 0,33 casos por 1000 pacientes



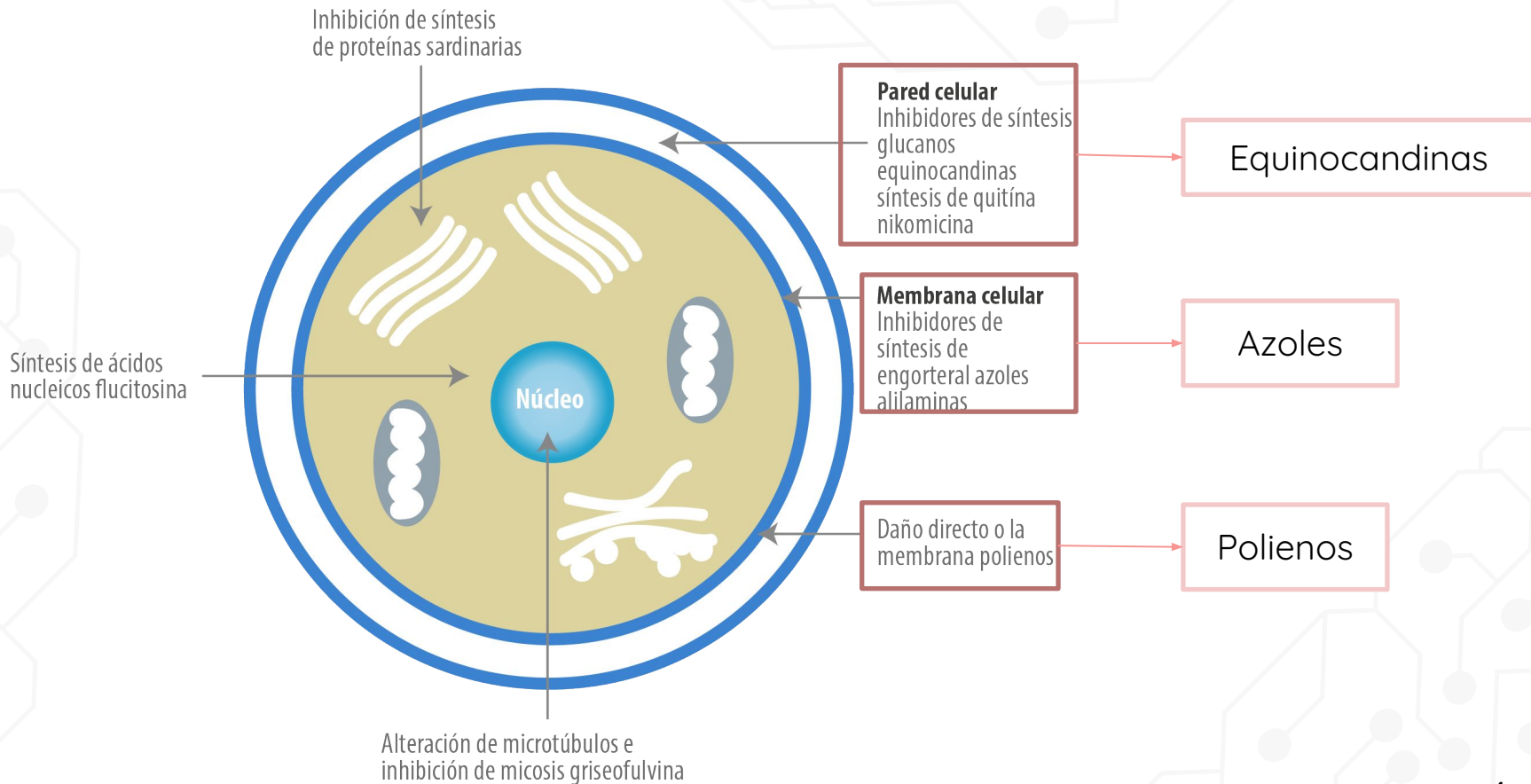
C. albicans es responsable del 45 - 65% de candidiasis invasivas



Colombia: Incidencia de candidemia de 1,18 casos por 1000 pacientes



Tratamiento candidiasis



Péptidos antimicrobianos PAMs



VENTAJAS

Menor capacidad de inducir resistencia

Efecto sinérgico con antifúngicos

Amplia variedad de mecanismos de acción



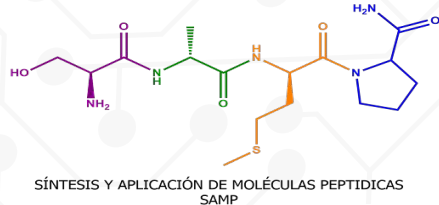
DESVENTAJAS

Fácil degradación

Alta actividad hemolítica

Altos costos de producción

Antecedentes



DOI: 10.1002/cbdv.202000885

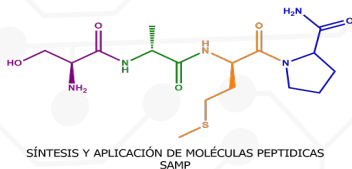
FULL PAPER



Designing Chimeric Peptides: A Powerful Tool for Enhancing Antibacterial Activity

Héctor Manuel Pineda-Castañeda,^a Kevin Andrey Huertas-Ortiz,^a Aura Lucía Leal-Castro,^b Yerly Vargas-Casanova,^c Claudia Marcela Parra-Giraldo,^c Javier Eduardo García-Castañeda,^d and Zuly Jenny Rivera-Monroy*^a

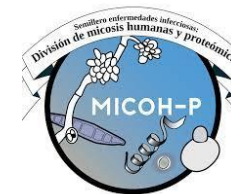
Código Péptido		Actividad antibacteriana (MIC, μM)					%Hemólisis
		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	
		25922	11775	27853	25923	29213	
QA2	RRWQWR-Ahx- RLLLR	15	31	31	122	>200	3-2
LfcinB (20-25)	RRWQWR	200	200	200	>200	>200	1
BFII (32-35)	RLLLR	>200	>200	>200	>200	>200	63
BFII (32-35)pal	RLLRLLLR	91	183	183	>200	>200	2-1



Antecedentes



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



**Péptidos quiméricos derivados de Lactoferricina Bovina y Buforina II:
actividad antifúngica contra cepas de referencia y aislamientos clínicos de
Candida spp**

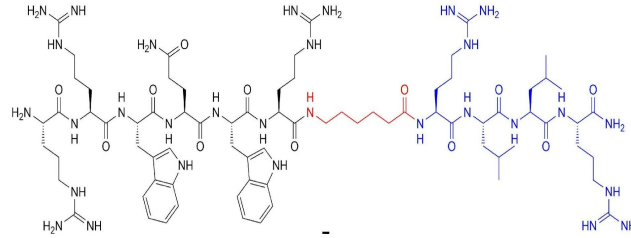
Katherine Natalia Aguirre Guataqui

Código péptido	Secuencia	Actividad antifúngica			
		<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>	
		CMI ug/mL, (µM)			
		SC5314	256	2001	1875
QA1	RRWQWR RLLR	200(131)	100(66)	50(33)	>200(>185)
QA2	RRWQWR- Ahx - RLLR	200(122)	200(122)	100(61)	200(122)
C. LfcinB	RRWQWR	200(203)	200(203)	100(102)	200(203)
BFII	RLLRLLLR	>200(>183)	>200(>183)	>200(>183)	>200(>183)

Negro: motivo mínimo de LfcinB; azul: motivo mínimo de BFII. *Mayor actividad antifúngica

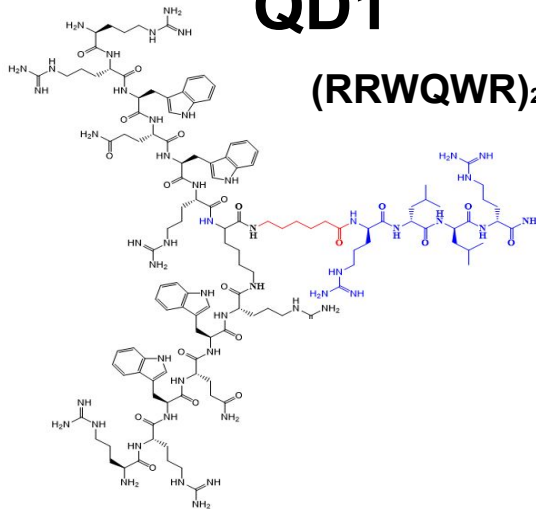
Péptidos quiméricos

RRWQWRX^RLLLR



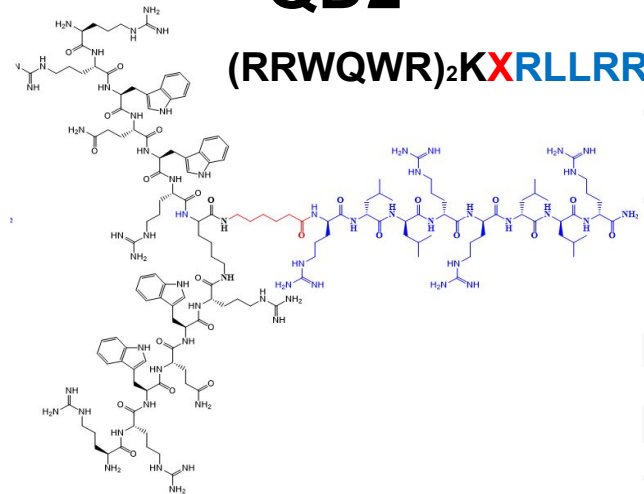
QD1

(RRWQWR)₂KX^RLLLR



QD2

(RRWQWR)₂KX^RLLLRLLLR



Pregunta Problema

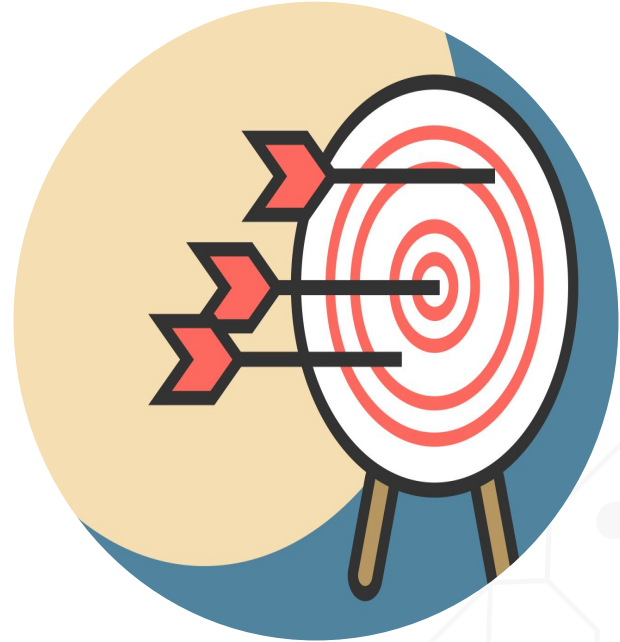


¿Qué susceptibilidad muestran las cepas de *Candida albicans* SC5314 y PUJ/HUSI 256 en respuesta al co-cultivo con diferentes péptidos quiméricos ramificados que contienen secuencias de LfcinB y BFII?

Objetivos

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 PUJ/HUSI256.



Objetivos Específicos

1)

Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* SC5314 y PUJ/HUSI 256 frente a los péptidos quiméricos.

Objetivos Específicos

1)

Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* SC5314 y PUJ/HUSI 256 frente a los péptidos quiméricos.

2)

Identificar el efecto fungicida y/o fungistático de los péptidos quiméricos sintéticos sobre las cepas *Candida albicans* SC5314 y PUJ256.

Objetivos Específicos

1)

Determinar la susceptibilidad de las cepas de *Candida albicans* SC5314 y PUJ/HUSI 256 frente a los péptidos quiméricos.

2)

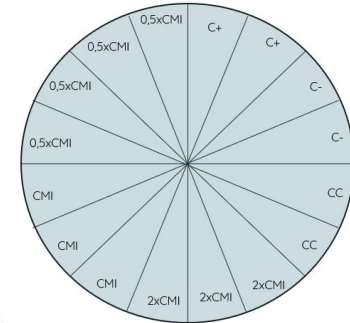
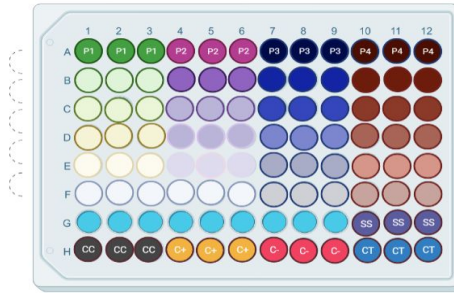
Identificar el efecto fungicida y/o fungistático de los péptidos quiméricos sintéticos sobre las cepas *Candida albicans* SC5314 y PUJ256.

3)

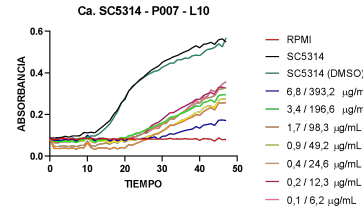
Determinar la actividad hemolítica de los péptidos quiméricos ramificados.

Metodología

ETAPA 1:
Actividad antifúngica CMI y CMF



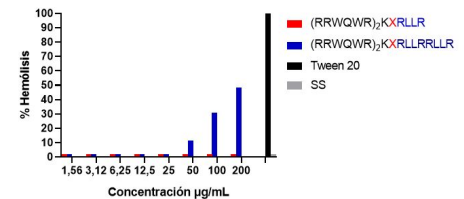
ETAPA 2:
Cinética de actividad de péptidos quiméricos



ETAPA 3:
Actividad hemolítica



Actividad hemolítica: Quimeras ramificadas



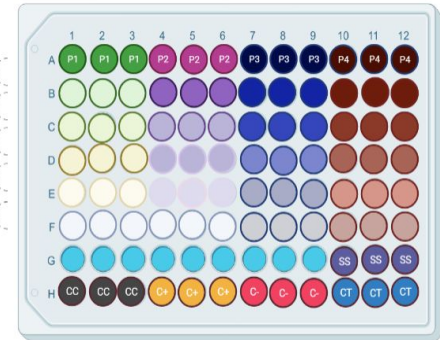
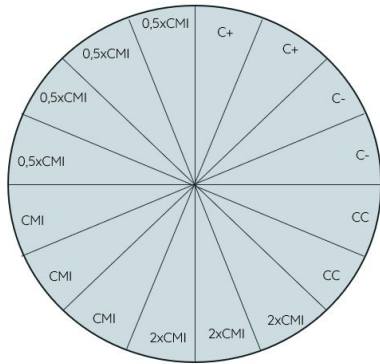
Características Microorganismos

Cepa	Código	Fuente	Fenotipo Susceptibilidad CMI µg/mL		
			FLU	CAS	AMB
<i>Candida albicans</i>	SC5314	Sangre	1	0,06	0,046
<i>Candida albicans</i>	PUJ/HUSI 256	Hisopado bucal	64	0,06	0,5

FLU: Fluconazol CAS: Caspofungina AMB: Anfotericina CMI: Concentración Mínima Inhibitoria CMF: Concentración Mínima Fungicida CMI: Concentración Mínima Inhibitoria Cuadro Verde Sensible Cuadro Rojo Resistente

Etapa

1



Microdilución en caldo

200 $\mu\text{g/mL}$
100 $\mu\text{g/mL}$
50 $\mu\text{g/mL}$
25 $\mu\text{g/mL}$
12,5 $\mu\text{g/mL}$
6,25 $\mu\text{g/mL}$



Diluciones seriadas de los péptidos



RPMI + levadura



RPMI + levadura + antifúngico



RPMI



Solución Salina

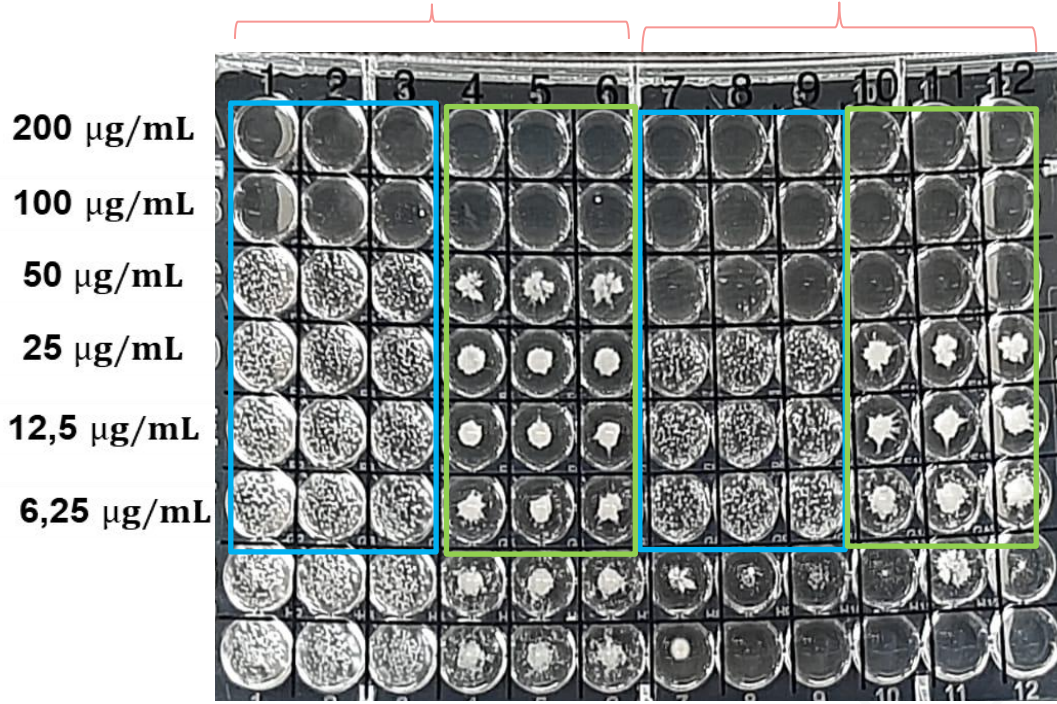
Resultado

QD1

(RRWQWR)₂KX**RLLR**

QD2

(RRWQWR)₂KX**RLLRLLR**



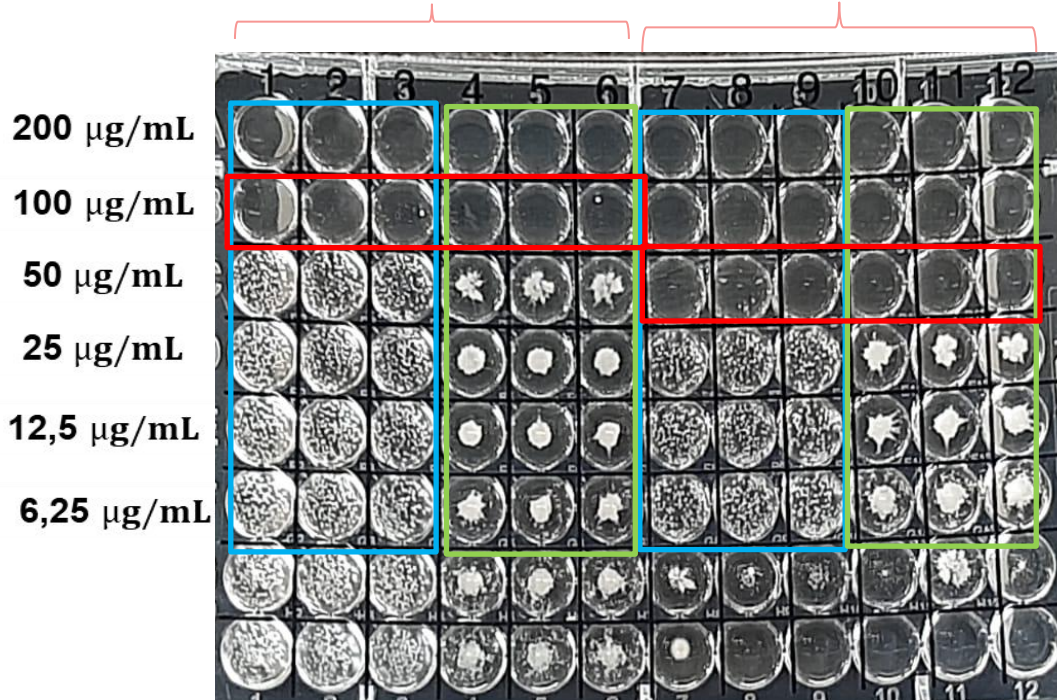
Resultado

QD1

(RRWQWR)₂KX**RLLR**

QD2

(RRWQWR)₂KX**RLLRLLR**



Cepa	(RRWQWR) ₂ K XRLLR	(RRWQWR) ₂ K XRLLRLLR
<i>C. albicans</i>	CMI µg/mL (µM)	CMI µg/mL (µM)
SC5314	100 (37)	50 (15)
PUJ/ HUSI 256	100 (37)	50 (15)

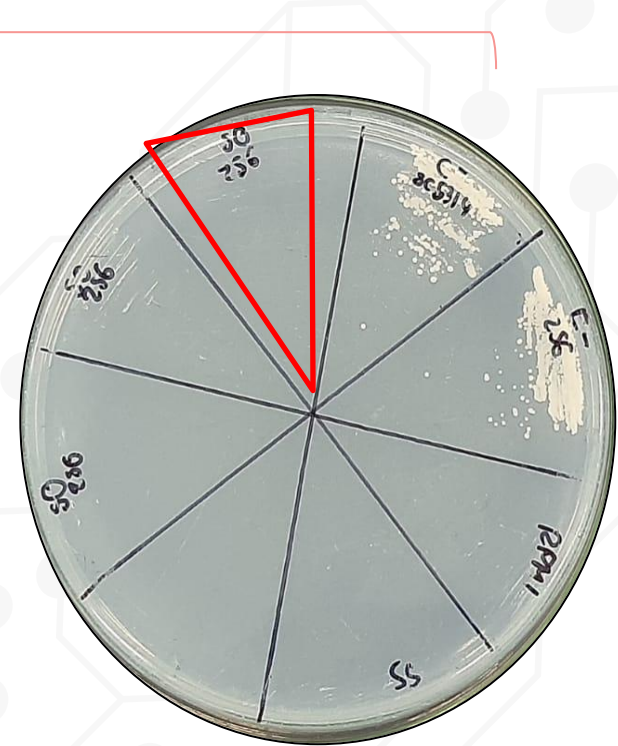
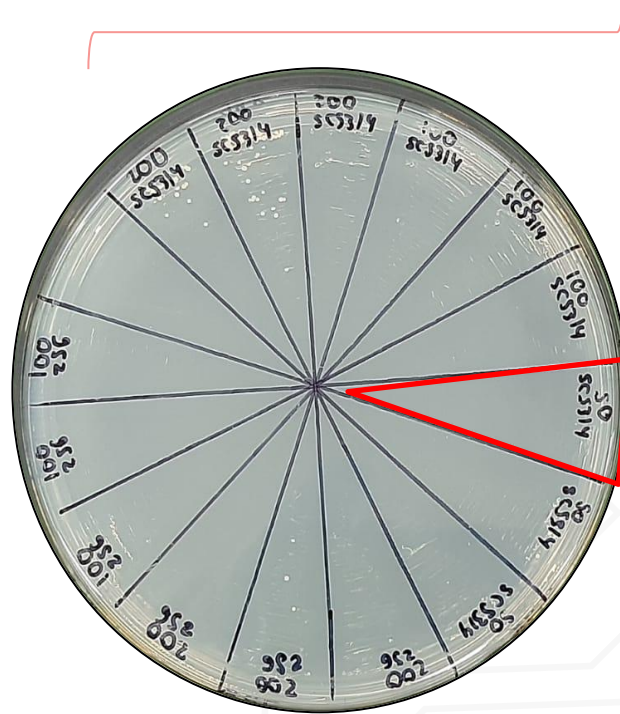
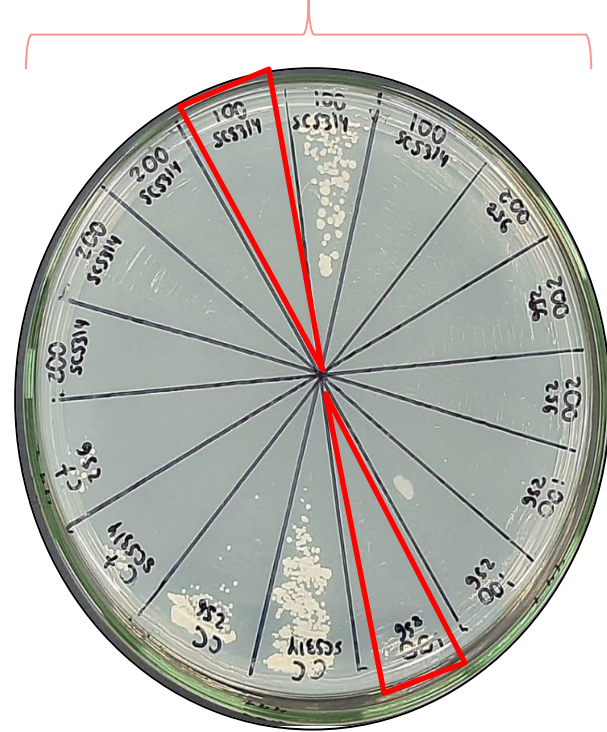
Resultado

QD1

(RRWQWR)₂KXRLLR

QD2

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR



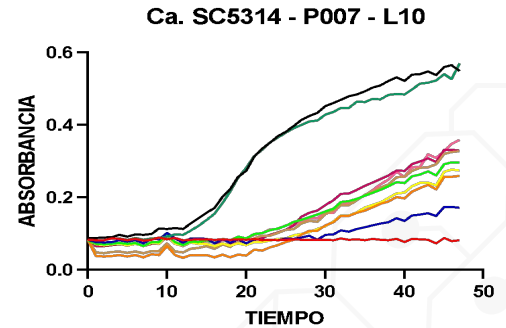
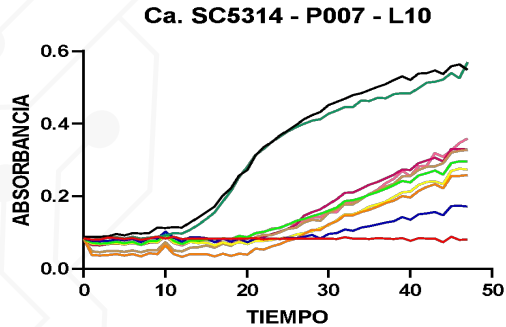
Resultado

Péptido	<i>C. albicans</i>			
	SC5314		256 PUJ/HUSI	
	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) ₂ KXRLLR (QD1)	100 (37)	100 (37)	100 (37)	100 (37)
(RRWQWR) ₂ KXRLLRLLR (QD2)	50 (15)	50 (15)	50 (15)	50 (15)

Tabla resumen de los valores de CMI y CMF en *C. albicans* SC5314 y PUJ 256

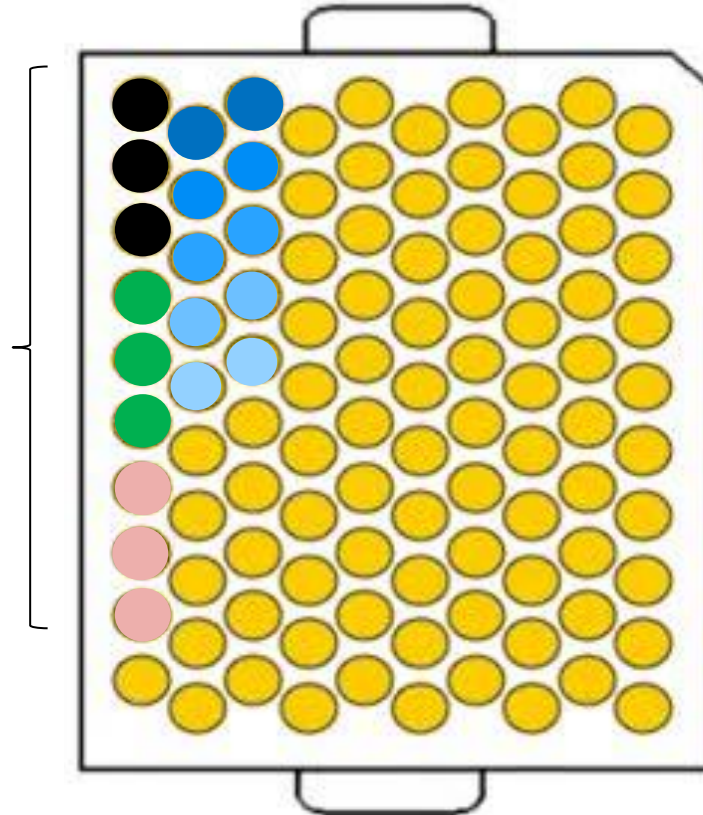
Etapa

2



Curvas de letalidad

150 μ L Péptido + 150 μ L del inóculo



200 μ g/mL

100 μ g/mL

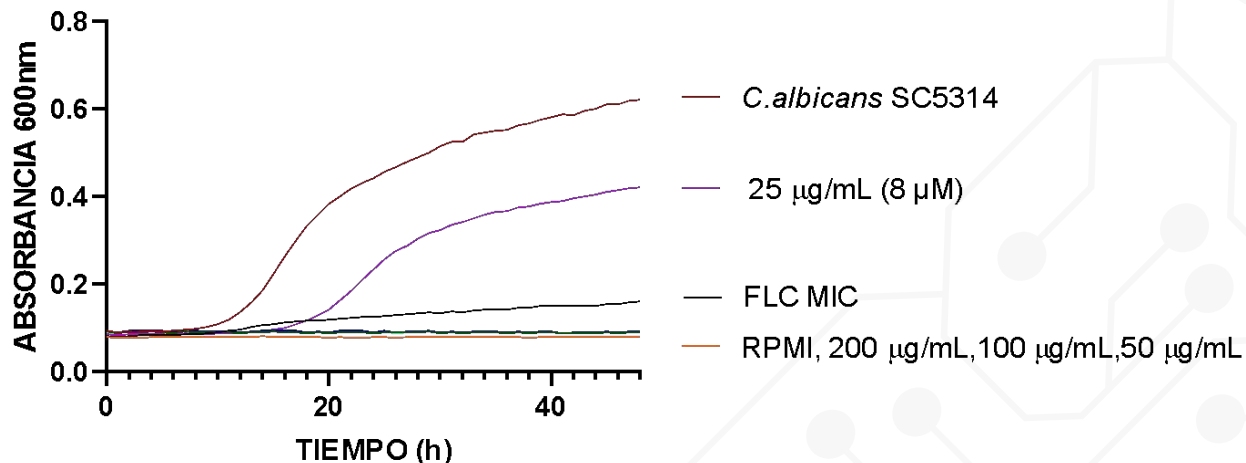
50 μ g/mL

25 μ g/mL

Resultado

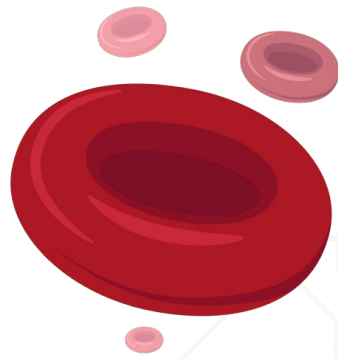
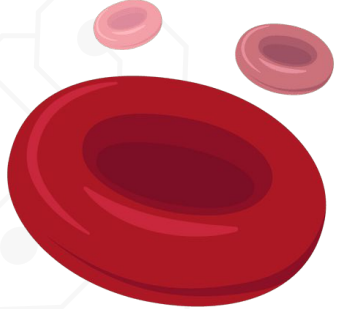
QD2

C. albicans SC5314 + (RRWQWR)₂KX**RLLR**LLLR



Péptido	<i>C. albicans</i>	CMI µg/mL (µM)	Efecto µg/mL(µM)	
			Fungistático	Fungicida
(RRWQWR)₂KXRLLR (QD1)	SC5314	100(37)	100 (37)	200 (74)
	256 HUSI/PUJ	100(37)	50(19)	100 (37)
(RRWQWR)₂KXRLLRLLLR (QD2)	SC5314	50(15)	25 (8)	50 (15)
	256 HUSI/PUJ	50(15)	25 (8)	50 (15)

Etapa 3



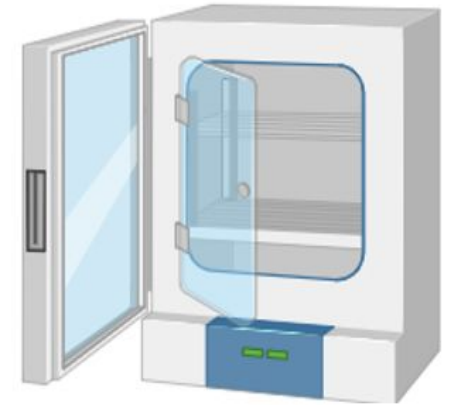
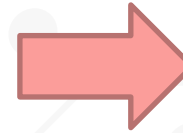
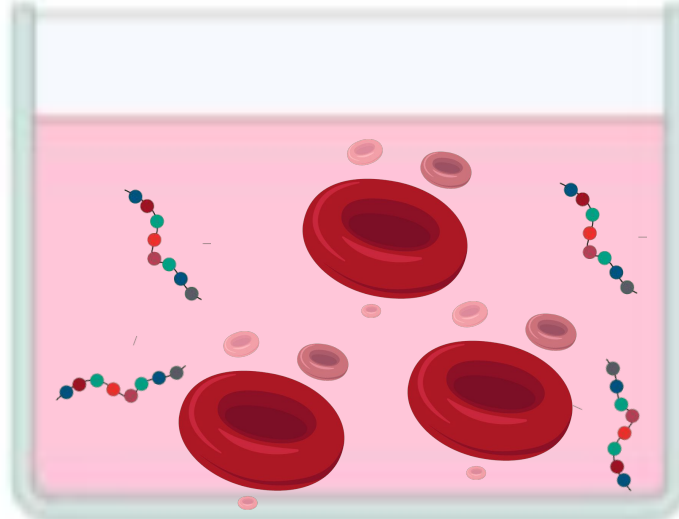
Etapa 3

Ensayo hemólisis

Diluciones seriadas de los péptidos

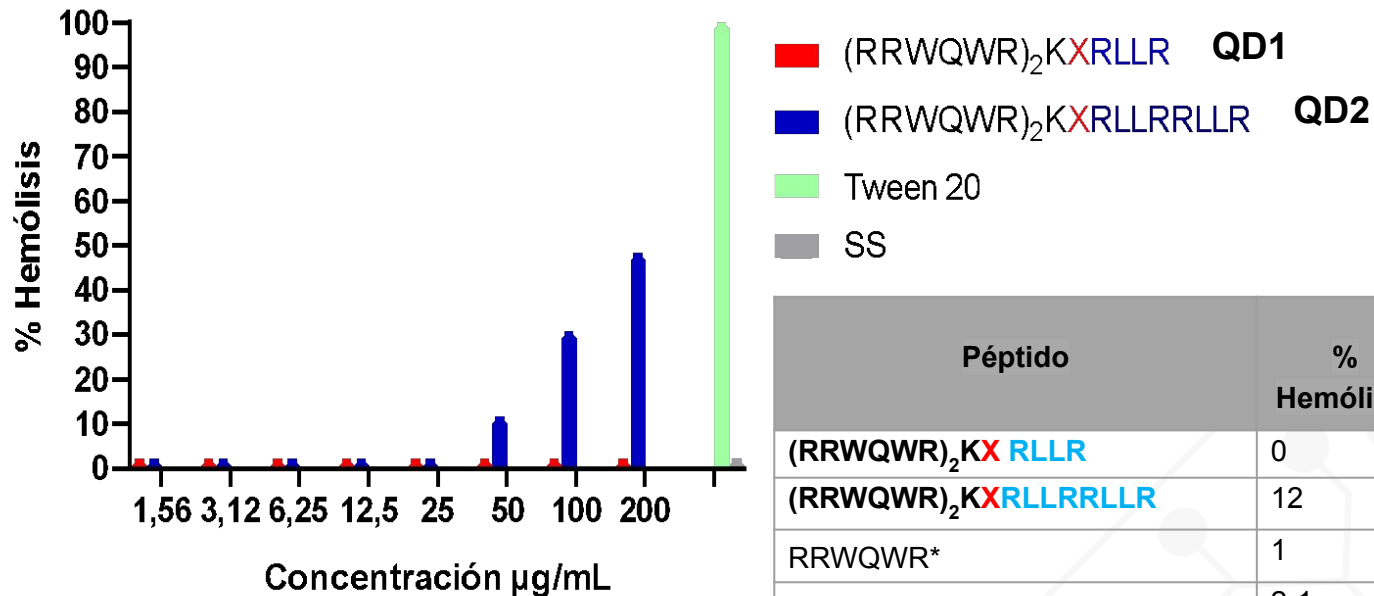
Solución de glóbulos rojos O+ a 2%

Incubar por 2 horas



Resultado

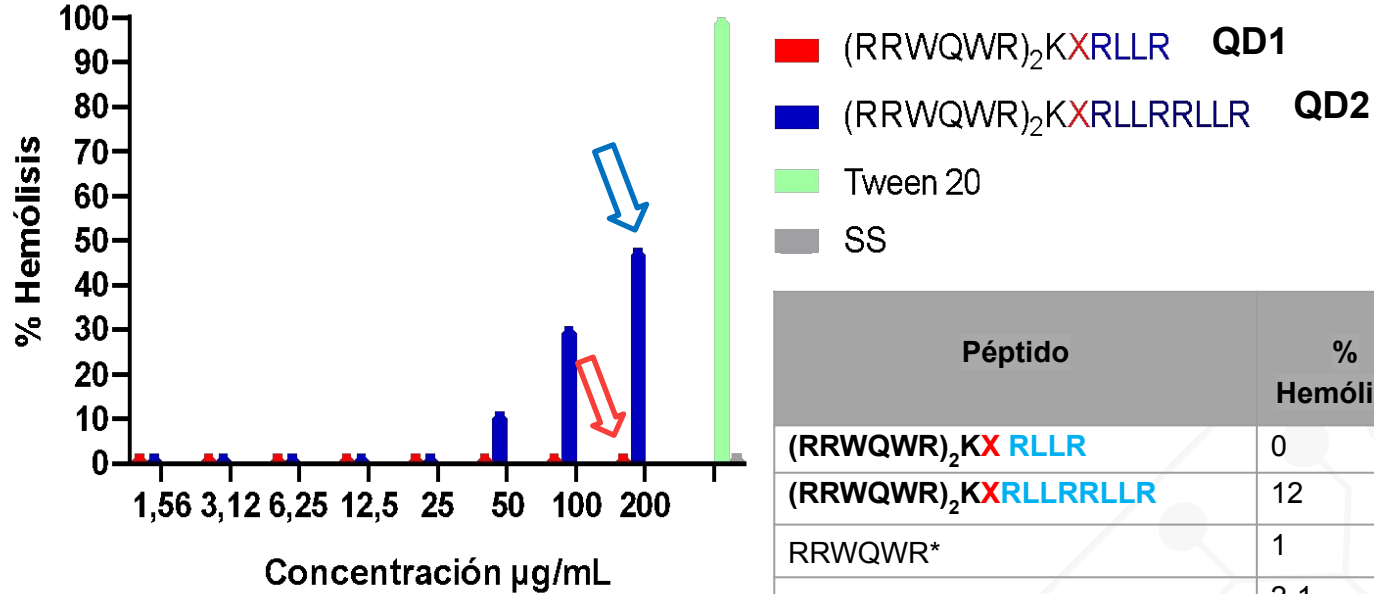
Actividad hemolítica: Quimeras ramificadas



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

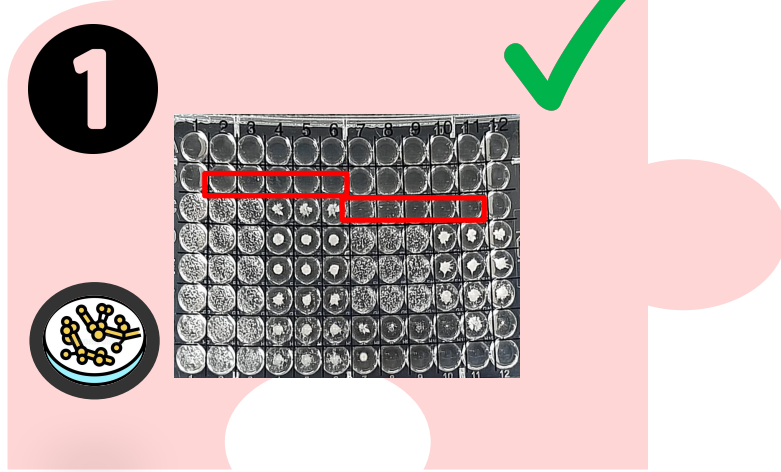
Resultado

Actividad hemolítica: Quimeras ramificadas



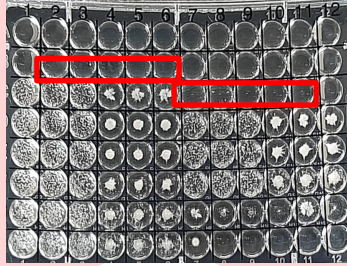
Péptido	% Hemólisis	CMI µg/mL (µM)	
		<i>C.albicans</i> SC5314	<i>C.albicans</i> 256 HUSI-PUJ
(RRWQWR) ₂ KXRLLR	0	100 (37)	100 (37)
(RRWQWR) ₂ KXRLLRLLR	12	50 (15)	50 (15)
RRWQWR*	1	200(203)	200(203)
RLLRLLR*	2-1	>200(>183)	>200(>183)
RLLR*	63	-----	-----
RRWQWR-ahx-RLLR*	3-2	200 (122)	200 (122)

Diseño metodológico

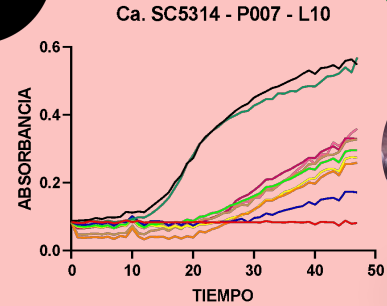


Diseño metodológico

1

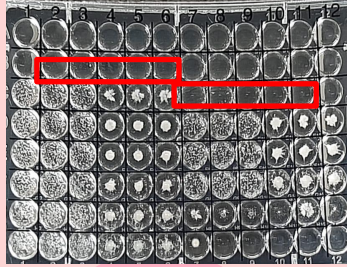


2

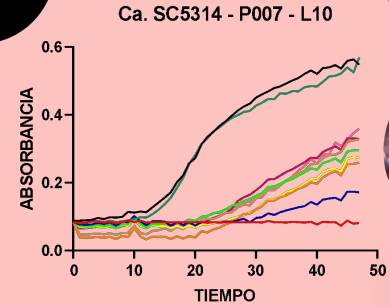


Diseño metodológico

1

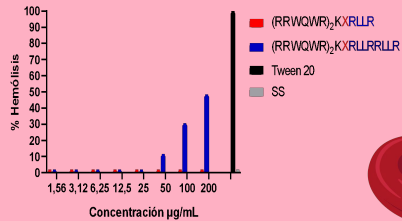


2



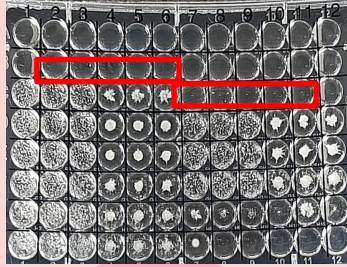
3

Actividad hemolítica: Quimeras ramificadas

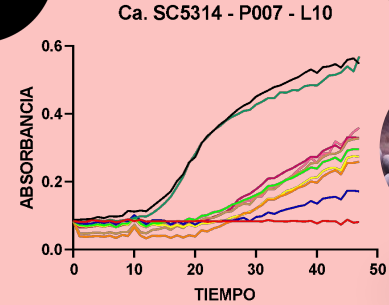


Diseño metodológico

1

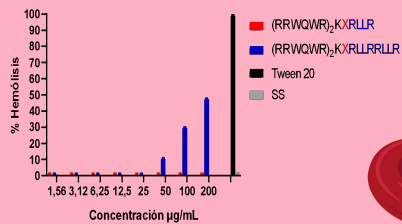


2

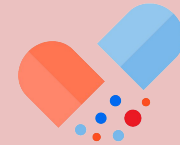


3

Actividad hemolítica: Quimeras ramificadas



4



Ensayo de tablero de ajedrez

Péptido



Fluconazol

Ensayo de tablero de ajedrez

Péptido

2 X CMI
1 X CMI
0,5 X CMI
0,25 X CMI
0,12 X CMI
0,06 X CMI
0 X CMI



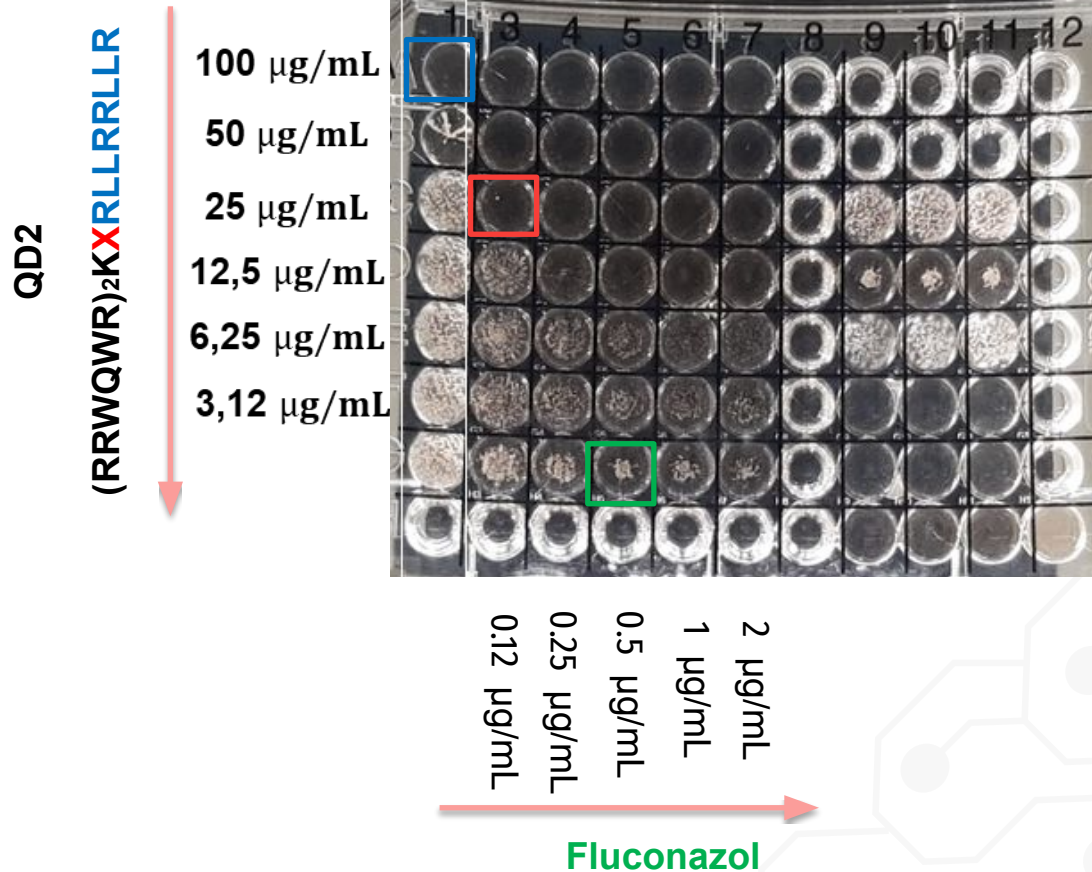
Fluconazol

ÍNDICE DE CONCENTRACIÓN
INHIBITORIA FRACCIONADA

$$ICIF = [(A) / (CMI \alpha)] + [(B) / (CMI b)]$$

EFECTO	VALOR ICIF
SINERGIA	≤ 0.5
ANTAGONISMO	> 4
ADITIVO	$>0.5 - 1$
INDIFERENCIA	1- 4

Resultado



C. albicans SC5314

- CMI del Péptido 100 µg/mL (30µM)
----- 25 µg/mL (8 µM)
- CMI de Fluconazol 0,5 µg/mL -----
----0,125 µg/mL

EFEECTO	VALOR ICIF
SINERGIA	≤ 0.5
Resultado	0,5

Resultado

Combinación de antifúngicos µg/mL							
Péptido	Cepa	CMI _{QD}	CMI _{FLC}	QD	FLC	ΣFIC	Efecto
(RRWQWR)₂KXRLLR (QD1) + FLC	<i>C.albicans</i> SC5314	200	0,5	25	0,125	0,38	Sinergia
	<i>C.albicans</i> 256	100	32	50	32	1,5	Indiferencia
(RRWQWR)₂KXRLLRLLR (QD2) + FLC	<i>C.albicans</i> SC5314	100	0,5	25	0,125	0,5	Sinergia
	<i>C.albicans</i> 256	50	32	25	16	1	Aditividad

Conclusiones

QD1

(RRWQWR)₂KXRLLR

QD2

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR



Las cepas de *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ muestran la misma susceptibilidad frente a cada una de las quimeras ramificadas.

Conclusiones

QD1

(RRWQWR)₂KXRLLR

QD2

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR

El péptido QD2 requiere concentraciones más bajas para alcanzar efecto fungicida en comparación que el péptido QD1

Las cepas de *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ muestran la misma susceptibilidad frente a cada una de las quimeras ramificadas.



Conclusiones

QD1

(RRWQWR)₂KXRLLR

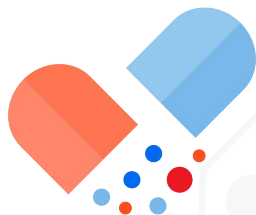
QD2

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR

El péptido QD2 requiere concentraciones más bajas para alcanzar efecto fungicida en comparación que el péptido QD1



Las cepas de *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ muestran la misma susceptibilidad frente a cada una de las quimeras ramificadas.



Se observa sinergia cuando se combinaron los péptidos quiméricos ramificados junto con fluconazol y *C. albicans* SC5314

Conclusiones

QD1

(RRWQWR)₂KXRLLR

El péptido QD2 requiere concentraciones más bajas para alcanzar efecto fungicida en comparación que el péptido QD1

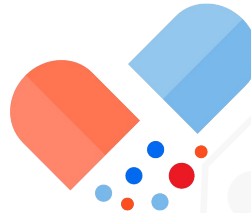


QD2

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR

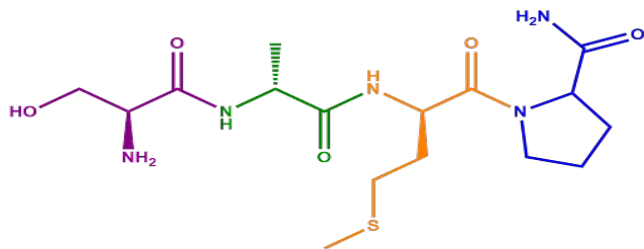
El péptido QD1 no posee actividad hemolítica hasta concentraciones de 2XCMi.

Las cepas de *C. albicans* SC5314 y 256 HUSI-PUJ muestran la misma susceptibilidad frente a cada una de las quimeras ramificadas.

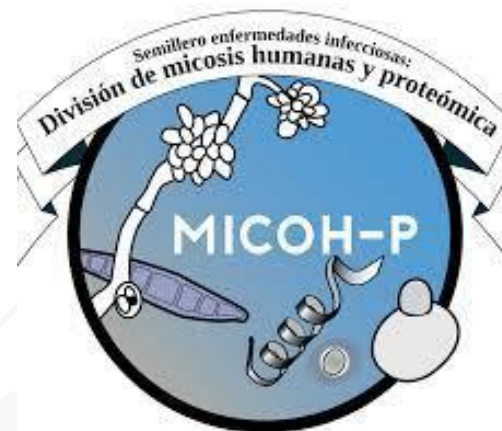


Se observa sinergia cuando se combinaron los péptidos quiméricos ramificados junto con fluconazol y *C. albicans* SC5314

AGRADECIMIENTOS



SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE MOLÉCULAS PEPTIDICAS
SAMP

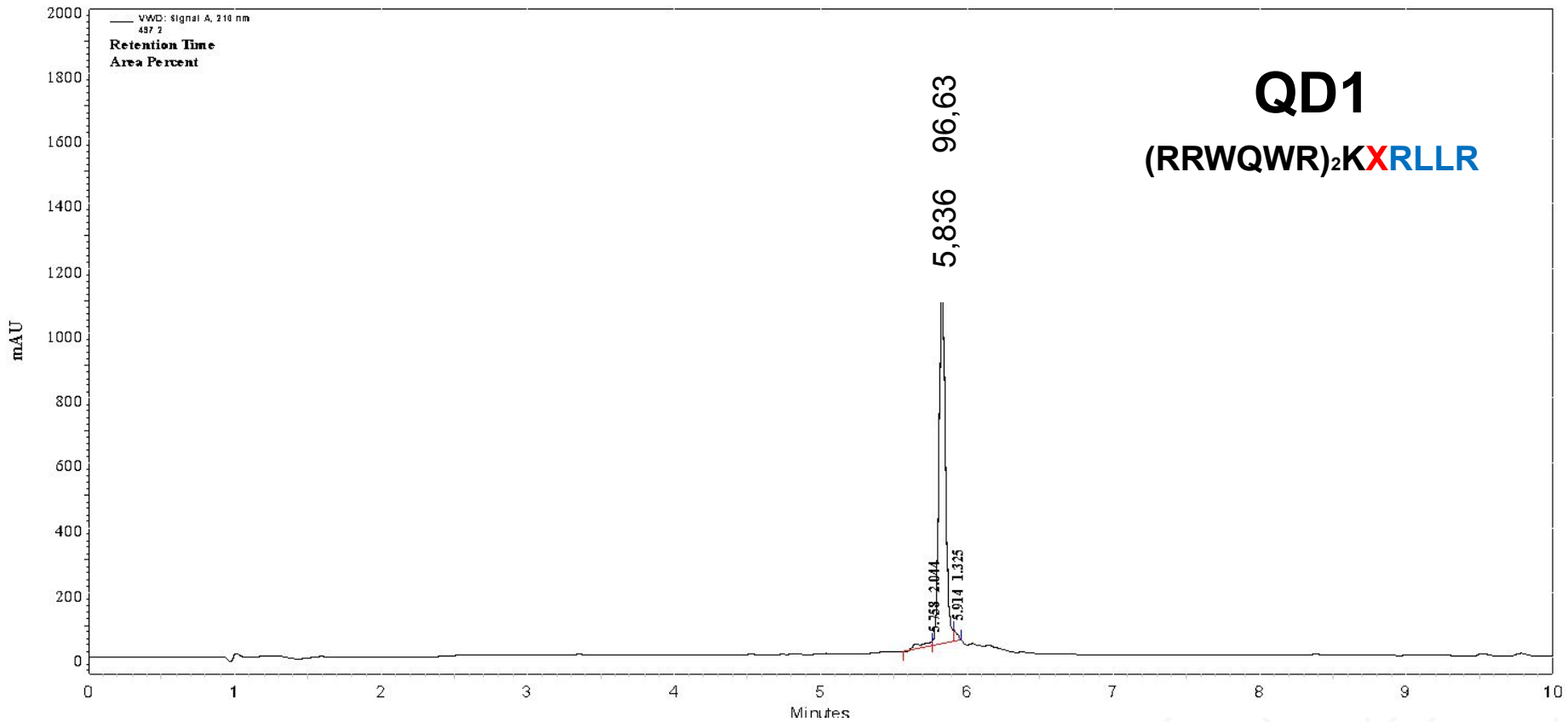


Agradezco a las profesoras, asesores y compañeros de los grupos de investigación MICOH-P y SAMP, quienes guiaron con sus enseñanzas mis pasos, me brindaron el conocimiento necesario para la culminar este trabajo de grado y me inculcaron la verdadera esencia de la investigación, también agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y su personal docente por forjar mi conocimiento profesional.

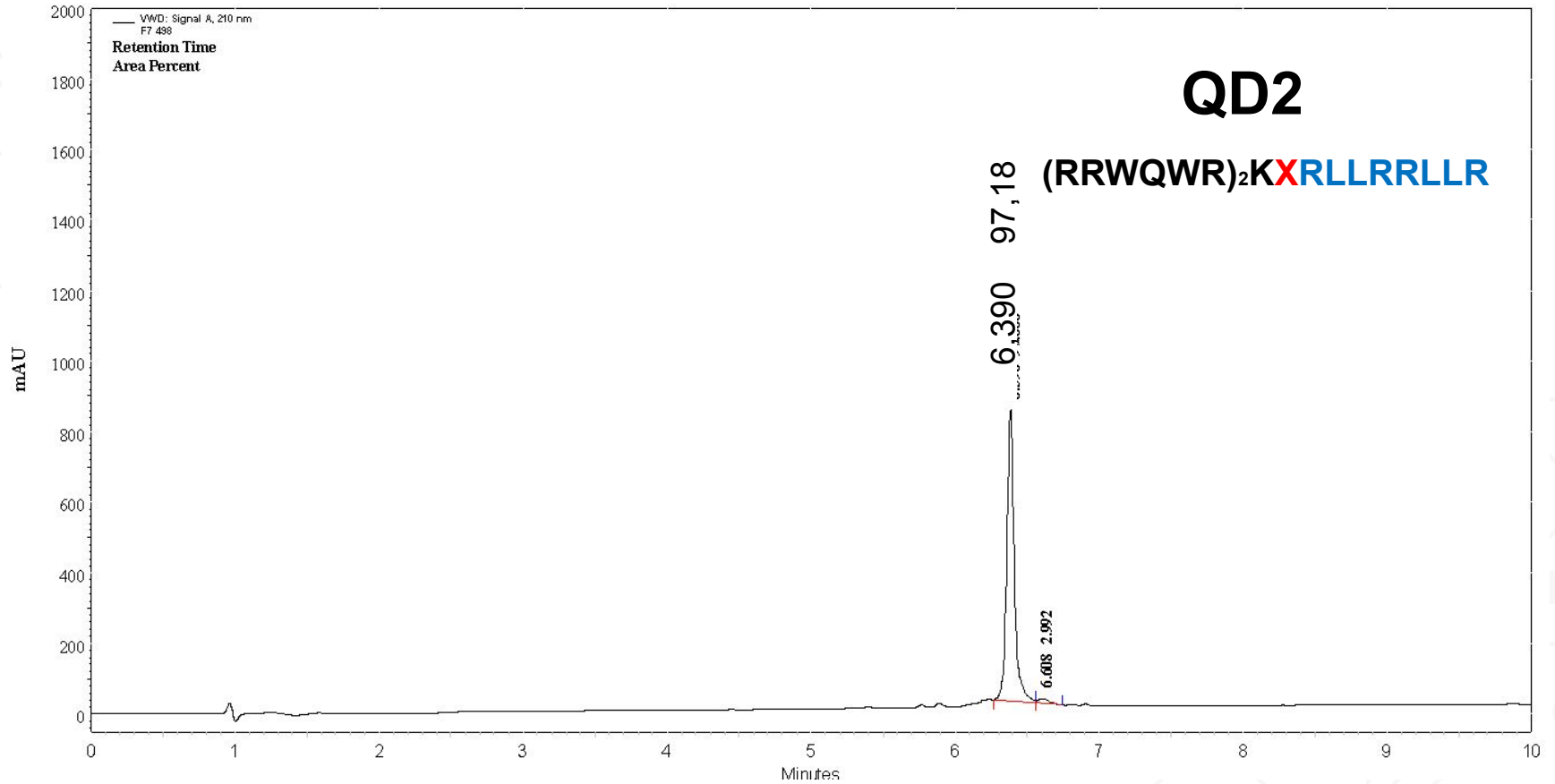
GRACIAS



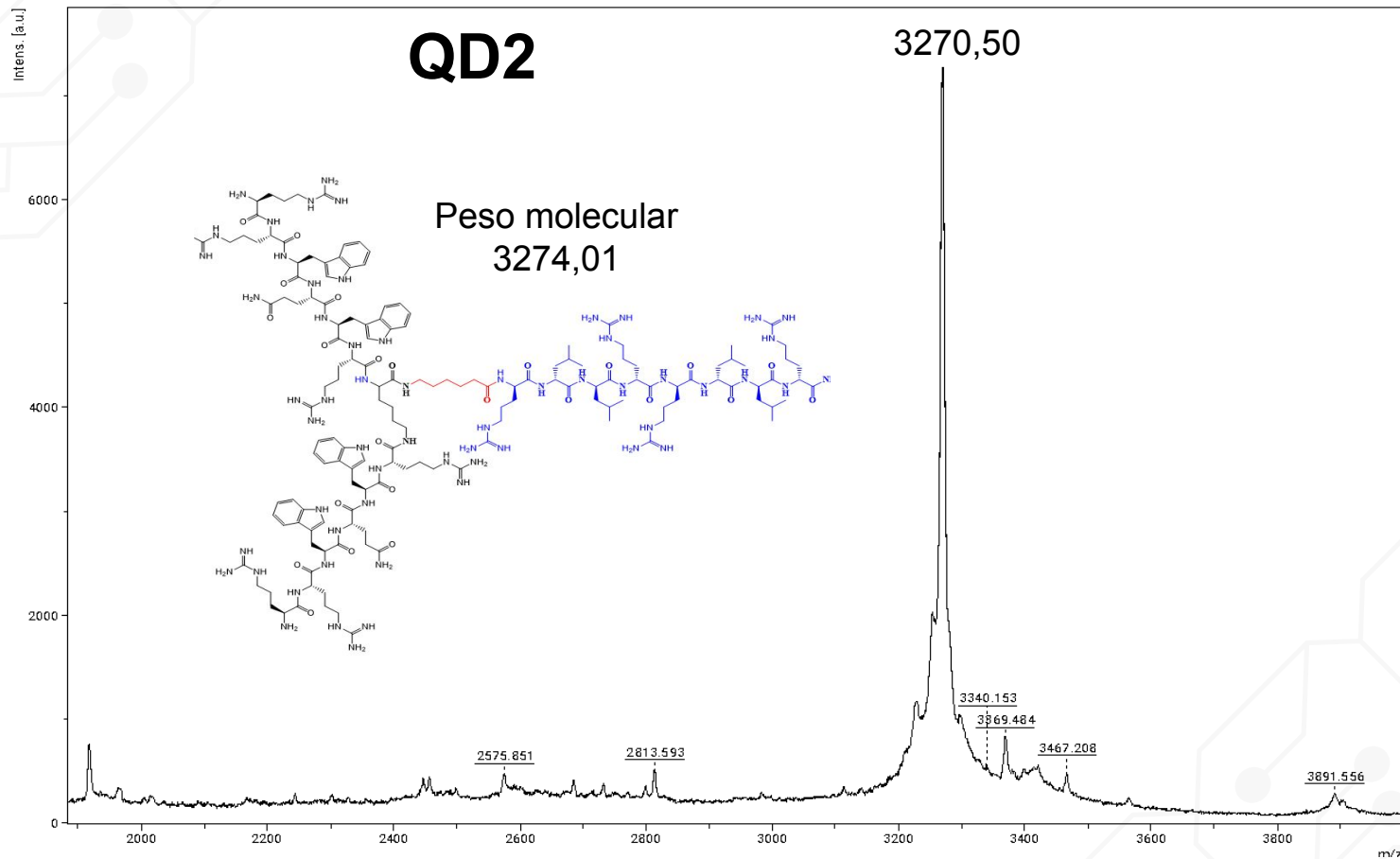
HPLC



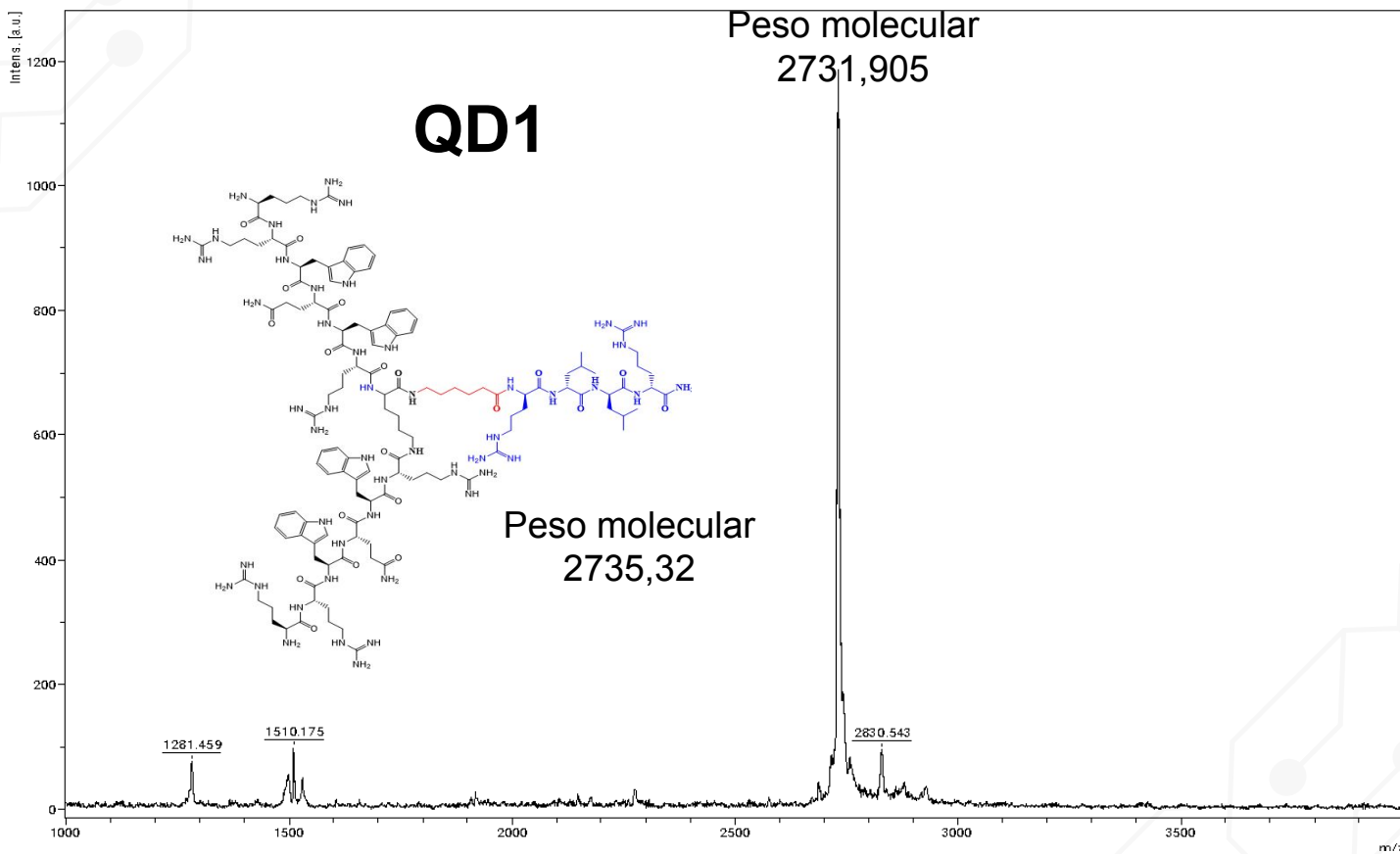
HPLC



ESPECTROMETRÍA DE MASAS

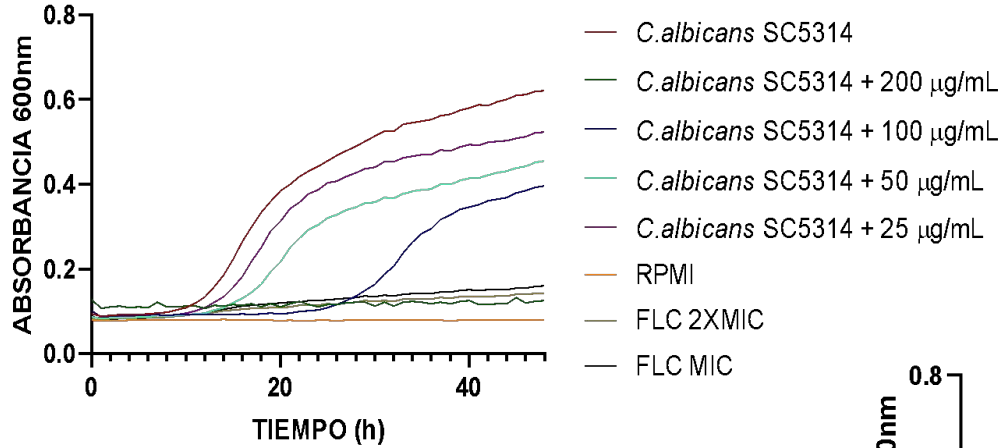


ESPECTROMETRÍA DE MASAS



Resultado

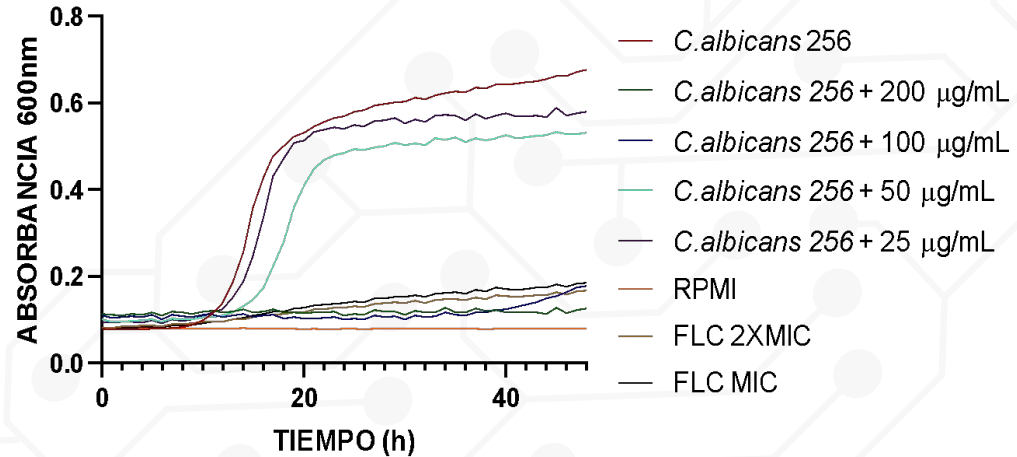
C. albicans SC5314 + (RRWQWR)2KXRLLR



Inhibición completa a
100 $\mu\text{g/mL}$

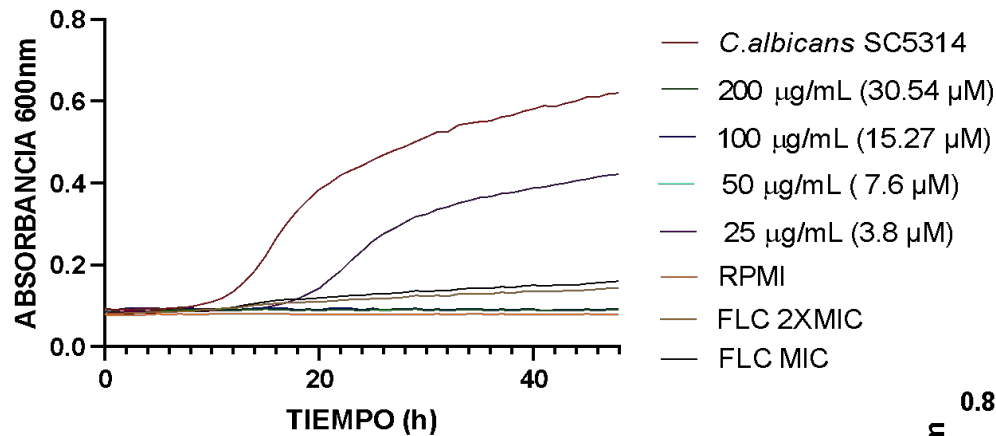
Efecto fungistático a
100 $\mu\text{g/mL}$

C. albicans 256 + (RRWQWR)2KXRLLR



Resultado

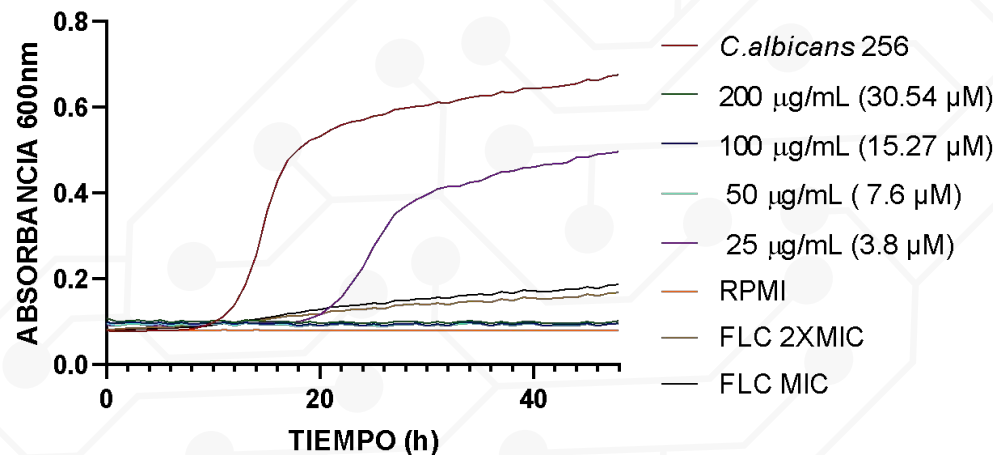
C.albicans SC5314 + (RRWQWR)2KX**R**LLR**R**LLR



Inhibición completa a
50 µg/mL

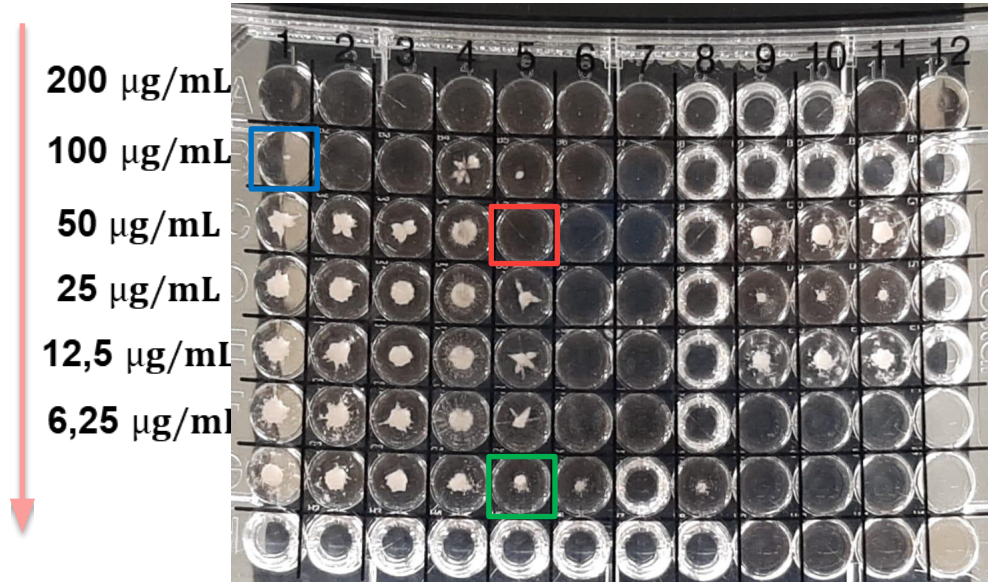
Retraso en el
crecimiento a 25
µg/mL

C.albicans 256 + (RRWQWR)2KX**R**LLR**R**LLR



Resultado

(RRWQWR)₂KXRLLR



C. albicans 256

- CMI del Péptido 100 µg/mL (37 µM)----- 50 µg/mL (19 µM)
- CMI de Fluconazol 32 µg/mL ----- -32 µg/mL

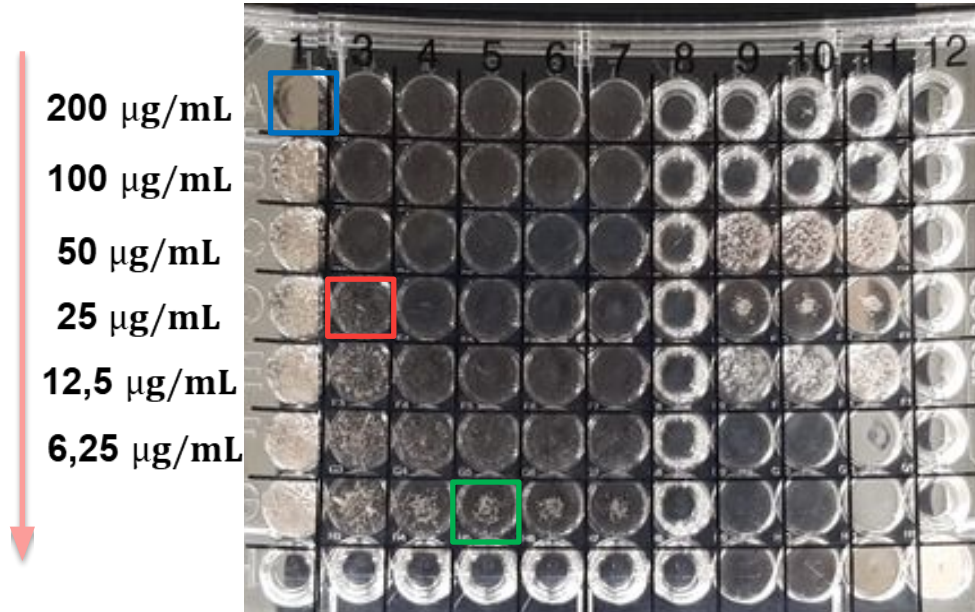
128 µg/mL
64 µg/mL
32 µg/mL
16 µg/mL
8 µg/mL

Fluconazol

EFEECTO	VALOR ICIF
INDIFERENCIA	1- 4
Resultado	1,5

Resultado

(RRWQWR)₂KXRLLR



2 µg/mL
1 µg/mL
0.5 µg/mL
0.25 µg/mL
0.12 µg/mL

Fluconazol

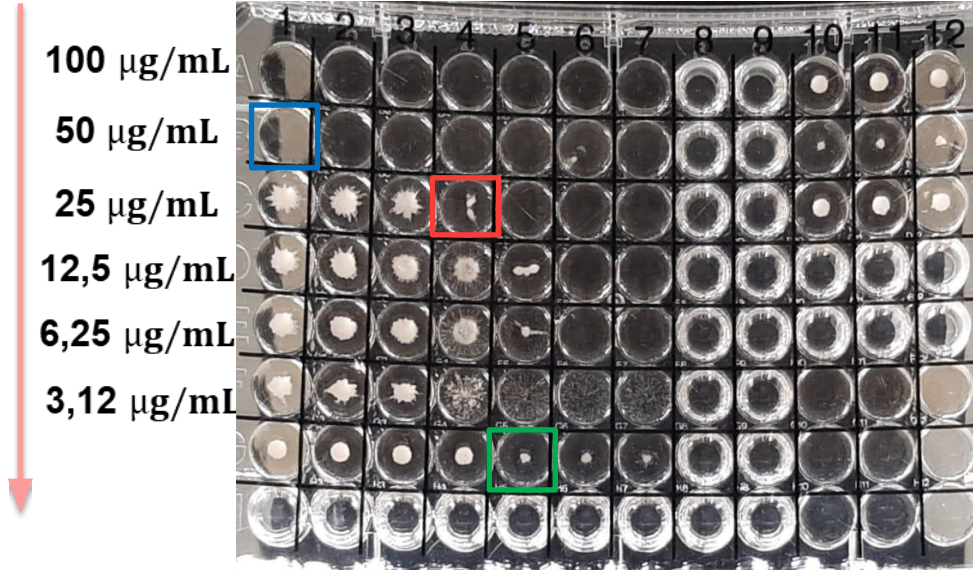
C. albicans SC5314

- CMI del Péptido 200 µg/mL (73 µM)
----- 25 µg/mL (9 µM)
- CMI de Fluconazol 0,5 µg/mL -----
--0,125 µg/mL

EFEECTO	VALOR ICIF
SINERGIA	≤ 0.5
Resultado	0,38

Resultado

(RRWQWR)₂KXRLLRLLR



128 µg/mL
64 µg/mL
32 µg/mL
16 µg/mL
8 µg/mL

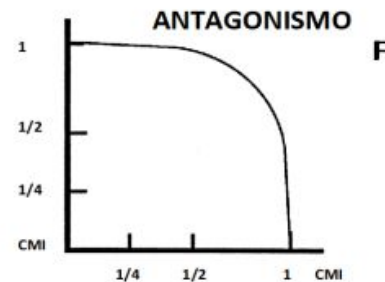
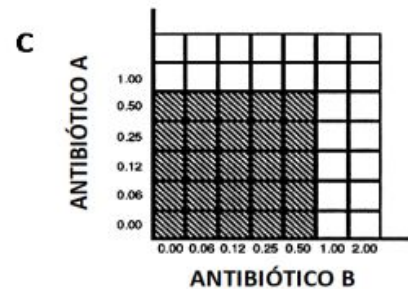
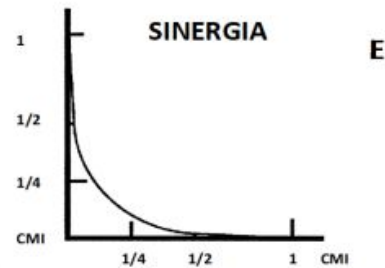
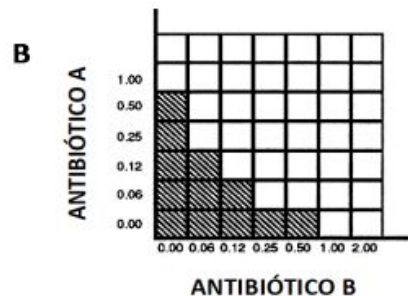
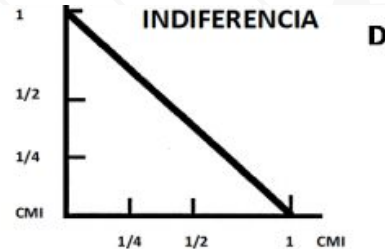
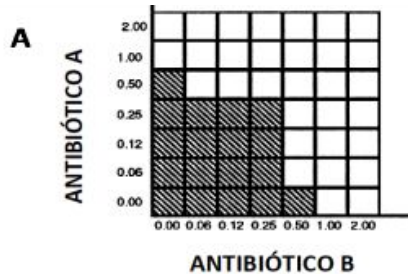
Fluconazol

C. albicans 256

- CMI del Péptido 50 µg/mL (15 µM) ---
----- 25 µg/mL (8 µM)
- CMI de Fluconazol 32 µg/mL -----
----16 µg/mL

EFEECTO	VALOR ICIF
ADITIVIDAD	0.5 - 1
Resultado	1

Combinación de antifúngicos



Antecedentes

(RRWQWR) KXRLLRLLR	<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

(RRWQWR) KXRLLRLLR	<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

(RRWQWR) 2KXRLLR	<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

(RRWQWR) 2KXRLLR	<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