



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias

Programa de Maestría en Microbiología

Evaluación de la capacidad antifúngica de tres péptidos sintéticos antimicrobianos contra especies del género *Candida* de importancia en salud pública

Richar Duván Torres Beltrán

Bogotá D.C., Colombia
Mayo de 2022

Evaluación de la capacidad antifúngica de tres péptidos sintéticos antimicrobianos contra especies del género *Candida* de importancia en salud pública

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

Magíster en Microbiología
(Modalidad de Profundización)

Richar Duván Torres Beltrán
Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

Director
Julián Esteban Muñoz PhD.
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad del Rosario

Codirector
Gabriela Arévalo PhD.
Docente Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Maestría en Microbiología
Coordinadora Línea de investigación R-L
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Línea de Investigación:
Microbiología Médica
Grupo de Estudios en Microbiología Traslacional y Enfermedades Emergentes
MICROS

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
Mayo de 2022

Dedicatoria

Este trabajo de grado está dedicado a Dios y mi familia quienes son los artífices de poder alcanzar este nuevo logro en mi vida profesional y personal.

Agradecimientos

Mi profundo agradecimiento a Dios y mi familia, por ser mi mayor soporte emocional y personal durante todo el camino que se ha recorrido para la culminación de este trabajo de grado. También quiero extender mi agradecimiento a la profesora Ruth Sánchez quien, creyendo en mí, sirvió de puente para poder conocer al profesor Julián.

Al profesor Julián Muñoz quiero dedicarle un apartado especial ya que me ha dado la oportunidad tanto de participar en este proyecto tan interesante, así como de conocerle como un verdadero apasionado de la ciencia, la investigación, y un carismático ser humano. Sus enseñanzas, paciencia, dedicación y compromiso dejaron una huella importante en mi crecimiento profesional y personal.

Por último, quiero agradecer al grupo MICROS de la Universidad del Rosario encabezado por la doctora Beatriz Gómez por su apoyo y compromiso con el proyecto, a la profesora Adriana Barreto por sus enseñanzas y guía, y a la profesora Gabriela Arévalo por sus aportes en la construcción de este trabajo de grado.

Resumen

La candidiasis es una infección oportunista frecuente en pacientes hospitalizados y/o inmunodeprimidos, alcanzando tasas de mortalidad de 46% aproximadamente. La creciente resistencia farmacológica de *Candida* spp, y la aparición del patógeno emergente *Candida auris*, han convertido la candidiasis en un problema de salud pública. Se han investigado diferentes tipos de péptidos antimicrobianos como alternativas terapéuticas para controlar la candidiasis de manera efectiva y segura. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de tres péptidos antimicrobianos (PAMs) sintéticos (35409, 1609 y 29009) contra *Candida auris*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*, especies con importancia clínica mundial. La concentración inhibitoria mínima (CMI) de los péptidos contra *Candida* spp., se determinó mediante el método de microdilución en placa y se encontró que los 3 péptidos inhibieron el crecimiento de las levaduras, siendo el 1609 el que exhibió mejor actividad. El efecto de los PAM sobre la formación de biopelículas en las especies de *C. auris* y *C. albicans* también se evaluó a través del ensayo XTT, encontrándose actividad inhibitoria de los 3 péptidos sobre ambas especies. Adicionalmente, los daños estructurales en *C. auris* y *C. albicans* causados por la acción de los péptidos fueron evaluados por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y finalmente, se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los péptidos contra fibroblastos murinos L929. Se evidenció alteraciones morfológicas inducidas por los péptidos, tanto en membrana como a nivel intracelular sobre *C. albicans* y *C. auris*, así como total inocuidad de los PAM con la línea celular murina L929 después de 24 horas de tratamiento. De esta manera, se concluye que los péptidos ensayados son potenciales alternativas terapéuticas con especial interés por el péptido 1609, contra las especies de *Candida* más importantes de Colombia y el mundo.

Palabras clave: *Candida auris*, *Candida* spp., péptidos antimicrobianos, resistencia, candidiasis.

Abstract

Candidiasis is a common opportunistic infection in hospitalized and/or immunosuppressed patients, reaching mortality rates of approximately 46%. The increasing pharmacological resistance of *Candida* spp, and the appearance of the emerging pathogen *Candida auris*, have turned candidiasis into a public health problem. Different types of antimicrobial peptides have been investigated as therapeutic alternatives to control candidiasis effectively and safely. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of three synthetic antimicrobial peptides (AMPs) (35409, 1609 and 29009) against *Candida auris*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*, species with worldwide clinical importance. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptides against *Candida* spp. was determined by the plate microdilution method and it was found that the 3 peptides inhibited the growth of the yeasts, being 1609 the one that exhibited the best activity. The effect of PAMs on biofilm formation in *C. auris* and *C. albicans* species was also evaluated through the XTT assay, finding inhibitory activity of the 3 peptides on both species. Additionally, the structural damages in *C. auris* and *C. albicans* caused by the action of the peptides were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and finally, the *in vitro* cytotoxicity of the peptides against L929 murine fibroblasts was evaluated. Morphological alterations induced by the peptides were evidenced, both in the membrane and at the intracellular level on *C. albicans* and *C. auris*, as well as total innocuousness of the PAM with the murine cell line L929 after 24 hours of treatment. In this way, it is concluded that the tested peptides are potential therapeutic alternatives with special interest for peptide 1609, against the most important *Candida* species in Colombia and the world.

Keywords: *Candida auris*, *Candida* spp, antimicrobial peptides, resistance, candidiasis.

Contenido

1. Introducción	11
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo general	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Marco teórico	15
3.1. Generalidades de <i>Candida</i> spp.	15
3.2. <i>Candida auris</i>	18
3.3. Péptidos antimicrobianos (PAMs)	20
3.3.1. PAMs de origen natural	21
3.3.2. PAMs de origen sintético	22
4. Materiales y métodos	23
4.1. Cepas de <i>Candida auris</i> y otras especies de <i>Candida</i> de importancia clínica.	23
4.2. Consideraciones éticas	23
4.3. Síntesis y purificación de los péptidos antimicrobianos	24
4.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los péptidos 1609, 29009 y 35409	24
4.5. Evaluación de la capacidad inhibitoria de biopelícula de los péptidos 1609, 29009 y 35409	25
4.6. Efecto de los péptidos sobre la morfología de las levaduras mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)	26
4.7. Determinación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los péptidos 35409, 1609 y 29009.	26
5. Resultados	28
5.1. Los péptidos 1609, 29009 y 35409 inhibieron el crecimiento de las seis especies de <i>Candida</i> evaluadas	28
5.2. La formación de biopelícula en <i>C. albicans</i> y <i>C. auris</i> fue inhibida por los péptidos 1609, 29009 y 35409	33
5.3. La morfología de las levaduras <i>C. albicans</i> y <i>C. auris</i> es afectada por los péptidos 1609, 29009 y 35409	35
5.4. Los péptidos 1609, 29009 y 35409 no tienen actividad citotóxica sobre la línea celular murina L929	37
6. Discusión	39
7. Conclusiones	48
8. Recomendaciones	49
9. Material Suplementario	50
9.1. S1: Ensayo Actividad Inhibitoria de los PAMs 1609, 29009 y 35409 en <i>Candida</i> spp. 50	
9.2. S2: Ensayo Actividad Inhibitoria sobre la formación de Biopelícula de los PAMs 1609, 29009 y 35409 en <i>Candida</i> spp.	55
Referencias	57

Lista de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de infecciones por especies de <i>Candida</i> no- <i>albicans</i> en el mundo.....	16
Figura 2. Países con reporte de <i>C. auris</i> hasta 15 de febrero de 2021	19
Figura 3. Actividad de los péptidos sobre las 6 especies de <i>Candida</i> estudiadas.....	31
Figura 4. Actividad de los péptidos sobre las 10 cepas de <i>Candida</i> ensayadas	32
Figura 5. Imágenes TEM de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 tratada con los PAMs 1609, 29009 y 35409, y sin tratamiento.....	36
Figura 6. Imágenes TEM de <i>C. auris</i> 1421 tratada con los PAM 1609, 29009 y 35409, y sin tratamiento.....	37
Figura 7. Actividad de los péptidos evaluados sobre la línea celular murina L929.....	38

Lista de figuras suplementarias

Figura Suplementaria S1-1. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	50
Figura Suplementaria S1-2. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	50
Figura Suplementaria S1-3. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. glabrata</i> ATCC 2001	51
Figura Suplementaria S1-4. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. krusei</i> ATCC 6558	51
Figura Suplementaria S1-5. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. auris</i> 1421	52
Figura Suplementaria S1-6. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. auris</i> 2220	52
Figura Suplementaria S1-7. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. auris</i> 2251	53
Figura Suplementaria S1-8. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. auris</i> 2276	53
Figura Suplementaria S1-9. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. auris</i> 2265	54
Figura Suplementaria S1-10. Actividad de los péptidos evaluados sobre <i>C. tropicalis</i> ATCC 750.....	54
Figura Suplementaria S2-11. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 a 24 horas	55
Figura Suplementaria S2-12. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 a 72 horas	55
Figura Suplementaria S2-13. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre <i>C. auris</i> 1421 a 24 horas	56
Figura Suplementaria S2-14. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre <i>C. auris</i> 1421 a 72 horas	56

Lista de tablas

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias sobre las cepas de <i>Candida</i> evaluadas en forma planctónica.....	28
Tabla 2. Concentraciones inhibitorias de los péptidos sobre las especies de <i>Candida</i> evaluadas formando biopelícula.....	34

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
μM	Micromolar
6-Cl-HOBt	1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol
ATCC	American Type Culture Collection
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CI50	Concentración inhibitoria del 50%
CI90	Concentración Inhibitoria del 90%
CMI	Concentración Inhibitoria Mínima
CMIB	Concentración inhibitoria mínima de los péptidos sobre biopelícula
CLSI	Instituto para Estándares Clínicos y de Laboratorio
DCC	N, N'-diciclohexilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
FIDIC	Fundación de Inmunología de Colombia
FLZ	Fluconazol
HCME	Meningoencefalitis por <i>Candida</i> hematógena
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
INS	Instituto Nacional de Salud
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MBHA	4-metilbenzohidrilamina
MEFs	Fibroblastos de embrión murino
MinCiencias	Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia
MOPS	Ácido morfolino-propano-sulfónico
MTT	Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo
NMP	N-metilpirrolidona
PAM	Péptidos Antimicrobianos
PBS	Tampón fosfato salino
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SDA	Agar Sabouraud dextrosa
t-Boc	tert-butiloxicarbonil
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

1. Introducción

La resistencia microbiana es un problema que concierne a los entes sanitarios y científicos de todo el mundo, incluyendo a Colombia. A pesar del continuo desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, los perfiles de resistencia de muchos microorganismos patógenos se tornan cada vez más agresivos haciendo que los antimicrobianos disponibles vean reducida su efectividad de manera significativa. Por tanto, resulta imprescindible la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción que permitan afrontar esta situación (1).

La candidiasis es una infección de diversas presentaciones clínicas en humanos, la cual llama la atención de toda la comunidad científica por el incremento progresivo de su morbilidad y mortalidad por causa del creciente fenómeno de resistencia antimicrobiana en *Candida* spp. (2). Con el tiempo, se han descrito nuevos mecanismos asociados a la farmacorresistencia en las principales especies patógenas de *Candida*, e incluso la presencia de factores de virulencia y expresión de genes de resistencia, que evidencian la necesidad de buscar alternativas terapéuticas frente a estas levaduras (3).

En Colombia, la candidiasis no es un tema ajeno al contexto sanitario del país. Entre el 2010 y 2013, el 94.5% de los aislados fúngicos en unidades de cuidado intensivo de 20 instituciones de tercer nivel en 10 ciudades de Colombia correspondían a especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la especie más prevalente con una proporción del 48.3%, seguida por *C. tropicalis* con 38.6%, y *C. parapsilosis* con 28.5%. Adicionalmente se determinó que *Candida* spp estuvo vinculada en el 25% de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) principalmente por infección del torrente circulatorio asociado con catéter (4).

Dependiendo de la presentación clínica y de la especie de *Candida* que se aísla en el laboratorio el tratamiento difiere, aunque la principal opción es los azoles. Dentro de esta familia es muy bien conocido el fluconazol, en cuyo caso la resistencia de los aislados colombianos es alrededor del 20% al 30%. Otro de los azoles más usados en la práctica hospitalaria es el voriconazol en donde la resistencia de aislados clínicos colombianos

de *Candida* spp. entre 2001 y 2007 se situaba en 16%, y aumentó a un 26% entre 2010 y 2011 (5,6).

Así entonces, queda patente que las infecciones fúngicas no son ajenas a esta problemática de resistencia antimicrobiana, especialmente aquellas causadas por *Candida albicans* y las especies no-*albicans* como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. auris* entre otras. Adicionalmente, cuando se compara la cantidad de medicamentos disponibles para tratar infecciones bacterianas contra aquellos para combatir las micosis, queda comprobado que este último grupo es mucho más limitado y menos diverso que el primero, lo que torna fundamental el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra hongos y especialmente multirresistentes como el caso de *C. auris* (7).

C. auris ha cobrado importancia en los últimos años ya que las infecciones que genera están asociadas a porcentajes altos de morbimortalidad, lo cual podría ser atribuido a que *C. auris* presenta índices elevados de resistencia a diferentes antifúngicos convencionales, es de fácil transmisión intra- e inter- hospitalaria y difícil identificación en el laboratorio tradicional debido a su semejanza bioquímica y morfológica con otras especies de *Candida* como aquellas del complejo *C. haemulonii* (1,8).

El Instituto Nacional de Salud (INS) en conjunto con el Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia, emitió en septiembre de 2016 una “Alerta por emergencia global de infecciones invasivas causadas por la levadura multirresistente *Candida auris*” y posteriormente, en junio de 2017 publicó una “Circular de fortalecimiento de las acciones en vigilancia para la levadura emergente multirresistente *C. auris*” (9,10). Desde entonces y hasta el 2019, el INS ha recolectado/recibido 689 aislamientos clínicos asociados a infección por *C. auris*, de los cuales cerca de un 40% presentan resistencia a anfotericina B y alrededor del 60% a fluconazol, dos de los antifúngicos más utilizados en el control de la candidiasis en Colombia y a nivel mundial (11).

Adicionalmente, se han caracterizado brotes en por lo menos 20 instituciones médicas en 16 departamentos del país, con una mortalidad estimada, aunque no atribuible, del 50%, en pacientes con un amplio rango de edad. La caracterización de estos brotes ha permitido recuperar la levadura del ambiente hospitalario, demostrando que esta

levadura multirresistente tiene la capacidad de contaminar el ambiente cercano a los pacientes, lo cual la hace un microorganismo de alta importancia en el grupo de aquellos involucrados en las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) (12).

Los péptidos antimicrobianos (PAMs), que han surgido como opción terapéutica contra patógenos resistentes, representan una alternativa promisoriosa para combatir las infecciones fúngicas. Dentro de las principales ventajas de los PAMs, se encuentra su capacidad de romper la membrana de los microorganismos, la cual es un blanco con baja tasa de modificaciones, comparada con otros blancos de acción; así mismo, la actividad sobre membrana se ha asociado con acciones antimicrobianas más rápidas y con menor desarrollo de resistencia (13).

En estudios recientes llevados a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), se identificaron tres péptidos catiónicos con actividad antibacteriana (péptidos 35409, 1609 y 29009). Los estudios realizados por esa institución han reportado que los péptidos 35409 (14), 1609 y 29009 (manuscritos en preparación) tienen actividad frente a bacterias Gram-negativas, como *E. coli*. La actividad antibacteriana de los péptidos 35409, 1609 y 29009 se ha asociado con un efecto membranolítico (14).

Las características de estos péptidos, tales como su alto contenido de estructuras helicoidales, anfipaticidad, carga positiva y contenido de aminoácidos hidrofóbicos, se ajustan dentro de los parámetros descritos para los PAMs con alto potencial de acción sobre membranas cargadas negativamente. Las bacterias y los hongos comparten la característica de estar cargados negativamente en su superficie, por lo que los péptidos a ser evaluados en este estudio podrían presentar un efecto antifúngico importante.

Bajo este panorama, nació este trabajo de investigación que tuvo como objetivo estudiar más a fondo estas moléculas antimicrobianas para identificar su posible potencial antifúngico contra *C. auris* y otras especies de *Candida* de importancia clínica en Colombia y el mundo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los péptidos sintéticos antimicrobianos 1609, 29009 y 35409 contra seis especies del género *Candida* de importancia en salud pública.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad inhibitoria de los péptidos sintéticos antimicrobianos sobre cinco especies de *Candida* de importancia clínica en Colombia y sobre aislamientos clínicos de *C. auris*.
- Identificar el efecto de los péptidos sintéticos antimicrobianos sobre la formación de biopelícula por *C. auris* 1421 y *C. albicans* ATCC 10231.
- Evaluar el daño celular inducido por los péptidos sintéticos antimicrobianos en un aislamiento clínico de la levadura emergente *C. auris* y en una cepa de referencia de *C. albicans* a través de microscopia electrónica de transmisión.
- Determinar la capacidad citotóxica *in vitro* de los péptidos 1609, 29009 y 35409 sobre la línea celular murina L929.

3. Marco teórico

3.1. Generalidades de *Candida* spp.

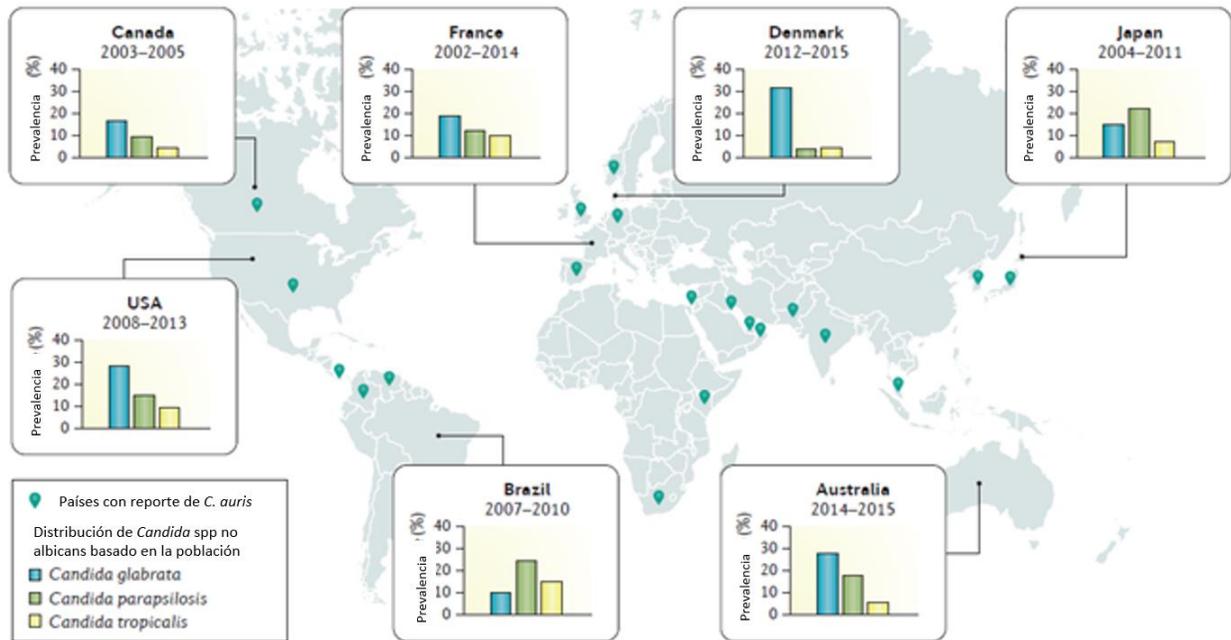
Las infecciones fúngicas han aumentado significativamente en los últimos años debido probablemente al aumento del número de individuos inmunosuprimidos. Para 2017 en Colombia, se presentaron cerca de 750.000 casos de infecciones fúngicas al año, de los cuales cerca de 600.000 son casos de candidiasis, 130.000 de aspergilosis y 16.000 de infecciones oportunistas en pacientes con HIV (15). La candidiasis invasora representa un porcentaje significativo (cerca del 75%) de las infecciones fúngicas en pacientes hospitalizados, variando su frecuencia de acuerdo con el servicio de hospitalización y los factores de riesgo de los pacientes (16).

El principal agente etiológico de la candidiasis a nivel mundial es *C. albicans* representando el 50% de todos los casos, sin embargo, se ha reportado la presencia de especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. auris* causando infección. En la Figura 1 se ilustra la distribución de las infecciones por especies de *Candida* anteriormente nombradas a nivel mundial (17).

A nivel mundial, la candidemia constituye una causa común de morbilidad y mortalidad. Un estudio prospectivo en Estados Unidos que analizó 24.179 casos de infecciones nosocomiales encontró que *Candida* spp., fue la cuarta causa más común de ingreso hospitalario. Otro estudio realizado en el mismo país señaló además que la candidiasis invasiva estaba asociada a tasas de mortalidad entre 15% a 47% (18,19). En Colombia la candidiasis presenta una distribución similar a los datos reportados en el resto del mundo, siendo la candidiasis invasiva la quinta causa de infección del torrente sanguíneo, representando el 88% de las infecciones fúngicas en pacientes hospitalizados y con tasas de mortalidad entre 36% y 78% (20,21).

Uno de los estudios que tiene la casuística más grande de América Latina en cuanto a la incidencia de la candidiasis invasiva fue realizado en 20 centros médicos de siete países de la región encontrándose una incidencia de 1,18 casos / 1.000 ingresos, donde Chile presentó la incidencia más baja de 0,33 casos / 1000 ingresos y la incidencia más elevada fue observada en Colombia 1,96 a cada 1.000 ingresos (22).

Figura 1. Distribución geográfica de infecciones por especies de *Candida* no-albicans en el mundo



Diversos países de todos los continentes del mundo participaron en el estudio de Pappas *et al* en 2018 (17), demostrando que *C. glabrata* es la especie no-albicans más prevalente en el planeta, exceptuando en Latinoamérica en cuyo caso es *C. parapsilosis*. Los señaladores verdes indican los países en donde, hasta el año del estudio, se reportaron casos del patógeno emergente *C. auris*.

Generalmente las infecciones por especies del género *Candida* están relacionadas con el factor de riesgo de los pacientes y se asocian a determinado síndrome clínico, por ejemplo, *C. parapsilosis* está relacionada principalmente con infecciones en recién nacidos y adultos con presencia de catéteres venosos por tiempos prolongados, por otro lado, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* están relacionadas con pacientes mayores y con cirugías de algún tipo (23).

El entendimiento de la candidiasis invasiva comienza con la comprensión de sus manifestaciones clínicas (24). Los pacientes con candidiasis invasiva pueden llegar a presentar algunas manifestaciones como endoftalmitis (lesiones coriorretinales y vítreas), meningoencefalitis por *Candida* hematógena (HCME, por sus siglas en inglés *hematogenous Candida meningoencephalitis*), convulsiones, hemorragias

intraventriculares, regresión o retrasos del desarrollo y pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR), endocarditis (soplos), manifestaciones sistémicas periféricas e insuficiencia cardíaca congestiva, candidiasis hepatoesplénica (candidiasis crónica diseminada, fiebre persistente, dolor abdominal en el cuadrante superior derecho y anorexia), candidiasis aguda diseminada (lesiones cutáneas múltiples, mialgias difusas, hipotensión y fallo multiorgánico), candidiasis renal (disminución de la depuración de creatinina, nefropatía obstructiva), e infecciones osteoarticulares (lesiones osteoarticulares que no responden a la terapia antifúngica empírica) (25).

Estudios han demostrado que el uso profiláctico de fluconazol en pacientes ingresados en unidad de cuidados intensivos (UCI), reduce significativamente la tasa de infección invasiva por diferentes especies de *Candida* y aparentemente disminuye la mortalidad de los pacientes tratados (26). La mayoría de estos estudios demostraron también que se reduce de manera importante la proporción de pacientes con colonización intestinal, sin que se produzcan aparentes cambios en el grado de colonización por cepas de *Candida* más resistentes al fluconazol como son *C. krusei* y *C. glabrata*. Por tanto, la eficacia de la profilaxis antifúngica sistémica con fluconazol está fuera de dudas, pero no significa que esté indicada en todo paciente en situación crítica (27).

Para la elección del tratamiento antifúngico apropiado en el paciente crítico, existen dos situaciones extremas bien definidas en función de la gravedad de cada caso que se deben distinguir: por un lado está el paciente con criterios de sepsis grave o inestabilidad hemodinámica y, en el otro, el paciente con fiebre aislada, pero en situación estable y sin signos de gravedad. Entre ambos escenarios existe un buen número de pacientes con infección de gravedad moderada, en los que la elección del tratamiento partirá del juicio del médico responsable en función de factores tales como el pronóstico de la enfermedad de base, el riesgo de toxicidad del antifúngico, la posible interacción de éste con otros fármacos o la existencia de insuficiencia renal o hepática, entre otros. En cualquier caso, existe una relación clara entre el retraso en el inicio del tratamiento antifúngico de una candidiasis invasiva y la mortalidad relacionada (28).

Aunque el fluconazol es generalmente eficaz contra *C. albicans*, y es un tratamiento de elección seguro y económico, varias especies de *Candida* no-*albicans* son resistentes o

tienen una menor susceptibilidad al fluconazol *in vitro* (29). La determinación de los factores de riesgo asociados con las infecciones de torrente sanguíneo nosocomial causadas por *C. albicans* y no-*albicans*, puede proporcionar orientación para decidir sobre la terapia empírica anti-*Candida* (30).

3.2. *Candida auris*

C. auris es una especie de *Candida* que fue aislada por primera vez del canal auditivo externo de una paciente en Japón en el 2009 y en 15 pacientes en Corea del Sur en el mismo año (31). *C. auris* es una especie genéticamente similar a las especies del complejo *C. haemulonii* y estrechamente relacionada con brotes hospitalarios (32). Esta levadura puede ser identificada erróneamente por sus similitudes fenotípicas como *C. haemulonii*, *C. famata*, *C. catenulata* o *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y especies de *Saccharomyces*, levaduras que rara vez causan infecciones invasivas (33).

La epidemiología a nivel mundial de *C. auris* muestra que entre 2013 – 2017 al menos 742 aislamientos se han reportado en 16 países, la mayoría de los cuales son en India (≥ 243), Estados Unidos (≥ 232) y Reino Unido (≥ 103). El 64.76% de aislamientos se obtuvieron de hombres, con una mortalidad bruta sustancial del 29.75%. Los pacientes afectados presentaron otras comorbilidades como diabetes (≥ 52), sepsis (≥ 48), enfermedades pulmonares (≥ 39) y enfermedades renales (≥ 32) (8). En la Figura 2 puede observarse la distribución de *C. auris* a nivel mundial, con los países que han reportado casos hasta el 15 de febrero de 2021.

En Colombia, entre los años 2016 y 2019, el Instituto Nacional de Salud (INS) recibió 689 aislamientos que fueron identificados como *C. auris* dentro del programa de vigilancia nacional. En un estudio de 2016 también del INS, se describió que más de la mitad de los aislamientos (54,5%) recuperados hasta ese entonces provenían de la región norte del país en los departamentos de Atlántico, Bolívar y Cesar. El promedio de edad de los pacientes fue de 36 años y, 75 de los 123 casos fueron hombres lo que representa un 61% (34,35).

Figura 2. Países con reporte de *C. auris* hasta 15 de febrero de 2021



En azul se señalan los que países que a febrero de 2021 reportaron casos de *C. auris* (36).

En el proceso de infección por *C. auris* no solo en Colombia sino a nivel mundial, se destacan algunos aspectos como la resistencia antimicrobiana intrínseca y la capacidad de permanencia, así como de colonizar material inerte que tiene esta levadura (37). La creciente preocupación por la resistencia a los antifúngicos de tipo triazoles y/o la anfotericina B, ha llevado a la recomendación del uso de equinocandinas como tratamiento empírico el cual debe darse antes de tener disponibles los resultados específicos de pruebas de susceptibilidad antifúngica (38).

Dentro de los mecanismos de resistencia descritos en *C. albicans* se encuentra el impacto de varias mutaciones en la expresión del gen *ERG11*, encargado de la síntesis de la enzima 14 α -desmetilasa indispensable para la síntesis del ergosterol. Las mutaciones que se asociaron con una mayor expresión de este gen están directamente relacionadas con una mayor producción de ergosterol, y la sobreproducción de esta molécula (sitio de acción de diferentes antifúngicos entre ellos los azoles) diluye la actividad del antifúngico produciendo resistencia (39).

En *C. auris* se desconoce la contribución exacta de las mutaciones del gen *ERG11* a la resistencia al fluconazol. Sin embargo, un estudio reciente determinó que aislamientos de *C. auris* con valores elevados de concentración inhibitoria mínima (CMI) a fluconazol presentaban mutaciones puntuales en dicho gen (40). Previamente se había demostrado que las mutaciones en el gen *ERG11* impactaban la resistencia a los medicamentos en otras especies de *Candida* (40) y los aislamientos que no portaban una de estas mutaciones tenían valores de CMI más bajos para los azoles. Toda esta información indica que las mutaciones puntuales en el gen que expresa el ergosterol (molécula blanco) desempeñan un papel importante en la resistencia a drogas como fluconazol por parte de *C. auris* (41).

3.3. Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas que muestran actividad contra diferentes microorganismos siendo, de manera frecuente, eficaces contra un solo tipo de ellos. Así entonces, los PAMs se clasifican en péptidos antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios y antivirales, aunque existen péptidos con amplio espectro de actividad e inclusive con actividad antitumoral (42). Esto se debe a que generalmente la superficie de los microorganismos está cargada negativamente, lo que hace posible que péptidos catiónicos interactúen inicialmente de forma electrostática y luego puedan ejercer su acción contra la membrana microbiana o contra blancos intracelulares (43).

En general, los PAMs están formados por cadenas con menos de 100 aminoácidos y usualmente de carga positiva a pH fisiológico debido al alto contenido de aminoácidos básicos (lisina y arginina), por esto es que se denominan catiónicos. Aproximadamente el 50% de los aminoácidos que constituyen los PAMs son hidrofóbicos y gran parte tiene una estructura α -helicoidal (44).

Los péptidos antimicrobianos son fundamentales en el sistema inmune innato, ya que se asocian con una acción rápida contra los agentes infecciosos microbianos (45). Las características más atractivas de los PAMs son su baja toxicidad para las células humanas y la mínima resistencia que generalmente presentan los microorganismos contra estos péptidos. Se cree que esta dificultad en cuanto al desarrollo de resistencia

se debe a que los PAMs no se dirigen a los receptores moleculares específicos en la superficie microbiana, sino que asumen estructuras anfipáticas que les permite interactuar directamente con las bicapas fosfolipídicas microbianas, permeabilizándolas rápidamente o permitiendo su paso hacia el interior de la célula para su actividad sobre blancos internos (13,45).

Aunque muchos PAMs naturales han sido estudiados, factores como su baja citotoxicidad contra células de mamífero, pero baja estabilidad molecular ha dirigido las investigaciones a la obtención de nuevos PAMs y la identificación de péptidos activos de fuentes naturales. También se ha evaluado el diseño de péptidos sintéticos análogos para estudios de relación estructura-función y/o evaluación de los factores determinantes en su actividad y mecanismo de acción. La síntesis de péptidos análogos permite variar las características de los péptidos que condicionan su actividad sobre diversas membranas y con ellos se ha obtenido péptidos con mayor potencial para ser usados en terapia clínica (46,47).

3.3.1. PAMs de origen natural

Los péptidos antimicrobianos de origen natural están presentes en casi todos los organismos vivos, sean animales o plantas, lo que incluye bacterias, artrópodos (un ejemplo es el escorpión africano, del cual se ha aislado la pandinina 1 y la opistoporina 1) (48), e incluso mamíferos (como el cerdo, que produce cecropina P1, entre otros) (49). En humanos, prácticamente todos los tejidos y células normalmente expuestos a los microorganismos son capaces de producir PAMs, inclusive la actividad antimicrobiana de la saliva depende en gran medida de PAMs ricos en histidina conocidos como histatinas (50).

El actuar rápido de los péptidos antimicrobianos contra los microorganismos y la alteración que induce en su estructura celular, facilitan la liberación de antígenos que activan indirectamente el sistema inmune innato del hospedero (51). En algunos casos, se ha descartado el uso de muchos de ellos como antibióticos debido a que no son selectivos resultando tóxicos sobre las células eucariotas, particularmente de mamíferos (en las que también se ve afectada la membrana celular), por su baja estabilidad bajo

condiciones fisiológicas o por su tamaño, lo que se relaciona con un alto costo de producción (43).

3.3.2. PAMs de origen sintético

La búsqueda de nuevos PAMs implica la identificación de péptidos activos a partir de fuentes naturales, seguido por el diseño de péptidos sintéticos análogos para estudios de relación estructura-función y/o evaluación de los factores determinantes en su actividad y mecanismo de acción. Esta búsqueda se centra en el diseño usando herramientas computacionales o en la selección a partir de grandes bibliotecas de péptidos y los nuevos candidatos, totalmente sintéticos, se pueden producir mediante síntesis química o expresión recombinante (52,53).

La versatilidad, estabilidad, fácil caracterización y relativo bajo costo hacen que los péptidos sintéticos sean una herramienta valiosa en investigación básica y en el desarrollo de aplicaciones tecnológicas. Así mismo, la síntesis de péptidos análogos permite variar las características de los péptidos que condicionan su actividad sobre diversas membranas (54).

Algunos péptidos sintéticos han sido utilizados en modelos experimentales de candidiasis como es el caso de la gomesina, un péptido sintético antimicrobiano obtenido de la hemolinfa de una araña brasilera (*Acanthoscurria gomesiana*). Los resultados obtenidos con este péptido tanto en el modelo de candidiasis vulvovaginal como candidiasis diseminada fueron promisorios y en ambos modelos hubo una disminución significativa de la carga fúngica en los animales tratados con gomesina (55).

4. Materiales y métodos

4.1. Cepas de *Candida auris* y otras especies de *Candida* de importancia clínica.

Los experimentos *in vitro* fueron realizados con cinco aislamientos clínicos de *C. auris* de los cuales uno era sensible al fluconazol (cepa 1421), y cuatro resistentes a fluconazol (cepas 2220, 2251, 2276, y 2265). Estos aislamientos pertenecen a la colección de cepas del Grupo de Microbiología del INS en colaboración con el grupo MICROS de la Universidad del Rosario. Adicionalmente se usaron las siguientes cepas de referencia: *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. krusei* ATCC 6558. Las levaduras fueron mantenidas y/o preservadas en glicerol al 10% a -80°C.

4.2. Consideraciones éticas

Según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, Título IV “de la bioseguridad de las investigaciones”, Capítulo 1 “de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos”, se aplicaron todas las consideraciones expuestas en los Artículos 63-72. Esto teniendo en cuenta que los microorganismos a estudiar, *C. auris* y otras especies de *Candida*, se encuentran clasificados dentro del grupo de riesgo II (microorganismos que representan riesgo moderado para el individuo y limitado para la comunidad), por lo que deben manejarse en laboratorios de tipo básico de microbiología empleando cámaras de bioseguridad cuando sea necesario. Todos los experimentos se realizaron en el Grupo de Microbiología del INS, considerado laboratorio de seguridad microbiológica, y en el laboratorio del Grupo MICROS de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario, laboratorio de máxima seguridad microbiológica.

4.3. Síntesis y purificación de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos 35409, 1609 y 29009 fueron sintetizados por el grupo de síntesis química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) mediante la estrategia de síntesis en fase sólida siguiendo la estrategia tert-butiloxycarbonil (t-Boc) y utilizando una resina 4-metilbenzohidrilamina (MBHA; 100-200 mesh) con una sustitución de 0.53 mmol/g. Los péptidos fueron purificados y caracterizados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los péptidos con purezas superiores al 90% fueron utilizados para los ensayos de actividad antifúngica.

4.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los péptidos 1609, 29009 y 35409

La actividad antifúngica de los péptidos 35409, 1609 y 29009 contra las cepas de *C. auris*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, fue determinada *in vitro*. Las levaduras, se preservaron a -80°C y posteriormente se cultivaron en agar Sabouraud dextrosa (SDA, Difco) a 37°C por 48h antes de cada experimento para obtener un crecimiento ideal.

La CMI de cada péptido se determinó por la técnica de microdilución en medio líquido en placa de 96 pozos por triplicado, siguiendo los procedimientos del manual de referencia M27-S4 (2017, 4ª Edición) del Instituto para Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) para ensayos de susceptibilidad antifúngica de levaduras.

Los péptidos fueron diluidos en RPMI-1640 con MOPS (ácido morfolino-propano-sulfónico) en concentraciones seriadas desde 100 a 0.19 µM dejando un volumen final de 50 µL en los pozos de la placa. Posteriormente, se preparó una suspensión de levadura en RPMI con una concentración de 1 a 5 x 10³ células/mL y se añadió 50 µL de esta solución a cada una de las concentraciones preparadas de los péptidos. La CMI se definió como la menor concentración de cada péptido capaz de inhibir el crecimiento microbiano *in vitro*.

Junto a la CMI, las concentraciones que inhibieron el crecimiento de las levaduras en un 50% (CI50) y en 90% (CI90) se determinaron después de 24 horas de incubación a 37°C, por medio de la lectura de la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm. La CMI del fluconazol (Pfizer, USA) fue determinada para todas las cepas, como control del experimento. Este antifúngico fue diluido en RPMI-1640 en concentraciones seriadas desde 128 a 0.25 µg/ml.

Adicional al tratamiento con fluconazol, el crecimiento de las levaduras sin tratamiento antibiótico y/o peptídico junto al medio de cultivo sin ningún tipo de inóculo fueron usados como controles de crecimiento y esterilidad respectivamente.

4.5. Evaluación de la capacidad inhibitoria de biopelícula de los péptidos 1609, 29009 y 35409

Para determinar el efecto en la formación de biopelícula en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos (56), se preparó una suspensión de 50 µL por pozo de *C. auris* 1421 y de *C. albicans* ATCC 10231, con una concentración de 2×10^6 células/mL en una placa de 96 pozos (Costar, Cod: 3799, NY, USA). Posteriormente, diferentes concentraciones seriadas de los péptidos (100 µM a 0.19 µM) 35409, 1609 y 29009, fueron adicionadas en las placas y se incubaron por 24h y 72h a 37°C. Luego de este proceso, el sobrenadante fue retirado y se cuantificó la biopelícula por el ensayo de reducción de XTT descrito por Pierce *et al.*, 2008 (57). El ensayo se realizó por triplicado.

La CMIB (concentración inhibitoria de biopelícula) se definió como la menor concentración de cada péptido capaz de inhibir la formación de biopelícula *in vitro*. Junto a la CMIB, las concentraciones que inhibieron la formación de biopelícula en un 50% (CI50) y en 90% (CI90) se determinaron después de 24 horas y 72 horas de incubación a 37°C, por medio de la lectura de la densidad óptica a una longitud de onda de 492 nm

La CMIB del fluconazol (Pfizer, USA) fue determinada para todas las cepas, como control del experimento. Este antifúngico fue diluido en RPMI-1640 en concentraciones seriadas desde 128 a 0.25 µg/ml. Adicionalmente, la formación de biopelícula de cada cepa sin

tratamiento antibiótico y/o peptídico junto al medio de cultivo sin ningún tipo de inóculo fueron usados como controles de crecimiento y esterilidad respectivamente.

4.6. Efecto de los péptidos sobre la morfología de las levaduras mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para evaluar el efecto de los péptidos sobre la morfología celular de *C. auris*, la levadura fue tratada con los péptidos 35409, 1609 y 29009 a una concentración de 100 µM. Posteriormente, las levaduras fueron recolectadas por centrifugación y lavadas tres veces con PBS. La cepa de *C. auris* 1421 tratada por separado con cada uno de los péptidos, fue fijada en glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 4%. Todo este procedimiento fue realizado también con una cepa de referencia, *C. albicans* (ATCC 10231). Acto seguido, las muestras fueron lavadas en la misma solución y fijadas con tetróxido de osmio 1% en presencia de ferrocianuro de potasio 1.25% y CaCl₂ en tampón cacodilato 0.1 M durante 1 h, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90, 100% y etanol súper seco), durante 30 minutos, y finalmente embebidas en resina Spurr. Cortes ultrafinos obtenidos en un ultramicrotomo fueron colectados en mallas de cobre con 300 mesh, contrastado con acetato de uranilo y citrato de azufre y observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 Plus con cámara Gatan. Esta metodología fue realizada en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Fundación Santa Fe.

4.7. Determinación de la actividad citotóxica *in vitro* de los péptidos 35409, 1609 y 29009.

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* de los péptidos antimicrobianos 1609, 29009 y 35409 fue realizado utilizando la línea celular de fibroblastos murinos MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) a una concentración de 3×10^5 células por pozo.

Para cada ensayo, las células fueron suspendidas por separado, en medio DMEM (Sigma-Aldrich, USA) y distribuidas en placas de fondo plano de 96 pozos (Costar 3596,

NY, USA), las cuales fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Después de este tiempo, los péptidos antimicrobianos 35409, 1609 y 29009, disueltos en el mismo medio de cultivo de la línea celular, fueron adicionados a las células en diferentes concentraciones (desde 12.5 µM hasta 200 µM) y las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 24 horas. Para determinar la viabilidad de las células y la citotoxicidad de los péptidos, se utilizó el método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - Sigma, St Louis, MO) según el protocolo de Danihelová et al (58). Los controles usados para esta prueba fueron control de crecimiento (células sin tratamiento) y control de muerte (células tratadas con DMSO -dimetilsulfóxido- al 100%). Estos experimentos fueron realizados por triplicado.

5. Resultados

5.1. Los péptidos 1609, 29009 y 35409 inhibieron el crecimiento de las seis especies de *Candida* evaluadas

Para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI), así como la Concentración Inhibitoria del 90% (CI90) y del 50% (CI50), se realizó el ensayo de microdilución en placa con lectura por densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 405 nm, usando diferentes concentraciones de los péptidos 1609, 29009 y 35409 frente a cada una de las cepas seleccionadas en este estudio. En la siguiente tabla (Tabla 1) se compilan los resultados obtenidos en este ensayo.

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias sobre las cepas de *Candida* evaluadas en forma planctónica

Cepa	Péptido	CMI	CI90	CI50
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1609	100 µM	50 µM	6.25 µM
	29009	100 µM	-	6.25 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	25 µM
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1609	100 µM	25 µM	6.25 µM
	29009	<100 µM	50 µM	6.25 µM
	35409	<100 µM	100 µM	1.56 µM
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	1609	100 µM	-	6.25 µM
	29009	<100 µM	<100 µM	3.12 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	100 µM
<i>C. krusei</i> ATCC 6558	1609	25 µM	12.5 µM	3.12 µM
	29009	25 µM	-	-
	35409	100 µM	50 µM	3.12 µM
<i>C. auris</i> 1421 Sensible a FLZ	1609	<100 µM	<100 µM	25 µM
	29009	<100 µM	<100 µM	6.25 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	12.5 µM
<i>C. auris</i> 2220	1609	<100 µM	<100 µM	25 µM
	29009	<100 µM	<100 µM	100 µM

Resistente a FLZ	35409	<100 µM	<100 µM	<100 µM
C. auris 2251	1609	<100 µM	<100 µM	100 µM
Resistente a FLZ	29009	<100 µM	<100 µM	<100 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	50 µM
C. auris 2276	1609	<100 µM	<100 µM	100 µM
Resistente a FLZ	29009	<100 µM	<100 µM	100 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	<100 µM
C. auris 2265	1609	<100 µM	<100 µM	100 µM
Resistente a FLZ	29009	<100 µM	<100 µM	<100 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	<100 µM
C. tropicalis ATCC 750	1609	50 µM	25 µM	6.25 µM
	29009	100 µM	50 µM	25 µM
	35409	50 µM	-	-

Las concentraciones inhibitorias se determinaron luego de calcular el porcentaje de inhibición a partir del control del crecimiento y el ajuste de las lecturas con el control de esterilidad. <100 µM significa que la concentración inhibitoria no se encuentra dentro del rango de concentraciones estudiadas en este estudio, mientras que (-) significa que ninguna concentración estudiada alcanzó el 90% o 50% de inhibición. FLZ= Fluconazol.

Estos resultados demostraron que los tres péptidos ensayados tuvieron actividad inhibitoria sobre las 10 cepas de *Candida* seleccionadas en este estudio. Para el péptido 1609, se determinó que inhibió el 100% del crecimiento de las levaduras con Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) desde 25 µM (*C. krusei*) hasta 100 µM (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*). Sin embargo, resulta interesante observar que su actividad inhibitoria comenzó desde 3.12 µM con CI50 en *C. parapsilosis* pasando por CI90 de 12.5 µM con *C. krusei*.

La actividad inhibitoria del péptido 29009 se determinó con CMI que estuvieron, al igual que con el PAM 1609, entre 25 µM (*C. krusei*) y 100 µM (*C. albicans* y *C. tropicalis*). También se observó que la actividad inhibitoria de esta molécula comenzó desde 3.12 µM siendo ésta la CI50 para *C. glabrata*, y alcanzó CI90 de 50 µM con *C. parapsilosis*. Por otro lado, resultó llamativo que la actividad del péptido sobre *C. krusei* fuera

directamente una inhibición completa del crecimiento de la levadura sin pasar por CI50 o CI90.

Con respecto al péptido 35409, se encontró CMI's más altas que con los péptidos anteriores partiendo desde 50 μM (*C. tropicalis*) hasta 100 μM (*C. krusei*). Aun así, este PAM tuvo actividad inhibitoria del 50% (CI50) desde 1.56 μM (*C. parapsilosis*) siendo la concentración inhibitoria más baja descrita en este estudio. Por otro lado, resultó llamativo igualmente que su actividad inhibitoria sobre *C. tropicalis* fuera directamente una depleción completa del crecimiento del microorganismo sin tener CI90 o CI50.

Al comparar la actividad de los tres péptidos sobre las 6 especies de *Candida* estudiadas (Figura 3), se determinó que el PAM 1609 fue la molécula con mayor espectro de actividad al inhibir el 100% del crecimiento en 5 especies de *Candida*, seguido por el 29009 con inhibición total en 3 especies, y por último 35409 con inhibición total en 2 especies. También queda patente que todos los péptidos inhibieron por lo menos el 50% del crecimiento en todas las *Candida* spp. evaluadas.

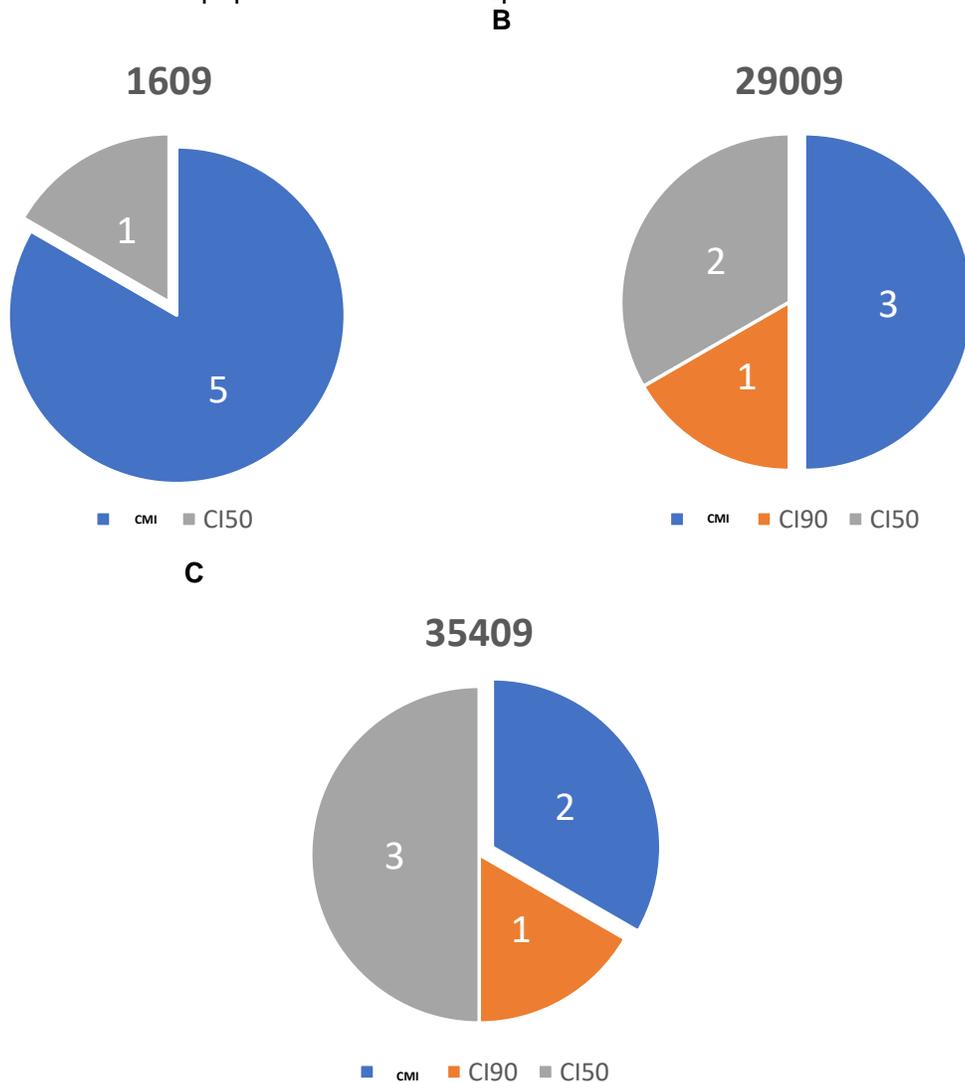
A nivel de cepas (Figura 4), se observó que el péptido 1609 fue el único que tuvo actividad inhibitoria sobre todas las cepas estudiadas, ya sea con inhibición completa o parcial del crecimiento de las levaduras. Por su parte, los péptidos 29009 y 35409 inhibieron el crecimiento de 8 y 7 cepas respectivamente, siendo inocuos para algunas de las cepas resistentes al fluconazol de *C. auris*.

De las cepas evaluadas, *C. krusei* ATCC 6558 y *C. tropicalis* ATCC 750 fueron las cepas más susceptibles a la actividad inhibitoria de los péptidos ensayados ya que los tres PAM inhibieron el 100% del crecimiento de la levadura con los valores de CMI más bajos en este estudio (CMI de 25 μM con los péptidos 1609 y 29009 para *C. krusei* y 50 μM con 1609 y 35409 para *C. tropicalis*). Por otro lado, los aislamientos clínicos de *C. auris* y la cepa *C. glabrata* ATCC 2001 fueron las cepas menos susceptibles a la actividad inhibitoria de los péptidos.

Frente a los aislamientos de *C. auris*, los tres péptidos inhibieron hasta el 50% del crecimiento de dichas cepas con CI50 desde 6.25 μM con el PAM 29009 para la cepa 1421 susceptible al fluconazol, hasta 100 μM para las cepas resistentes al fluconazol. Así mismo, el péptido 29009 no tuvo actividad sobre las cepas resistentes al fluconazol

2251 y 2265, mientras que el péptido 35409 fue inocuo para las cepas resistentes al fluconazol 2220, 2276 y 2265 (Tabla 1).

Figura 3. Actividad de los péptidos sobre las 6 especies de *Candida* estudiadas

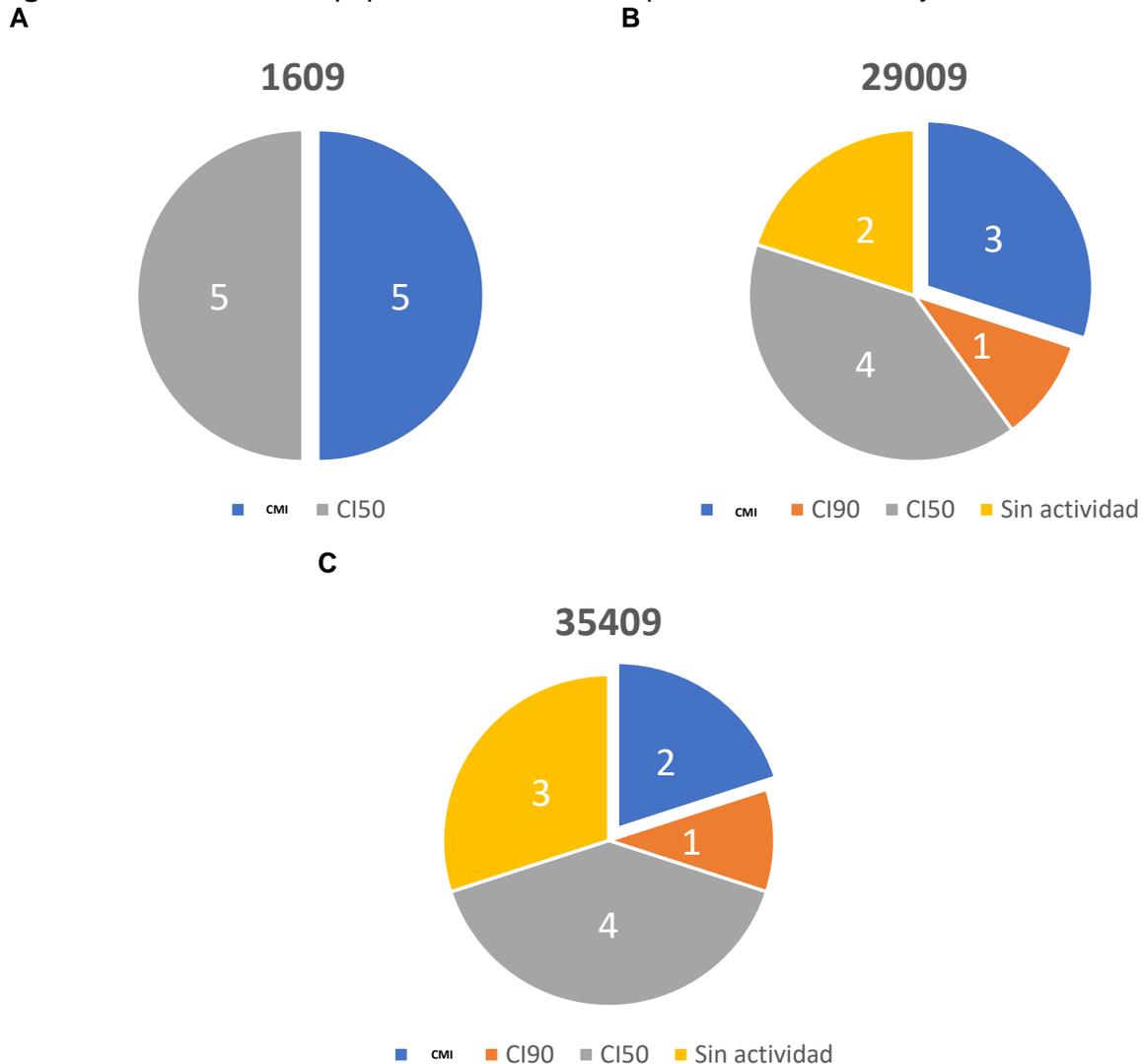


Se señala el número de especies de *Candida* en donde los péptidos 1609 (A), 29009 (B), y 35409 (C) inhibieron hasta el 100% del crecimiento (CMI), el 90% del crecimiento (CI90), o el 50% del crecimiento (CI50).

La menor susceptibilidad de *C. glabrata* frente a la actividad de los péptidos estudiados se traduce en que tan solo el PAM 1609 inhibió el 100% del crecimiento de la levadura

con CMI de 100 μ M, mientras que las moléculas 29009 y 35409 disminuyeron el crecimiento hasta el 50% con CI50 de 3.12 μ M y 100 μ M.

Figura 4. Actividad de los péptidos sobre las 10 cepas de *Candida* ensayadas



Se señala el número de cepas de *Candida* en donde los péptidos 1609 (A), 29009 (B), y 35409 (C) inhibieron hasta el 100% del crecimiento (CMI), el 90% del crecimiento (CI90), el 50% del crecimiento (CI50), o no tuvieron actividad inhibitoria (Sin actividad).

La menor susceptibilidad de *C. glabrata* frente a la actividad de los péptidos estudiados se traduce en que tan solo el PAM 1609 inhibió el 100% del crecimiento de la levadura

con CMI de 100 μ M, mientras que las moléculas 29009 y 35409 disminuyeron el crecimiento hasta el 50% con CI50 de 3.12 μ M y 100 μ M.

5.2. La formación de biopelícula en *C. albicans* y *C. auris* fue inhibida por los péptidos 1609, 29009 y 35409

Para determinar la concentración inhibitoria mínima de los péptidos sobre la formación de biopelícula, se incubaron con diferentes concentraciones de los PAMs 1609, 29009 y 35409 con las cepas *C. auris* 1421 y *C. albicans* ATCC 10231, por 24 horas y 72 horas a 37°C. Para asegurar la formación de biopelículas, se usó un inóculo mayor de levaduras (2×10^6 células/ml) y posterior a la incubación, se realizaron lavados seriados con PBS para asegurar la remoción de las células libres y que no quedaron adheridas formando biofilm en el fondo de la placa.

La formación de biopelícula se midió de manera indirecta a través de la reducción del XTT por las células vivas formando biopelícula. Para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de Biopelícula (CMIB), así como la Concentración Inhibitoria del 90% (CI90) y del 50% (CI50), la lectura de las placas de cultivo se realizó por densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 492 nm.

Por otro lado, para este ensayo se usaron *C. albicans* ATCC 10231 y *C. auris* 1421 (cepa sensible al fluconazol). Esta primera levadura se escogió ya que *C. albicans* es una de las especies con mayor capacidad de formar biopelícula, hasta el punto en que dicha característica se ha convertido en uno de sus principales factores de virulencia. *C. auris* fue escogido por su persistencia prolongada en el ambiente y su impacto en salud pública como patógeno emergente en Colombia y el mundo.

Los resultados obtenidos en este ensayo se resumen en la siguiente tabla (Tabla 2):

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias de los péptidos sobre las especies de *Candida* evaluadas formando biopelícula

24 horas				
Especie	Péptido	CMIB	CI90	CI50
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1609	12.5 µM	-	-
	29009	25 µM	12.5 µM	3.12 µM
	35409	<100 µM	<100 µM	3.12 µM
<i>C. auris</i> 1421	1609	-	-	25 µM
	29009	-	-	25 µM
	35409	-	-	12.5 µM
72 horas				
Especie	Péptido	CMIB	CI90	CI50
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1609	25 µM	-	-
	29009	100 µM	-	50 µM
	35409	-	-	50 µM
<i>C. auris</i> 1421	1609	-	-	25 µM
	29009	-	-	12.5 µM
	35409	-	-	25 µM

Las concentraciones inhibitorias se determinaron luego de calcular el porcentaje de inhibición a partir del control del crecimiento y el ajuste de las lecturas con el control de esterilidad. <100 µM significa que la concentración inhibitoria no se encuentra dentro del rango de concentraciones estudiadas en este estudio, mientras que (-) significa que ninguna concentración estudiada alcanzó el 90% o 50% de inhibición.

En este estudio se evidenció que los tres péptidos inhibieron la formación de biopelícula en las dos cepas de *Candida* evaluadas. Frente a *C. albicans* se observó que los péptidos 1609 y 29009 inhibieron completamente la formación de la biopelícula a 24 horas con una CMIB de 12.5 µM y 25 µM respectivamente, siendo este primer valor la CMIB más baja descrita en este trabajo. Sin embargo, resulta muy interesante que el péptido 35409 inhibió el 50% de la formación de la biopelícula con una CI50 de 3.12 µM.

A 72 horas, la actividad inhibitoria de los péptidos se mantiene, aunque exhibiendo CMIBs mayores con 25 µM para 1609 y 100 µM para 29009. El péptido 35409 también demostró aumento en su concentración inhibitoria, obteniendo así una CI50 de 50 µM.

Con respecto a *C. auris*, los péptidos ensayados inhibieron hasta el 50% de la formación de biopelícula con CI50 desde 12.5 μM (35409) hasta 25 μM (1609 y 29009) a 24 horas. A 72 horas, se observó la misma actividad inhibitoria con el 1609 manteniendo su valor de CI50, el 29009 disminuyendo su CI50 a la mitad (12.5 μM), y aumentando la CI50 del 35409 A 25 μM .

Finalmente, es importante mencionar que todos los resultados obtenidos en este ensayo fueron validados por los controles utilizados durante los ensayos de CMI como se observa en el Material Suplementario S2.

5.3. La morfología de las levaduras *C. albicans* y *C. auris* es afectada por los péptidos 1609, 29009 y 35409

Para determinar si la actividad antifúngica de los péptidos 1609, 29009 y 35409 afectaba la morfología de las levaduras *C. albicans* ATCC 10231 y *C. auris* 1421, se procedió a tratar las células con los tres péptidos a una concentración de 100 μM para ser observadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) de la Fundación Santa Fe.

Tal como se puede apreciar en la Figura 5, los péptidos alteraron la morfología de *C. albicans* ATCC 10231 si se compara con el control (levadura sin tratamiento). Con los péptidos 29009 y 35409 se observó un adelgazamiento de la membrana celular considerable, pero los tres PAMs claramente afectaron la membrana causando que la célula perdiera su forma esférica regular. Adicionalmente los organelos en las células tratadas se encontraron desorganizados, señal de una perturbación intracelular significativa.

Con respecto a *C. auris* 1421, los 3 péptidos evaluados tuvieron un comportamiento ligeramente diferente (Figura 6). En líneas generales y con respecto a la levadura sin tratamiento, la célula mantuvo su forma regular esférica y no se observaron perturbaciones claras en la continuidad de la membrana. Sin embargo, a nivel interno se apreció que los organelos estuvieron desorganizados e incluso con el péptido 35409 se observó una acumulación de pequeñas vacuolas en su extremo izquierdo.

En *C. albicans* se esperaba obtener este tipo de imágenes TEM ya que dos de estos péptidos estudiados alcanzaron valores de CMI, sin embargo, es destacable la acción apreciable de los PAMs sobre *C. auris* teniendo que cuenta que la inhibición de los péptidos sobre esta levadura alcanzó el 50%.

Figura 5. Imágenes TEM de *C. albicans* ATCC 10231 tratada con los PAMs 1609, 29009 y 35409, y sin tratamiento.

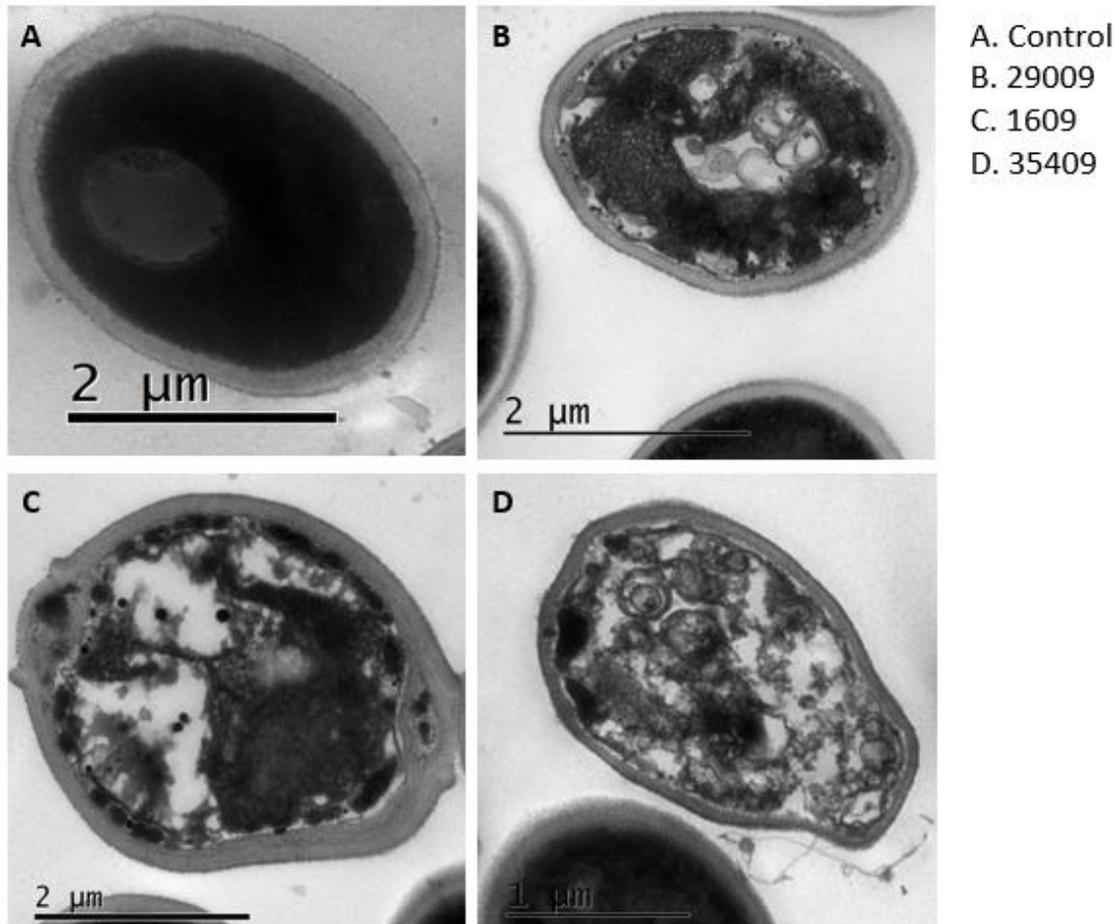
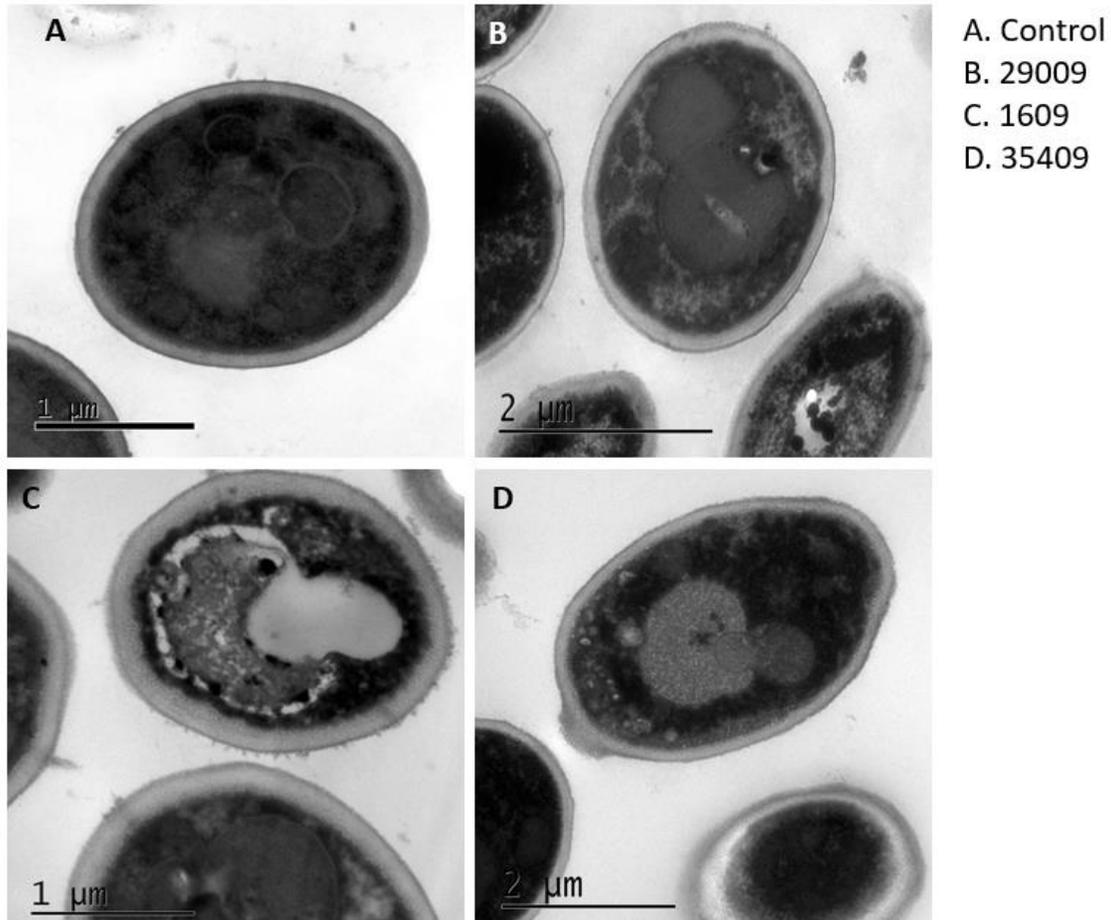


Figura 6. Imágenes TEM de *C. auris* 1421 tratada con los PAM 1609, 29009 y 35409, y sin tratamiento.

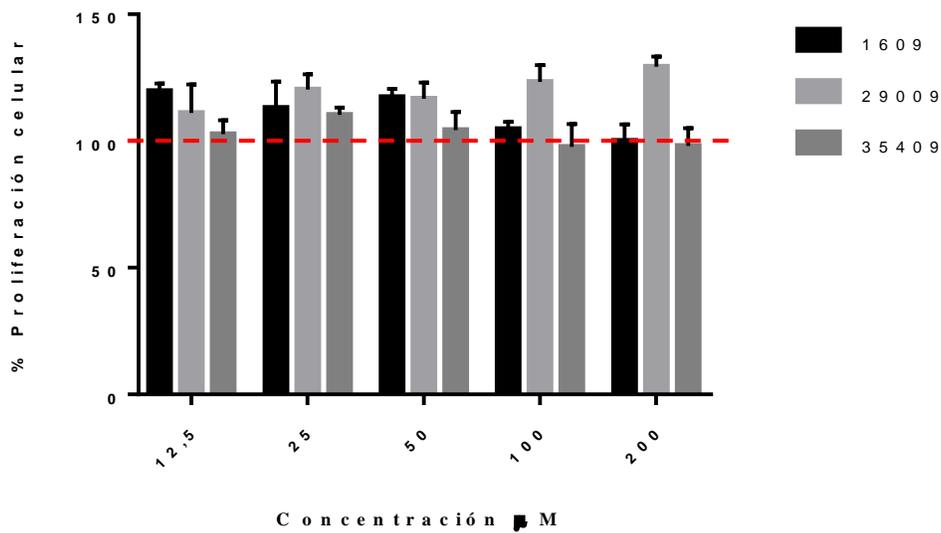


5.4. Los péptidos 1609, 29009 y 35409 no tienen actividad citotóxica sobre la línea celular murina L929

Para determinar la citotoxicidad de los péptidos en líneas celulares de mamíferos, se tomó como referencia la línea celular murina L929 y sometió a un tratamiento por 24h con los péptidos en 5 concentraciones diferentes (desde 12.5 μM hasta 200 μM). Las concentraciones de los péptidos fueron seleccionadas de tal modo que abarcaran mayoritariamente aquellas en donde se observaron actividad antifúngica de los PAMs al 50%, 90% o 100%, adicional a una concentración mayor a la estudiada en los ensayos de CMI como lo recomienda la literatura revisada.

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 7. Con respecto al control, es decir las células L929 sin tratamiento, no se observaron cambios significativos indicando que ninguno de los péptidos afectó el crecimiento regular de la línea celular indicando total ausencia de efecto citotóxico sobre las mismas. Adicionalmente, este resultado apunta a una presunta selectividad de los PAMs evaluados frente a células eucariotas de mamífero normal (L929) y células del patógeno de interés, *Candida* spp.

Figura 7. Actividad de los péptidos evaluados sobre la línea celular murina L929



La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las barras 1609, 29009 y 35409. El 100% del crecimiento se señala con la línea punteada roja.

6. Discusión

Los péptidos antimicrobianos se convierten en una alternativa interesante para enfrentar el problema progresivo de farmacorresistencia en las levaduras del género *Candida* ya que se ha descrito su actividad sobre las células planctónicas pero también sobre las biopelículas que estos microorganismos forman, así como resultados en estudios de citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* que respaldan la seguridad teórica de muchas de estas moléculas (59,60).

En nuestro estudio se seleccionaron las 6 especies de *Candida* más frecuentes asociadas a candidiasis en el mundo y en Colombia, y se enfrentaron a tres péptidos sintéticos cuya actividad antimicrobiana ha sido reportada sobre bacterias Gram-negativas. Este precedente, junto a sus propiedades fisicoquímicas descritas en estudios previos, permitió dilucidar que posiblemente el efecto antimicrobiano podría extenderse a las levaduras de interés clínico por la similitud de carga eléctrica entre las membranas (61).

Con *C. albicans* ATCC 10231 se observó que 2 de los tres péptidos (1609 y 29009) lograron inhibir el 100% del crecimiento celular a una concentración de 100 μM en ambas moléculas. Este valor no dista mucho de los reportado por de Alteriis *et al* (62) quienes obtuvieron una concentración inhibitoria mínima (CMI) para el péptido indolicidina de 79 μM (150 $\mu\text{g/ml}$) para la misma cepa de nuestro estudio, aunque para otras cepas de referencia la CMI alcanzó valores de 105 μM (200 $\mu\text{g/ml}$).

Otros estudios han reportado valores más reducidos de CMI contra *C. albicans* ATCC 10231, como la actividad del péptido críptico de origen arqueano VLL-28 que se situaba sobre 25 μM (63). Sin embargo, nuestros péptidos tienen la particularidad de tener potencial antibacteriano también, característica que lo hace similar al péptido WMR-K reportado por Galdiero E *et al* (64). En el estudio de este grupo, determinaron una actividad potente del péptido WMR-K contra la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* (CMI de 10 μM), mientras que para *C. albicans* ATCC 10231 la CMI fue de 200 μM . Por tanto, se puede decir que nuestros péptidos, especialmente el 1609 y 29009, tienen

mejor actividad antifúngica que WMR-K teniendo presente que éstos cuentan con una actividad dual (antibacteriana y antifúngica).

Frente a *C. parapsilosis* ATCC 22019, el único péptido que logró inhibir completamente el crecimiento de la levadura fue el 1609 con una concentración de 100 μM . Este valor de CMI es superior a lo reportado por Jia F *et al* quienes determinaron que el péptido Jelleine-I impedía el crecimiento total de esta levadura a una concentración de 64 μM (65). Sin embargo, es importante destacar la actividad del péptido 29009 el cual inhibió hasta en un 90% del crecimiento de la levadura en una concentración de 50 μM , teniendo así una actividad similar al péptido derivado de veneno de abejas, VIII, el cual reportó el mismo valor de IC90 en un estudio de 2019 (66).

Cabe agregar que el potencial antifúngico de los péptidos seleccionados en este estudio frente a *C. parapsilosis* ATCC 22019 sigue siendo alentador, teniendo en cuenta que la concentración de inhibición del 50% del crecimiento del microorganismo se situó en concentraciones que oscilan entre 1.56 μM y 6.25 μM . Seguramente con una modificación en la estructura de los péptidos o usándolos conjuntamente con una concentración terapéutica menor de los antimicóticos tradicionales, se puede mejorar el efecto antifúngico obteniendo posiblemente un efecto aditivo o efecto sinérgico del tratamiento (67).

La levadura *C. glabrata* ATCC 2001 fue una de las especies de *Candida* seleccionadas en este estudio que presentó mayor resistencia a los péptidos evaluados. Si bien los tres péptidos inhibieron el 50% del crecimiento del microorganismo en concentraciones desde 3.12 μM (29009) hasta 100 μM (35409), el único que logró una depleción completa del crecimiento fue el 1609 con una concentración de 100 μM . No hubo concentraciones IC90.

El valor de CMI reportado en este estudio con el péptido 1609 para *C. glabrata* ATCC 2001 es diferente a lo descrito por otros grupos de investigación en donde la inhibición completa del crecimiento con péptidos antimicrobianos sintéticos se logró con concentraciones entre 32 μM y 50 μM (65,68). No obstante, otros estudios también han descrito que *C. glabrata* es la especie de *Candida* más resistente a la actividad de los PAMs (péptidos antimicrobianos) desconociéndose la razón de este fenómeno (63,66).

Por tanto, resulta interesante cualquier actividad antifúngica con péptidos antimicrobianos como la descrita con el 1609 para enfrentar a *C. glabrata* que es intrínsecamente resistente al fluconazol.

Contrario al caso anterior, *C. krusei* ATCC 6558 fue la especie más susceptible a los tres péptidos antimicrobianos evaluados en este estudio. Todos los péptidos inhibieron el crecimiento de la levadura en un 100%, presentando mejor actividad el 1609 y 29009 con un valor de CMI de 25 μ M. Este resultado es superior frente a la actividad del péptido Jelleine-I cuya CMI para esta levadura fue de 32 μ M, e idéntica a la capacidad antifúngica del péptido críptico arqueano VLL-28 (63,65).

La especie *C. krusei* es naturalmente resistente al fluconazol y suele adquirir otros mecanismos de resistencia frente a otros tipos de antifúngicos. A pesar de ello, varios grupos de investigación también han descrito que esta especie de *Candida* usualmente es más susceptible a la actividad antifúngica de los péptidos antimicrobianos (63). Es plausible que la razón de este fenómeno radique en la composición particular de la membrana en esta especie, pero aún no hay un estudio que valide o desmienta esta suposición.

C. auris es la especie de *Candida* que está captando mayor atención mundial en la última década debido a su aparición como patógeno humano naturalmente resistente o multirresistente a los antifúngicos tradicionales. En nuestro estudio y junto a *C. glabrata* ATCC 2001, fue la especie más resistente a la actividad de los péptidos evaluados ya que todos ellos lograron inhibir hasta el 50% del crecimiento de la levadura.

No obstante, el resultado de IC50 descrito en este estudio para la cepa 1421 sensible al fluconazol es mucho mejor a lo presentado por otros estudios de investigación. Por ejemplo, el péptido crotamina inhibió el 50% del crecimiento *C. auris* CBS 1091 en una concentración de 40 μ M (69), mientras que el péptido 29009 y 35409 tuvieron una concentración IC50 a 6.25 μ M y 12.5 μ M respectivamente. Incluso la concentración IC50 del péptido 1609 es resaltante ya que la actividad del péptido inicia en 25 μ M.

De cara a los aislados clínicos resistentes al fluconazol, los resultados arrojaron un comportamiento similar al observado en la cepa sensible al fluconazol de *C. auris*, es decir, todos los PAMs estudiados inhibieron hasta el 50% del crecimiento de las

levaduras. Sin embargo, fue el péptido 1609 el único que inhibió el crecimiento en las 4 cepas resistentes, incluso manteniendo la misma CI50 en *C. auris* 2220 (25 μ M). Para el resto de cepas y péptidos, las concentraciones inhibitorias del 50%, rondaron entre 50 y 100 μ M.

En comparación con la crotamina, estos resultados se mantienen como hallazgos interesantes frente a aislamientos clínicos de *C. auris* resistentes al fluconazol. Con el péptido en mención, los valores de CI50 (concentración inhibitoria del 50%) estaban entre 80 y 160 μ M siendo significativamente superiores a los reportado en nuestro estudio para los PAM (péptidos antimicrobianos) 1609, 29009 y 35409, frente a nuestros aislados clínicos resistentes al fluconazol (69).

No obstante, hubo un hecho que llamó la atención en los resultados arrojados en el estudio de CMI frente a las cepas resistentes al fluconazol de *C. auris*: todas las 4 cepas fueron resistentes al péptido 29009 o al 35409, o incluso para los dos como fue el caso de la cepa 2265. Ante este hecho, se podría mencionar el estudio realizado por Darteville, P. *et al* (70) en donde se advirtió que algunas especies de *Candida* pueden secretar ciertas proteasas como la manoproteína Mp65 o la proteasa aspártica Sap6 como mecanismo de defensa frente a la acción de los PAMs.

Lo anterior no implica que ese sea el único mecanismo de defensa de *Candida* spp. frente a los PAMs o que aquella sea la explicación de la inocuidad de los péptidos 29009 y 35409 para una u otra de las cepas resistentes al fluconazol de *C. auris*, pero sí es una invitación a ahondar en este tema en futuros estudios de investigación.

Por otro lado, resulta interesante que el péptido 1609 sea el único con actividad en todas las cepas de *C. auris* resistentes al fluconazol. Ciociola, T *et al* (71) determinaron que los aminoácidos polares solían mejorar la actividad de los péptidos antimicrobianos, lo cual sería congruente con el hecho de que el péptido 29009 es un derivado del 1609 y se diferencian por una sustitución de lisina por alanina en la posición 10, es decir, se cambió un aminoácido polar (lisina) por uno apolar (alanina) en el 29009. Sin embargo, el 60% de la estructura aminoacídica del 35409 está constituida por aminoácidos polares y es catiónico como el 1609 y 29009 (14). Esto implica que hay más factores estructurales y químicos que influyen en la actividad de un péptido antimicrobiano.

Entre tanto para *C. tropicalis* ATCC 750, los tres péptidos lograron inhibir el 100% del crecimiento en concentraciones de 50 μM (1609 y 29009) y 100 μM (29009), siendo la otra especie más susceptible a la actividad de los péptidos estudiados, después de *C. krusei* ATCC 6558. Los resultados descritos en este estudio son similares a los reportados para los análogos del péptido L-temporina cíclica por Bellavita R *et al* en donde la CMI estuvo también en 50 μM (68). Frente a la CMI descrita con otro péptido como la indolicidina, los tres péptidos incluidos en esta investigación tienen mejor actividad ya que para este primero la inhibición completa del microorganismo se alcanza a 79 μM (150 $\mu\text{g/ml}$) (62).

Los anteriores resultados fueron obtenidos sobre las levaduras en forma libre o planctónica, es decir, como células nadando o flotando durante su crecimiento y desarrollo en el medio líquido seleccionado. Sin embargo, algunas de las principales especies *Candida* spp. se caracterizan por formar biopelículas convirtiéndose en un importante factor de virulencia que confiere mayor patogenicidad y persistencia en el ambiente. Por tal motivo era peyorativo evaluar la actividad de los péptidos sobre la formación de biopelícula en *C. albicans* y *C. auris*, principales patógenos de interés en el ambiente clínico y en el contexto de salud pública.

Los péptidos 1609 y 29009 lograron inhibir la formación de biofilm en *C. albicans* ATCC 10231 con concentraciones de 12.5 μM y 25 μM respectivamente en 24 horas, incluso extendiendo su efecto a 72 horas con concentraciones de 25 μM para el 1609 y 100 μM para el péptido 29009. Estos resultados son mejores a los descritos para otros péptidos como el caso de ToAP2 cuya inhibición de la formación de biofilm en *C. albicans* se alcanzó a 25 μM , o de los péptidos análogos derivados de veneno de abeja que inhibieron hasta el 90% de la formación de biofilm en una concentración de 28.6 μM para LL-III/43 Y 62.3 μM para VIII (66,67).

Con respecto a *C. auris* 1421, los péptidos evaluados inhibieron hasta un 50% la formación de biopelícula en 24 horas con concentraciones de 25 μM para 1609 y 29009, y 12.5 μM para 35409. Y de manera interesante, los péptidos mantuvieron su actividad inhibitoria a 72 horas, excepto por el 35409 que pasó a inhibir el 50% de la formación de biopelícula con una concentración de 25 μM . Otros péptidos como los análogos de la L-

temporina cíclica alcanzaron a inhibir el 90% de la formación de biopelícula con la misma concentración de 25 μ M, indicando que el potencial antifúngico de los tres péptidos seleccionados en este estudio es promisorio (68).

Frente a la formación de biopelícula, se plantea que los péptidos antimicrobianos tienen 2 principales mecanismos de acción: permeabilización de la membrana y/o unión directa al DNA de la levadura. Con respecto a este primero, se ha demostrado que un amplio repertorio de péptidos modifica el potencial de membrana de las levaduras durante la formación de biopelícula conduciendo a una pérdida de la estabilidad osmótica de la célula (67). A esta teoría se le suma la premisa de que los péptidos durante su unión electrostática con la membrana de la levadura, produce interferencia física entre las interacciones que debe tener la membrana con la superficie para continuar con la formación de biopelícula (68). Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de ciertos péptidos de unirse al material genético de la levadura conduciendo a una posible afectación en la expresión de genes asociados al crecimiento y desarrollo de biopelícula en el microorganismo (72).

Basado en lo anterior, podría explicarse el por qué las concentraciones inhibitorias de biopelícula a 24 horas son menores a lo descrito a 72 horas de la formación de biopelícula. Posiblemente a 24h, los péptidos interfirieron físicamente entre la membrana de la levadura y la superficie de la placa de cultivo impidiendo entonces que se formara la biopelícula. Sin embargo, a 72 horas el efecto de los PAM pudo ser directamente sobre las células ya sea impermeabilizando la membrana o uniéndose a los ácidos nucleicos de la célula.

De este modo, las concentraciones de CMIB son menores a 24 horas que a 72 horas con los péptidos estudiados porque posiblemente a ese primer período de tiempo, la interferencia física del péptido con la superficie de la placa y la membrana de la levadura impidió que las células formaran la biopelícula y por ende fueron retiradas durante el lavado de la placa. En cambio, a 72h, la inhibición de la biopelícula pudo darse a que las células estaban afectadas (a nivel de membrana y/o material genético) siendo el efecto inhibitorio correlacionable con los valores de CMI inicialmente descritos en este trabajo.

Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) dieron cuenta de una perturbación significativa en la morfología de las células de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. auris* 1421 con 24 horas de tratamiento con los tres péptidos. En ambos casos se observó alteraciones importantes en el interior celular siendo más severo en *C. albicans*, lo cual resulta lógico si se piensa que los péptidos tuvieron una mayor actividad inhibitoria para esa especie que en *C. auris*.

Las perturbaciones morfológicas e intracelulares observadas en *C. albicans* son similares a lo descrito por otros grupos de investigación en los últimos 3 años. Por ejemplo, con el péptido ToAP2 se evidenció alteraciones importantes en la membrana de la levadura de tal modo que se perdió la forma ovalada típica de estas células, mientras que con los péptidos LL-III/43 y VIII hubo signos claros de organelos desorganizados en un interior celular francamente afectado (66,67).

Para *C. auris* 1421, no se evidenció alteraciones marcadas en la membrana celular con respecto al control de la levadura, pero a nivel intracelular se destacó la presencia de cúmulos de vacuolas en el citoplasma. Con respecto a la membrana, puede que el efecto de los péptidos sea menos marcado sobre *C. auris* ya que su actividad inhibitoria fue menor a la descrita para *C. albicans* pero resulta interesante que unas observaciones similares fueron detalladas en un estudio de 2019 con el péptido CGA-N9 aunque con *C. tropicalis*. En dicho estudio se evidenció por TEM que mientras la membrana celular se mantuvo intacta en las especies de *Candida* estudiadas, en el interior se observó daño en la estructura mitocondrial y vacuolización en el citoplasma (61).

A lo largo de los últimos años, se han hecho aproximaciones a lo que podría ser el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. En términos generales, es muy común que muchos péptidos afecten la integridad de la membrana celular como el caso de la D-Cateslitina la cual desarrolla una estructura alfa-hélice hoja-beta que deforma la membrana y forma poros sobre ella, o como la L-temporina cíclica de la cual se especula que modifica el potencial de membrana conduciendo a una filtración de membrana y subsecuentemente a una permeabilización local (68,70).

Otros estudios han demostrado que los PAMs pueden ejercer otros efectos que conduzcan a tener su actividad antimicrobiana sin afectar la integridad de la membrana.

Un ejemplo claro de esos mecanismos alternativos es el del péptido Jelleine-I cuya actividad inhibitoria es el resultado de la producción de especies reactivas de oxígeno en el interior celular, o del péptido KP que también estimula la formación de estos compuestos, aunque con una actividad disruptiva adicional sobre la mitocondria (65,71).

Nuevas investigaciones también han demostrado que el efecto inhibitorio podría ejercerse directamente sobre el material genético de *Candida* spp. El péptido MAF-1A tuvo la capacidad de disminuir la expresión de los genes *EGR6*, *EGR6*, y *EGR11* los cuales están asociados a la biosíntesis del ergosterol, vital para la formación de la membrana celular (73).

Por tanto, los resultados de TEM obtenidos en el presente estudio son solo un indicativo del potencial antifúngico de los péptidos 1609, 29009 y 35409 pero se requiere de estudios más profundos que determinen cuál posible mecanismo de acción sea el responsable de causar las perturbaciones descritas.

Finalmente, la línea celular murina L929 fue tratada con los péptidos 1609, 29009 y 35409, y no se observó cambios en su crecimiento regular, demostrando la inocuidad de los PAMs para estas células. Diferentes estudios han descrito citotoxicidad nula con otras líneas celulares como la D-Cateslitina sobre células gingivales humanas, o el péptido Kw4 sobre los queratinocitos humanos HaCaT (70,72). Sobre linajes murinos, el péptido CGA-N9 resultó totalmente inocuo para las células endoteliales murinas de cerebro bEnd.3 (61).

Es peyorativo una evaluación más extensa de la citotoxicidad *in vitro* de los péptidos, pero este primer acercamiento vislumbra tanto inocuidad de los péptidos con células eucariotas mamíferas, así como una posible selectividad de los mismos entre levaduras y dichos linajes celulares. Por ejemplo, el grupo de Jia, F *et al* describió en 2018 que la Jelleine-I hacía contacto directo con la laminarina y manansina presentes solo en la membrana de *Candida* spp., dotando al péptido de una aparente selectividad del péptido frente a la línea celular mamífera HEK293 (65).

De este modo, los resultados expuestos en este trabajo demuestran que los péptidos 1609, 29009, y 35409 son una potencial alternativa terapéutica para enfrentar a *Candida*

spp., tanto por su potencial inhibitorio sobre las células planctónicas y sésiles como por su inocuidad en el linaje celular de referencia L929.

7. Conclusiones

En conclusión, este estudio demostró que los péptidos 1609, 29009 y 35409 son una posible y promisoría alternativa terapéutica contra las especies de *Candida* más prevalentes en Colombia y el mundo por cuanto:

- Los tres péptidos inhibieron el crecimiento en forma libre o planctónica de *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6558, y 5 aislamientos clínicos de *C. auris* de los cuales 4 cepas eran resistentes al fluconazol. Adicionalmente se demostró que el péptido 1609 presentó mejor actividad antifúngica al inhibir el 100% del crecimiento en 5 de las 6 especies estudiadas. Por otro lado, *C. krusei* ATCC 6558 y *C. tropicalis* ATCC 750 fueron las especies más susceptibles a la actividad de los 3 PAMs.
- Se evidenció que los tres péptidos inhibieron la formación de biopelícula tanto en *C. albicans* ATCC 10231 como *C. auris* 1421 tanto a 24 como a 72 horas de tratamiento.
- La morfología de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. auris* 1421 fue visiblemente afectada posterior al tratamiento con los tres péptidos por 24 horas, sugiriendo un posible efecto de los péptidos tanto sobre membrana como a nivel intracelular.
- No se apreció actividad citotóxica de los tres péptidos estudiados sobre la línea celular murina L929.

8. Recomendaciones

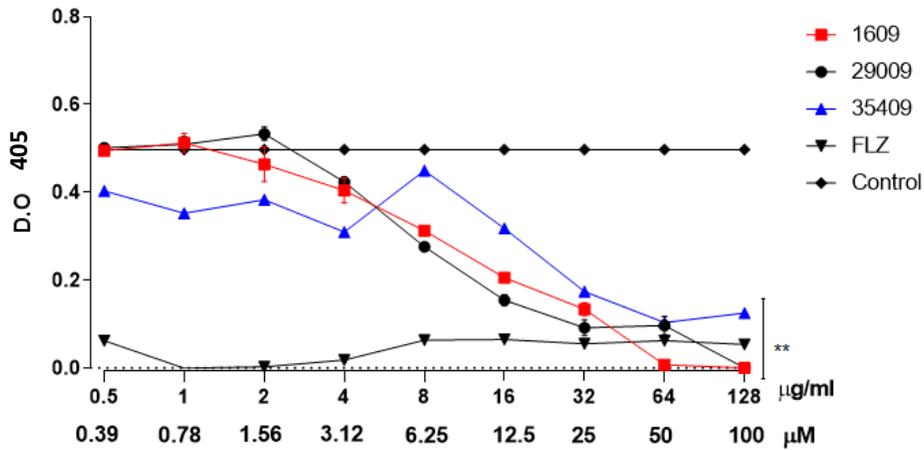
Posterior a la realización de este trabajo de investigación y reconociendo las limitaciones de este, se plantean las siguientes recomendaciones para futuros estudios relacionados:

1. Realizar ensayos de sinergia entre los péptidos evaluados y los antimicóticos tradicionales, o incluso con otros PAMs, para mejorar la actividad inhibitoria del tratamiento en *Candida* spp.
2. Estudiar posibles modificaciones químicas y estructurales para el péptido 1609 de tal modo que se pueda potenciar su actividad antifúngica sobre las levaduras del género *Candida*.
3. Realizar ensayos de CMI con aislamientos clínicos de *Candida* spp., diferentes a *C. auris* y con perfiles de susceptibilidad variados.
4. Determinar el efecto de los péptidos 1609, 29009 y 35409 sobre biopelículas ya formadas y sobre un repertorio más de amplio de especies de *Candida*, incluyendo aislamientos clínicos con perfiles de susceptibilidad variados.
5. Evaluar el daño celular inducido por los péptidos con técnicas diferentes a TEM como citometría de flujo con yoduro de propidio, filtración de la calceína, medición de especies reactivas de oxígeno, entre otros, que permitan identificar con mayor precisión el mecanismo de acción de los PAMs sobre las levaduras.
6. Complementar el ensayo de citotoxicidad *in vitro* con otras líneas celulares de referencia, incluyendo linajes de origen humano.
7. Considerar el ensayo de toxicidad *in vivo* con modelos animales murinos que permitan determinar inocuidad, farmacodinamia, biodisponibilidad, farmacocinética, etc., del péptido 1609.

9. Material Suplementario

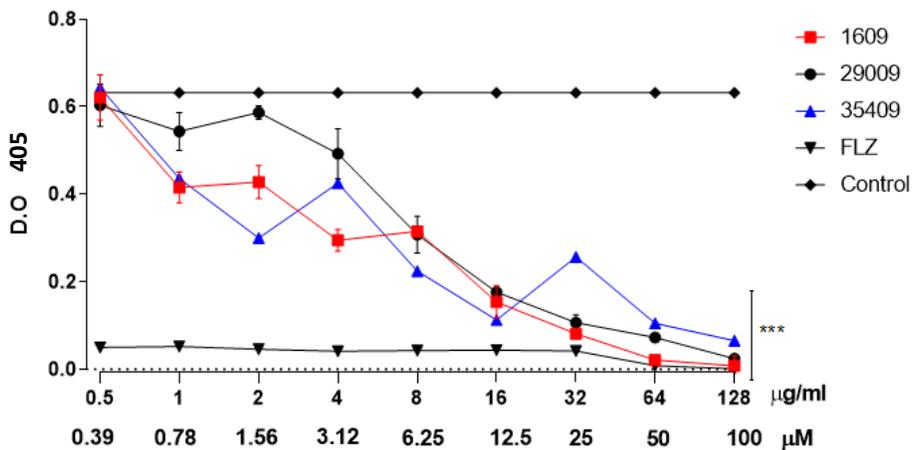
9.1. S1: Ensayo Actividad Inhibitoria de los PAMs 1609, 29009 y 35409 en *Candida* spp.

Figura Suplementaria S1-1. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. albicans* ATCC 10231



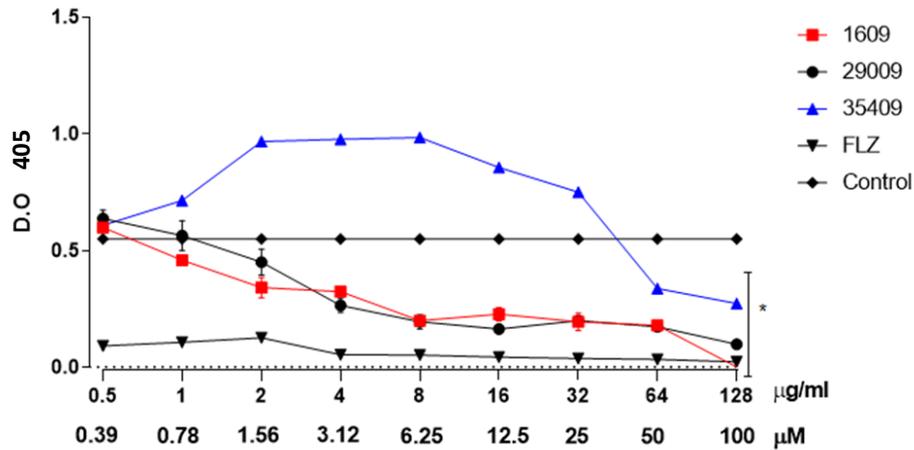
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-2. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. parapsilosis* ATCC 22019



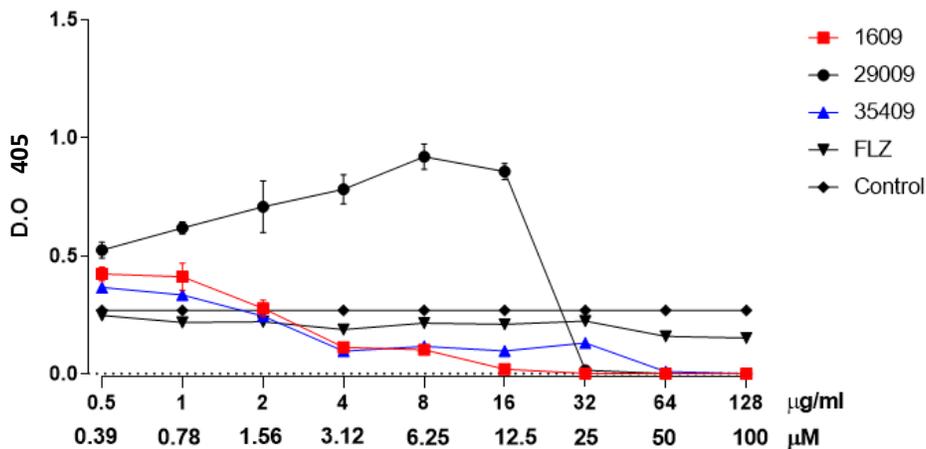
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-3. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. glabrata* ATCC 2001



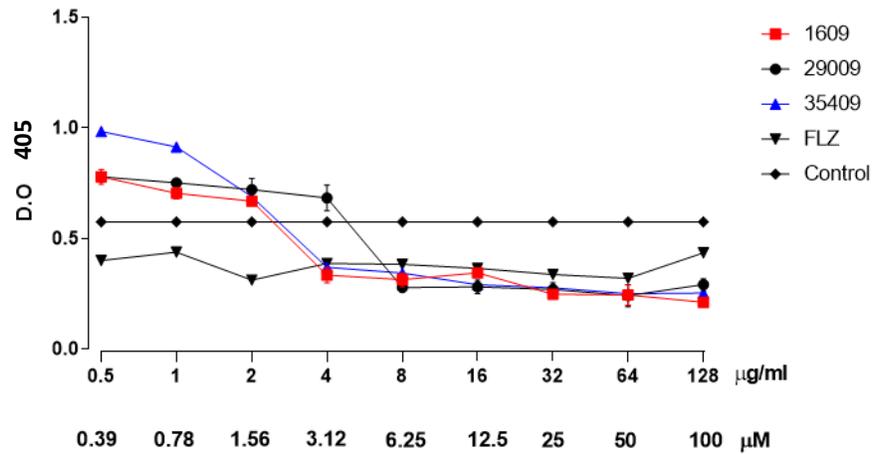
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-4. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. krusei* ATCC 6558



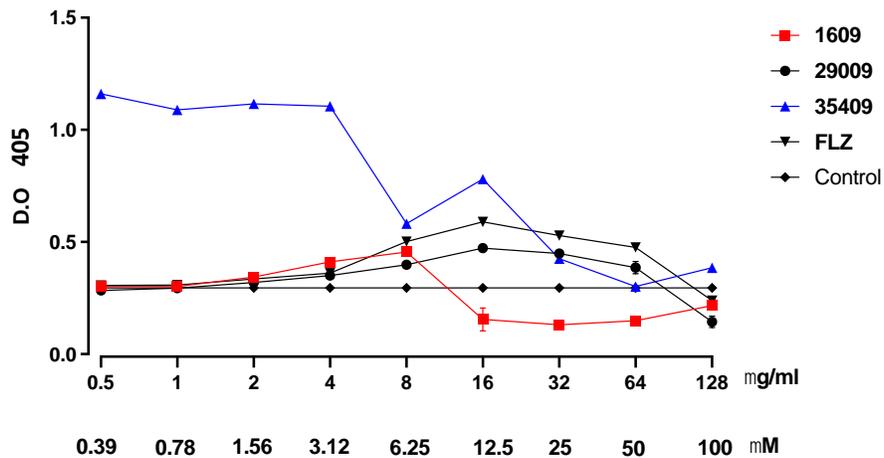
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-5. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. auris* 1421



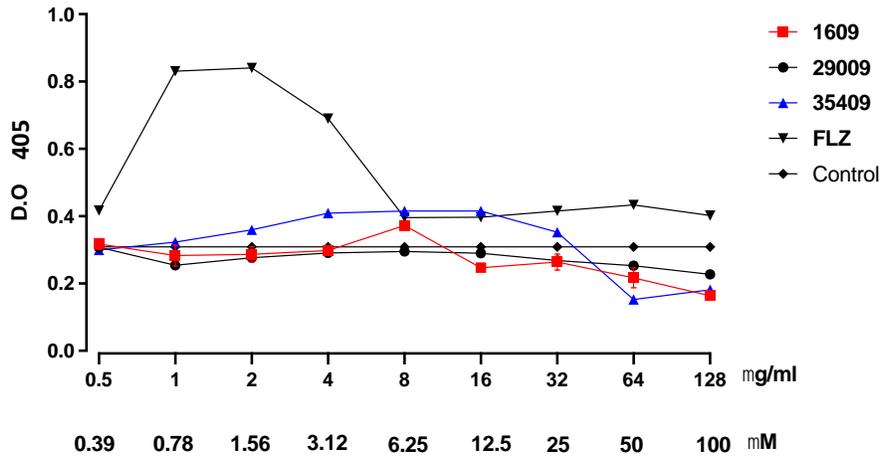
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-6. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. auris* 2220



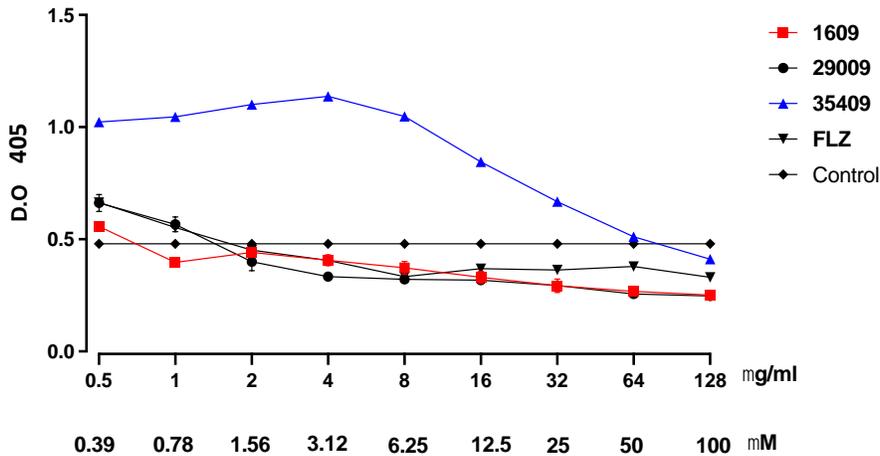
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-7. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. auris* 2251



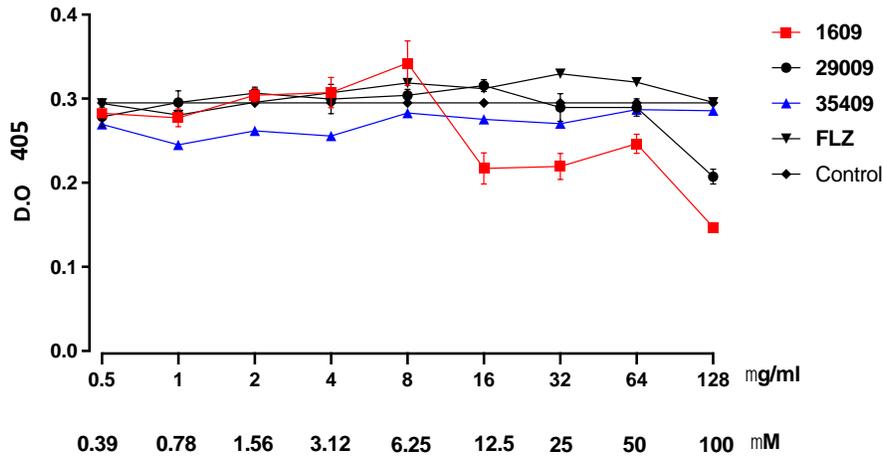
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-8. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. auris* 2276



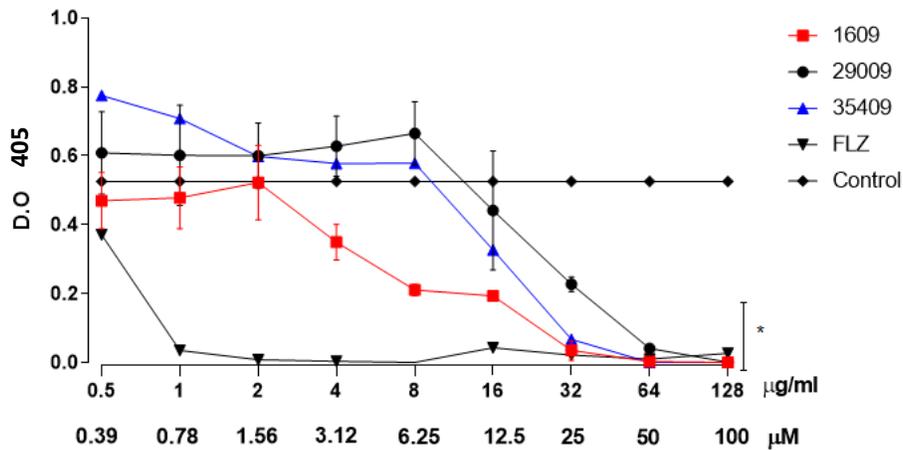
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S1-9. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. auris* 2265



La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de $** p < 0.001$.

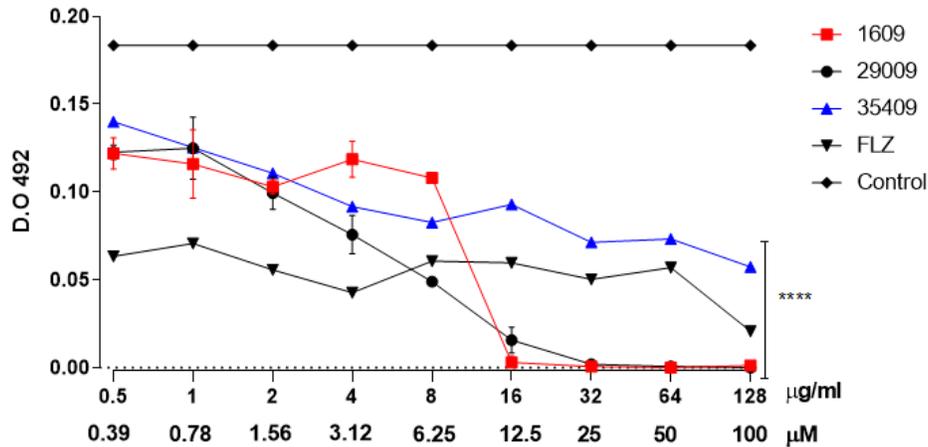
Figura Suplementaria S1-10. Actividad de los péptidos evaluados sobre *C. tropicalis* ATCC 750



La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de $** p < 0.001$.

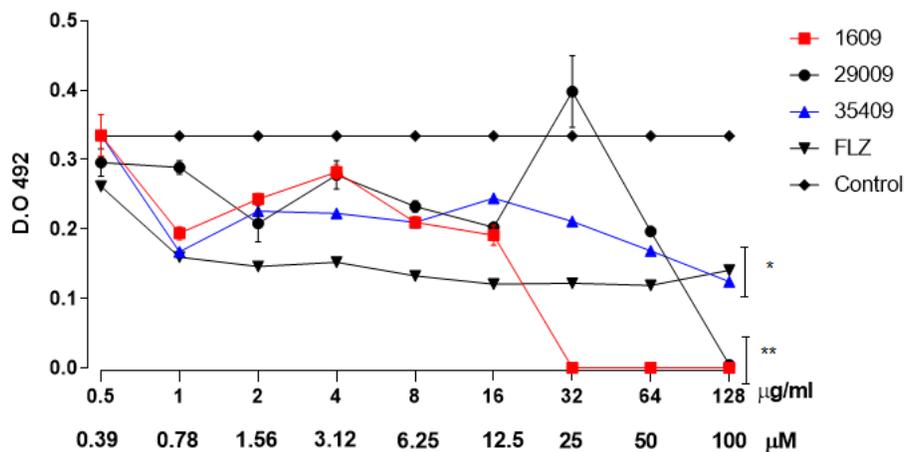
9.2. S2: Ensayo Actividad Inhibitoria sobre la formación de Biopelícula de los PAMs 1609, 29009 y 35409 en *Candida* spp.

Figura Suplementaria S2-11. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre *C. albicans* ATCC 10231 a 24 horas



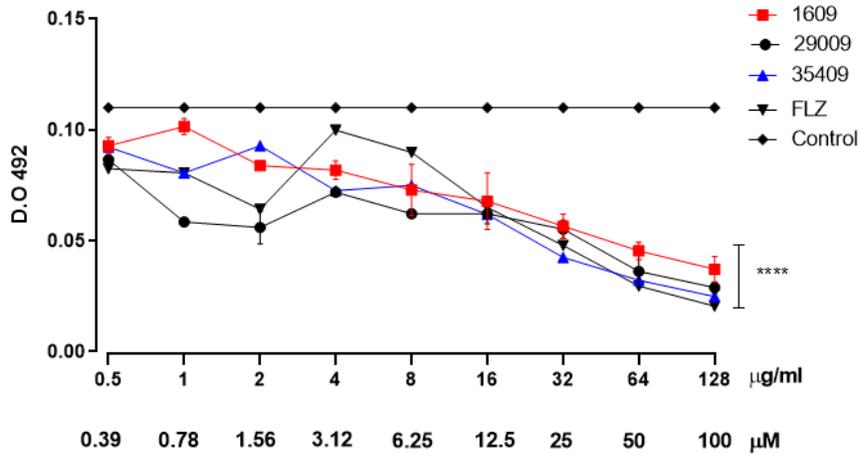
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S2-12. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre *C. albicans* ATCC 10231 a 72 horas



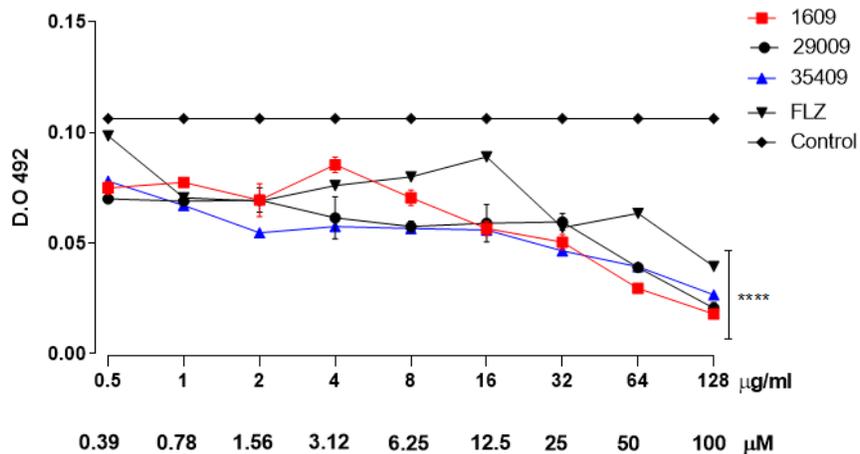
La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S2-13. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre *C. auris* 1421 a 24 horas



La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Figura Suplementaria S2-14. Actividad de los péptidos evaluados en la formación de biopelícula sobre *C. auris* 1421 a 72 horas



La actividad de los péptidos evaluados se ilustra con las líneas 1609, 29009, y 35409. El crecimiento de la levadura sin ningún tratamiento se representa con la línea Control, y la actividad del fluconazol se ilustra con la línea FLZ. Los datos representan una significancia estadística de ** $p < 0.001$.

Referencias

1. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management [Internet]. Vol. 17, *The Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2017 [cited 2021 Mar 23]. p. e383–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330991730316X>
2. Srivastava V, Singla RK, Dubey AK. Emerging Virulence, Drug Resistance and Future Antifungal Drugs for Candida Pathogens. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2018 May 29;18(9):759–78.
3. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews* [Internet]. 2021 Mar 24 [cited 2022 Mar 21];121(6):3390–411. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
4. Motoa G, Muñoz JS, Oñate J, Pallares CJ, Hernández C, Villegas MV. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2017 Jan 1;34(1):17–22.
5. Maldonado NA, Cano LE, de Bedout C, Arbeláez CA, Roncancio G, Tabares ÁM, et al. Association of clinical and demographic factors in invasive candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida* species: a study in 15 hospitals, Medellín, Colombia 2010–2011. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014 Jun 1;79(2):280–6.
6. Zuluaga Rodríguez A, de Bedout Gómez C, Agudelo Restrepo CA, Hurtado Parra H, Arango Arteaga M, Restrepo Moreno Á, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007). *Revista Iberoamericana de Micología*. 2010 Jul 1;27(3):125–9.
7. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance - Another way to cope with stress [Internet]. Vol. 153, *Microbiology*. Microbiology (Reading); 2007 [cited 2021 Mar 24]. p. 3211–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17906120/>
8. Osei Sekyere J. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen*. 2018 Aug 1;7(4).
9. Instituto Nacional de Salud. Circular 0025 [Internet]. Bogotá D. C.; 2017 Jul [cited 2021 Mar 24]. Available from: https://www.famisanar.com.co/wp-content/uploads/2019/10/Infecciones-Invasivas_-0025-DE-2017-INS-CANDIDA.pdf
10. Instituto Nacional de Salud. Alerta por emergencia global de infecciones invasivas causadas por la levadura multirresistente, *Candida auris* [Internet]. Bogotá D. C.; 2016 Sep

- [cited 2021 Mar 24]. Available from: <https://www.gov.uk/government/collections/candida-auris>
11. Carvajal-Valencia SK, Lizarazo D, Duarte C, Escandon P. Identification of *Candida auris* isolates recovered through laboratory surveillance in Colombia: A challenge for diagnostic. *Infectio* [Internet]. 2020 Jun 10 [cited 2021 Mar 24];24(4):224–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.22354/in.v24i4.880>
 12. Zuluaga A. *Candida auris*: estrategias y retos para prevenir un brote. *Biomédica* [Internet]. 2020 Mar [cited 2021 Mar 24];40(1):5–10. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v40n1/0120-4157-bio-40-01-5.pdf>
 13. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance [Internet]. Vol. 96, *Journal of Dental Research*. SAGE Publications Inc.; 2017 [cited 2021 Mar 24]. p. 254–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27872334/>
 14. Barreto-Santamaría A, Curtidor H, Arévalo-Pinzón G, Herrera C, Suárez D, Pérez WH, et al. A new synthetic peptide having two target of antibacterial action in *E. coli* ML35. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 24];7(DEC). Available from: </pmc/articles/PMC5167725/>
 15. Alvarez-Moreno CA, Cortes JA, Denning DW. Burden of fungal infections in Colombia. *Journal of Fungi* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Mar 31];4(2). Available from: </pmc/articles/PMC6023354/>
 16. de Bedout C, Gómez BL. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano *Candida* and candidiasis: the challenge continues for an early diagnosis. *Infectio* [Internet]. 2010 [cited 2021 Mar 31];14:159–71. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a08.pdf>
 17. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers* [Internet]. 2018 May 11 [cited 2021 Mar 31];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29749387/>
 18. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2021 Mar 31];39(3):309–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15306996/>
 19. Mejia-Chew C, O'Halloran JA, Olsen MA, Stwalley D, Kronen R, Lin C, et al. Effect of infectious disease consultation on mortality and treatment of patients with *Candida* bloodstream infections: a retrospective, cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019 Dec 1;19(12):1336–44.
 20. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)* [Internet]. 2018 Dec 31 [cited 2021 Mar

- 31];18(1):75–85. Available from:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2018000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
21. Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos E v., Cortés JA, Ruiz JF, et al. Candidemia en Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 26];40(1):195–207. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572020000100195&lng=en&nrm=iso&tlng=es
 22. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Mar 19 [cited 2021 Apr 1];8(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527176/>
 23. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Vol. 31, *Revista Iberoamericana de Micología*. Elsevier Doyma; 2014. p. 42–8.
 24. Benjamin DK, Poole C, Steinbach WJ, Rowen JL, Walsh TJ. Neonatal candidemia and end-organ damage: A critical appraisal of the literature using meta-analytic techniques. *Pediatrics* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2021 Apr 1];112(3 1):634–40. Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/112/3/634>
 25. Walsh TJ, Katragkou A, Chen T, Salvatore CM, Roilides E. Invasive candidiasis in infants and children: Recent advances in epidemiology, diagnosis, and treatment. *Journal of Fungi* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Apr 1];5(1):11. Available from: </pmc/articles/PMC6463055/>
 26. Piarroux R, Grenouillet F, Balvay P, Tran V, Blasco G, Millon L, et al. Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients. *Critical Care Medicine* [Internet]. 2004 Dec [cited 2021 Apr 1];32(12):2443–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15599149/>
 27. Aguado JM, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, et al. Guidelines for the treatment of invasive candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2010 Update. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2011 [cited 2021 Apr 1];29(5):345–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21459489/>
 28. Parkins MD, Sabuda DM, Elsayed S, Laupland KB. Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2007 Sep [cited 2021 Apr 1];60(3):613–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17576697/>
 29. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin, Jr. DK, Calandra TF, Edwards, Jr. JE, et al. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Mar

- 1 [cited 2021 Apr 1];48(5):T1–35. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/48/5/503/384590>
30. Yapar N, Pullukcu H, Avkan-Oguz V, Sayin-Kutlu S, Ertugrul B, Sacar S, et al. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: A multicenter case-control study. *Medical Mycology* [Internet]. 2010 Jan [cited 2021 Apr 1];49(1):26–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20662635/>
 31. Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2021 Apr 1];48(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19193113/>
 32. Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A, et al. *Candida auris*: A review of the literature. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Apr 1];31(1). Available from: <https://cmr.asm.org/content/31/1/e00029-17>
 33. Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2011 Sep [cited 2021 Apr 1];49(9):3139–42. Available from: [/pmc/articles/PMC3165631/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2165631/)
 34. Escandón P, Chow NA, Caceres DH, Gade L, Berkow EL, Armstrong P, et al. Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia Reveals a Highly Related, Countrywide Colonization with Regional Patterns in Amphotericin B Resistance. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Mar 24];68(1):15–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788045/>
 35. Carvajal-Valencia SK, Lizarazo D, Duarte C, Escandon P. Identificación de aislamientos de *Candida auris* recuperados a través de la vigilancia por laboratorio en Colombia: un reto para el diagnóstico. *Infectio* [Internet]. 2020 Jun 10 [cited 2022 Apr 26];24(4):224–8. Available from: <http://revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/880>
 36. U.S. Department of Health & Human Services. Invasive Candidiasis Statistics [Internet]. 2019 [cited 2021 Nov 7]. Available from: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html>
 37. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R, Kerins J, et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus—United States, May 2013–August 2016. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Apr 1];17(1):296–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28029734/>
 38. Chowdhary A, Voss A, Meis JF. Multidrug-resistant *Candida auris*: ‘new kid on the block’ in hospital-associated infections? *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Apr 1];94(3):209–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27634564/>

39. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gygax SE, et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* [Internet]. 2012 Oct [cited 2021 Apr 1];11(10):1289–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22923048/>
40. Berkow E, Lockhart S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance* [Internet]. 2017 Jul 31 [cited 2021 Apr 1];10:237–45. Available from: <https://www.dovepress.com/fluconazole-resistance-in-candida-species-a-current-perspective-peer-reviewed-article-IDR>
41. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2017 Jan 15 [cited 2021 Apr 1];64(2):134–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27988485/>
42. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2013 [cited 2021 Mar 30];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24198814/>
43. Xiao H, Shao F, Wu M, Ren W, Xiong X, Tan B, et al. The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine [Internet]. Vol. 6, *Journal of Animal Science and Biotechnology*. BioMed Central Ltd.; 2015 [cited 2021 Mar 30]. p. 19. Available from: <http://www.jasbsci.com/content/6/1/19>
44. Lledó Giralt E, Albericio Palomera F, Jiménez J. Péptidos y la industria farmacéutica. *Anales de la Real Sociedad Española Química* [Internet]. 2004 [cited 2021 Apr 1];1:10–6. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=818822>
45. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. Mini review: A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research* [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Apr 1];30(7):505–15. Available from: </pmc/articles/PMC1497874/>
46. Domhan C, Uhl P, Meinhardt A, Zimmermann S, Kleist C, Lindner T, et al. A novel tool against multiresistant bacterial pathogens: lipopeptide modification of the natural antimicrobial peptide ranalexin for enhanced antimicrobial activity and improved pharmacokinetics. *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Apr 1];52(1):52–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29649587/>
47. Liu B, Zhang W, Gou S, Huang H, Yao J, Yang Z, et al. Intramolecular cyclization of the antimicrobial peptide Polybia-MPI with triazole stapling: influence on stability and bioactivity. *Journal of Peptide Science* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Apr 1];23(11):824–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28833783/>

48. Steiner H, Hultmark D, Engström Å, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* [Internet]. 1981 Jul 1 [cited 2021 Apr 1];292(5820):246–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/292246a0>
49. Moore AJ, Beazley WD, Bibby MC, Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 1996 Jun 1 [cited 2021 Apr 1];37(6):1077–89. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/37.6.1077>
50. Melino S, Santone C, di Nardo P, Sarkar B. Histatins: Salivaryx peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs Perspectives for biomedical applications [Internet]. Vol. 281, *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2014 [cited 2021 Apr 1]. p. 657–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24219363/>
51. Mansour SC, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Mar 30];21(5):323–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/psc.2708>
52. Wang H, LeBert V, Hung CY, Galles K, Saijo S, Lin X, et al. C-Type Lectin Receptors Differentially Induce Th17 Cells and Vaccine Immunity to the Endemic Mycosis of North America. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2021 Apr 1];192(3):1107–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24391211/>
53. Omardien S, Drijfhout JW, van Veen H, Schachtschabel S, Riool M, Hamoen LW, et al. Synthetic antimicrobial peptides delocalize membrane bound proteins thereby inducing a cell envelope stress response. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Apr 1];1860(11):2416–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29894683/>
54. Sang M, Wei H, Zhang J, Wei Z, Wu X, Chen Y, et al. Expression and characterization of the antimicrobial peptide ABP-dHC-cecropin A in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Mar 30];140:44–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28827052/>
55. Rossi DC, Muñoz JE, Carvalho DD, Belmonte R, Faintuch B, Borelli P, et al. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 31];12:28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22394555/>
56. Muñoz JE, Rossi DCP, Ishida K, Spadari CC, Melhem MSC, Garcia DM, et al. Antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate C7a against *Candida albicans* yeast forms in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2021 Nov 24];8(MAY). Available from: [/pmc/articles/PMC5413578/](https://pmc/articles/PMC5413578/)
57. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its

- application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols* 2008 3:9 [Internet]. 2008 Aug 28 [cited 2021 Oct 25];3(9):1494–500. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.141>
58. Danihelová M, Veverka M, Šturdík E, Jantová S. Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. *Interdisciplinary Toxicology* [Internet]. 2013 [cited 2022 Mar 30];6(4):209. Available from: </pmc/articles/PMC3945760/>
 59. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020 Sep 1;20(9):e216–30.
 60. Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 21];11(7):3919. Available from: </pmc/articles/PMC6684887/>
 61. Li R, Chen C, Zhu S, Wang X, Yang Y, Shi W, et al. CGA-N9, an antimicrobial peptide derived from chromogranin A: direct cell penetration of and endocytosis by *Candida tropicalis*. *Biochemical Journal* [Internet]. 2019 Feb 14 [cited 2022 Mar 21];476(3):483–97. Available from: </biochemj/article/476/3/483/219528/CGA-N9-an-antimicrobial-peptide-derived-from>
 62. de Alteriis E, Maselli V, Falanga A, Galdiero S, di Lella FM, Gesuele R, et al. Efficiency of gold nanoparticles coated with the antimicrobial peptide indolicidin against biofilm formation and development of *Candida* spp. clinical isolates. *Infection and Drug Resistance* [Internet]. 2018 [cited 2022 Mar 21];11:915. Available from: </pmc/articles/PMC6037145/>
 63. Roscetto E, Contursi P, Vollaro A, Fusco S, Notomista E, Catania MR. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. *Scientific Reports* 2018 8:1 [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2022 Mar 21];8(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-35530-0>
 64. Galdiero E, Salvatore MM, Maione A, Carraturo F, Galdiero S, Falanga A, et al. Impact of the Peptide WMR-K on Dual-Species Biofilm *Candida albicans*/*Klebsiella pneumoniae* and on the Untargeted Metabolomic Profile. *Pathogens* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Mar 21];10(2):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33669279/>
 65. Jia F, Wang J, Peng J, Zhao P, Kong Z, Wang K, et al. The in vitro, in vivo antifungal activity and the action mode of Jelleine-I against *Candida* species. *Amino Acids* 2017 50:2 [Internet]. 2017 Nov 3 [cited 2022 Mar 26];50(2):229–39. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-017-2507-1>
 66. Kočendová J, Kočendov K, Kočendová K, Vaňková E, Vaňkov V, Vaňková V, et al. Antifungal activity of analogues of antimicrobial peptides isolated from bee venoms against vulvovaginal *Candida* spp. *FEMS Yeast Research* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2022 Mar

26];19(3):13.

Available

from:

<https://academic.oup.com/femsyr/article/19/3/foz013/5315757>

67. do Nascimento Dias J, de Souza Silva C, de Araújo AR, Souza JMT, de Holanda Veloso Júnior PH, Cabral WF, et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells. *Scientific Reports* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 May 3];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7316759/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31141959/)
68. Bellavita R, Maione A, Merlino F, Siciliano A, Dardano P, Stefano L de, et al. Antifungal and Antibiofilm Activity of Cyclic Temporin L Peptide Analogues against *Albicans* and Non-*Albicans Candida* Species. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 454 [Internet]. 2022 Feb 21 [cited 2022 Mar 26];14(2):454. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/2/454/htm>
69. Colombo AL, Dal Mas C, Rossato L, Shimizu T, Oliveira EB, da Silva Junior PI, et al. Effects of the Natural Peptide Crotamine from a South American Rattlesnake on *Candida auris*, an Emergent Multidrug Antifungal Resistant Human Pathogen. *Biomolecules* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Mar 26];9(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31141959/>
70. Dartevelle P, Ehlinger C, Zaet A, Boehler C, Rabineau M, Westermann B, et al. D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. *Scientific Reports* 2018 8:1 [Internet]. 2018 Jun 18 [cited 2022 Apr 4];8(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27417-x>
71. Ciociola T, Pertinhez TA, de Simone T, Magliani W, Ferrari E, Belletti S, et al. In Vitro and In Vivo Anti- *Candida* Activity and Structural Analysis of Killer Peptide (KP)-Derivatives. *J Fungi (Basel)* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Apr 4];7(2):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33578728/>
72. Ramamourthy G, Park J, Seo C, Vogel HJ, Park Y. Antifungal and Antibiofilm Activities and the Mechanism of Action of Repeating Lysine-Tryptophan Peptides against *Candida albicans*. *Microorganisms* 2020, Vol 8, Page 758 [Internet]. 2020 May 18 [cited 2022 Mar 27];8(5):758. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/5/758/htm>
73. Cheng R, Xu Q, Hu F, Li H, Yang B, Duan Z, et al. Antifungal activity of MAF-1A peptide against *Candida albicans*. *International Microbiology* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Apr 4];24(2):233–42. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10123-021-00159-z>