

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL PÉPTIDO LfcinB (21-25)_{pal}
RWQWRWQWR DERIVADO DE LA LACTOFERRICINA BOVINA EN BIOPELÍCULAS
DE *Candida auris* RESISTENTE A FLUCONAZOL



GIULIANA MARCELA LARA RUBIO

DIRECTORA:

CLAUDIA M. PARRA GIRALDO MSc. Ph.D

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2019

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL PÉPTIDO LfcinB (21-25)_{pal}
RWQWRWQWR DERIVADO DE LA LACTOFERRICINA BOVINA EN BIOPELÍCULAS
DE *Candida auris* RESISTENTE A FLUCONAZOL



GIULIANA MARCELA LARA RUBIO

CLAUDIA M. PARRA GIRALDO MSc. Ph.D
DIRECTORA

JULIÁN ESTEBAN MUÑOZ HENAO Ph.D
EVALUADOR

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946.

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

**Para mi abuelito Fabio Rubio Duque con
mucho amor y cariño, por impulsarme
siempre a alcanzar mis metas y sueños,
siempre te recordaré.
(Q.E.P.D.)**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por bendecirme hoy y siempre y guiar mi camino. A mi familia por apoyarme a lo largo de este proceso, por interesarse en los temas de la ciencia y por impulsarme para llegar al final. A mi mamá y a mi papá por ser un ejemplo a seguir, por su amor y formarme como la persona que soy, son los pilares fundamentales de mi vida y agradezco infinitamente todo el esfuerzo y sacrificio puestos para que haya llegado a este punto de mi carrera. A mis hermanas por ser mi compañía incondicional y a mi abuelita por ser un motor para mi vida.

Agradezco también a mi directora de tesis, la Dra Claudia Parra, por la confianza depositada en mí desde un inicio, por fortalecer en mí el espíritu investigativo y el amor por la ciencia, por apoyarme a lo largo de este proceso, por su paciencia, dedicación y asesoría para culminar este trabajo con éxito.

A mi compañera y amiga Yerly Vargas que a pesar del poco tiempo que llevamos en conocernos, fue un soporte fundamental en el desarrollo de esta tesis en todo momento, le agradezco su disposición y amabilidad, su ayuda incondicional y su entrega a la ciencia y pasión por todo lo que hace, es un ejemplo a seguir para mí.

A mis compañeros de MICOH-P por enseñarme y ayudarme en todo lo que necesité en el laboratorio, por compartir su conocimiento conmigo y colaborar en la gestión de este proyecto. A mis compañeros y amigos de bacteriología por acompañarme a lo largo de este proceso, por su apoyo y por hacer de este semestre y los anteriores la mejor experiencia. A mis profesoras por motivarme a continuar el camino de las ciencias de la salud y darme la formación académica necesaria para llegar a ser una excelente profesional en un futuro.

Al profesor José Iglesias por abrirme las puertas de su laboratorio para utilizar el equipo de fluorescencia, por su amabilidad y colaboración. Al grupo SAMP de la Universidad Nacional por suministrarme el péptido con el cual pude realizar mis ensayos. Al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la salud de COLCIENCIAS, Convocatoria para proyectos de ciencia, tecnología e innovación en salud – 2018, número 807, por la financiación de mi proyecto que hace parte del proyecto macro que se está llevando a cabo: Diseño de una formulación para el tratamiento de la candidiasis invasiva multidrogaresistente, basada en peptidos de LfcinB libres o nanoencapsulados (Código 63646).

Finalmente, agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana, a mi directora de carrera la Dra Melva Linares y al programa de Becas Crédito Julio Ramírez Johns, porque a pesar de las dificultades afrontadas a lo largo de mi carrera me dieron su apoyo para poder estudiar. También, a todas las personas que de alguna u otra forma estuvieron involucradas en el desarrollo de esta tesis y me ayudaron para llegar a su conclusión.

Estoy orgullosa de hacer parte de la comunidad Javeriana y por siempre estará en mi corazón.

RESUMEN

Candida auris es un patógeno fúngico oportunista que se ha diseminado globalmente en los últimos años causando infecciones nosocomiales asociadas a altas tasas de mortalidad especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Se caracteriza por ser multidrogo resistente a antifúngicos como fluconazol, Anfotericina B o caspofungina por medio de mecanismos en donde se destaca la formación de biopelículas. En este trabajo, se evaluó la actividad antifúngica del péptido LfcinB (21-25)_{pal} RWQWRWQWR derivado de la lactoferricina bovina en biopelículas de *Candida auris* resistente a fluconazol. Con el fin de establecer las condiciones óptimas de crecimiento de la levadura, se evaluó la formación de la biopelícula frente a diferentes concentraciones de glucosa (0%, 5%, 15%, 25% y 30%), de inóculo (10^6 , 10^7 y 10^8 células/mL) y tiempo de incubación (24 y 48 horas), en placas de 96 pozos a los cuales se les agregó resazurina para la lectura de la fluorescencia obtenida en el equipo FLUOstar[®] Omega. Una vez establecidos estos parámetros, se procedió a evaluar el péptido de dos formas: (i) agregándolo junto con el inóculo pre incubado por 60 minutos a 37°C, y (ii) agregándolo posterior a la pre incubación del inóculo a las condiciones descritas. Los resultados obtenidos mostraron que a diferentes concentraciones de inóculo y de glucosa no se ve afectada la cantidad de biomasa producida por la biopelícula en *C. auris*. Además, no se observaron diferencias de crecimiento entre las 24 y 48 horas de incubación. La acción del péptido fue similar para las dos condiciones evaluadas, evidenciándose una reducción en la formación de la biopelícula para ambos casos de aproximadamente 75%. Se concluye que el péptido LfcinB (21-25)_{pal} efectivamente previene la formación de la biopelícula de *C. auris* en etapas tempranas de crecimiento, lo cual, lo convierte en un candidato promisorio para el tratamiento de infecciones de *C. auris* asociadas a biopelículas.

Palabras claves: Biopelículas, Lactoferricina Bovina, péptido LfcinB (21-25)_{pal}, resistencia, inóculo, glucosa.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. MARCO TEÓRICO	17
4.1. Marco conceptual	17
4.2 Antecedentes.....	27
5. OBJETIVOS	30
5.1. Objetivo general	30
5.2. Objetivos específicos.....	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1. Obtención e identificación de cepas de <i>C. auris</i>	31
6.2. Establecer la susceptibilidad antifúngica con fluconazol y péptido Lfcinb (21-25) _{pal} derivado de la Lfcinb en cepas de <i>C. auris</i>	31
6.3. Suministro de péptidos derivados de la LfcinB.....	32
6.4. Determinación de la formación de biopelículas de <i>C. auris</i> frente a diferentes condiciones (concentración de nutrientes, concentración del inóculo y tiempo de incubación)	32
6.5. Evaluación del efecto del péptido Lfcinb (21-25) _{pal} derivado de la LfcinB en biopelículas de <i>C. auris</i> resistente a fluconazol	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1. Evaluación de la susceptibilidad antifúngica con fluconazol y péptido Lfcinb (21-25) _{pal} derivado de la LfcinB en cepas de <i>C. auris</i>	38
7.2. Determinación de la formación de biopelículas de <i>C. auris</i> frente a diferentes condiciones (concentración de nutrientes, concentración del inóculo y tiempo de incubación)	40
7.3. Evaluación del efecto del péptido LfcinB (21-25) _{pal} derivado de la LfcinB en biopelículas de <i>C. auris</i> resistente a fluconazol	46
8. CONCLUSIONES	51
9. RECOMENDACIONES	52
10. BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Efecto antifúngico de péptidos sintéticos derivados de LfcinB en diferentes cepas de <i>Candida</i> evaluadas por microdilución en caldo.....	27
Tabla 2. Prueba de susceptibilidad antifúngica con fluconazol en <i>Candida auris</i>	38
Tabla 3. Prueba de susceptibilidad antifúngica con péptido LfcinB (21-25) _{pal} derivado de la LfcinB en <i>Candida auris</i>	39

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución de diferentes concentraciones de glucosa en caldo Sabouraud.	33
Figura 2. Distribución del plato multipozos a diferentes concentraciones de glucosa e inóculo.	34
Figura 3. Distribución del plato multipozos a una concentración de inóculo de 10 ⁶ células/mL en 0% de glucosa y evaluación del péptido.....	37
Figura 4. Primer ensayo de determinación de la formación de biopelícula de <i>C. auris</i>	40
Figura 5. Segundo ensayo de determinación de la formación de biopelícula de <i>C. auris</i>	42
Figura 6. Tercer ensayo de determinación de la formación de biopelícula de <i>C. auris</i>	43
Figura 7. Evaluación del péptido LfcinB (21-25)pal derivado de LfcinB en biopelículas de <i>C. auris</i>	47

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas invasivas (IFIs) son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados y en la población inmunocomprometida. Las más altas tasas de mortalidad registradas se asocian con IFIs tales como aspergilosis, mucormicosis, criptococosis y candidemia. Esta última es causada por especies del género *Candida* que se caracterizan por ser comensales en el ser humano, así como también patógenos oportunistas. Actualmente, la prevalencia e incidencia de infecciones asociadas a esta levadura se ha incrementado, lo que conlleva a un problema en salud pública presente en nuestro país y a nivel mundial [1].

Diferentes especies del género *Candida* han cobrado importancia en los últimos años por encontrarse como agentes etiológicos frente a candidiasis invasivas o candidemia. *Candida auris* es una de estas y se ha destacado por su rápida diseminación en corto tiempo causando infecciones predominantemente nosocomiales en más de una docena de países. En el 2016 el *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) emitió una alerta en donde describe a esta levadura como un hongo emergente que presenta una amenaza para la salud mundial debido a la alta tasa de mortalidad existente (alrededor del 60%) [2].

La identificación de *C. auris* requiere de tecnología especializada y muchos laboratorios de mediana complejidad no cuentan con esta, por lo tanto se confunde con otras especies similares identificándose erróneamente, lo que conlleva a un inadecuado tratamiento del paciente. Además, la alta resistencia a fluconazol e incluso multidrogo resistencia reportada de aislamientos clínicos, limita las opciones de tratamiento. Estas dos características contribuyen al incremento de las tasas de mortalidad asociadas a *C. auris* [3].

Los mecanismos de resistencia frente a los antifúngicos se desarrollan por medio de mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico, sobreexpresión de genes relacionados con formación de barreras de permeabilidad, sistemas de bombas de expulsión y producción de biopelículas. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de infecciones por *C. auris* se encuentra el uso de catéter central, que incrementa hasta un 90% la posibilidad de la levadura de formar biopelículas en estos lugares [4].

El número limitado de antifúngicos para el tratamiento de estas infecciones ha implicado que en la actualidad se identifiquen y desarrollen nuevas alternativas terapéuticas que sobrepongan la problemática. Una fuente importante para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos son los Péptidos Antimicrobianos (PAMs), los cuales, son oligopéptidos con un número variable de aminoácidos que se pueden encontrar tanto en procariotas como en eucariotas, y que desempeñan un papel clave en la respuesta inmune innata para combatir infecciones por bacterias, virus, hongos, etc [5].

La Lactoferricina (Lfcin) es un PAM que se genera por la hidrólisis de la Lactoferrina (LF) con la pepsina gástrica. La Lfcin ha sido descrita en varios mamíferos, como: humano, bovino, caprino, porcino, murino, entre otros. Se ha reportado que la Lactoferricina Bovina (LfcinB) tiene mayor actividad antibacteriana que la Lactoferricina Humana (LfcinH), lo cual ha sido atribuido a la secuencia primaria de la LfcinB, ya que esta, presenta mayor anfipaticidad haciendo que los residuos de Trp puedan interactuar con mayor facilidad con la membrana lipídica [5].

La LfcinB (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) es un péptido de 25 aminoácidos con actividad antimicrobiana, antifúngica y antitumoral. Los péptidos sintéticos derivados de la LfcinB entre los cuales se encuentra el péptido LfcinB (21-25)_{pal} como fármacos presentan ventajas importantes como inocuidad, certeza de la composición de aminoácidos y permiten versatilidad en la forma de administración posibilitando mayor cobertura, por lo cual son promisoros para el tratamiento de infecciones por microorganismos como *C. auris* [5].

El presente trabajo busca evaluar la actividad antifúngica del péptido LfcinB (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB en biopelículas de *Candida auris* resistente a fluconazol.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se estima que más de 300 millones de personas de todas las edades sufren de una infección fúngica grave cada año en todo el mundo. De estas, más de 1,66 millones de personas mueren anualmente, en comparación con las muertes causadas por malaria, SIDA y tuberculosis que son de 600 mil, 1,2 millones y 1,54 millones respectivamente. Adicionalmente, las enfermedades fúngicas se han ido intensificando en las últimas décadas debido al aumento en la incidencia de inmunodeficiencias en el mundo [3].

Estudios demuestran que las altas tasas de mortalidad causadas por infecciones fúngicas oscilan entre el 40 y 60%, en donde se puede encontrar que *Candida spp* se ha convertido en la cuarta causa de infecciones del torrente sanguíneo en hospitalizados. El 3% de esta población sufre sepsis por un hongo y en población en condiciones críticas llega a un 20%. Además, el 4% de los pacientes que mueren en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) se les diagnostica una infección micótica postmortem [6].

Por lo anterior, el género *Candida spp* ha adquirido importancia a nivel mundial y estudios de vigilancia poblacional han estimado que la incidencia anual de infecciones por este hongo es de 8 por 100.000 habitantes. Específicamente en América Latina en un estudio realizado en 7 países se encontró que de 672 episodios de candidemia, 297 (44,2%) ocurrieron en niños (23,7% menores de 1 año), 36,2% en adultos entre 19 y 60 años y 19,6% en ancianos. La incidencia general fue de 1,18 casos por 1.000 ingresos y variaron de un país a otro, siendo la más alta en Colombia y la más baja en Chile [7].

A lo largo del tiempo, se ha observado un cambio importante en la participación de las especies de *Candida spp* como agentes etiológicos en cuadros tanto de candidiasis invasivas (CI) como de candidemias. Este cambio ha impactado en la disminución de episodios por *C. albicans*, donde hasta a mediados de los 90's era el agente etiológico en más del 90% de casos. Hoy en día prevalecen otro tipo de especies entre las cuales se encuentra *Candida auris*, la cual, en los últimos nueve años, se ha reportado cada vez más en el lejano este de Asia, Medio Oriente, África, Europa, América del Sur y América del Norte [8].

En el año 2016, el *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) emitió una alerta en donde describe a esta levadura como un hongo que representa una amenaza para la salud mundial debido

a su identificación errónea, la falta de conocimiento de sus características y la presentación de resistencia a varios antifúngicos [2] Se describe que el 50% de los aislamientos de *C. auris* presentan resistencia frente a Anfotericina B, Fluconazol, Voriconazol e Itraconazol, y hay descripciones de clones resistentes a caspofungina, lo que contribuye a la dificultad a la hora de administrar el mejor tratamiento para el paciente y, por consiguiente, a las altas tasas de mortalidad ocasionadas en mayor proporción por infecciones nosocomiales que genera la levadura [9].

Particularmente, *C. auris* presenta una mortalidad asociada a candidemia de 30 a 70% relacionada con cuadros clínicos prolongados de aproximadamente 10 a 50 días [1] En un estudio realizado en Colombia desde febrero hasta julio de 2016, se informaron 17 aislamientos clínicos de *C. auris* de pacientes en estado crítico y que presentaban factores de riesgo para candidemia tales como: cirugía abdominal, hemodiálisis, diabetes, cáncer, infección por VIH y nutrición parenteral. La tasa de mortalidad a 30 días en los pacientes con candidemia fue de 38.4% [1].

De la misma forma, su inadecuada identificación por medio de métodos bioquímicos comerciales como resultado probablemente de la ausencia de este microorganismo en las bases de datos, aporta un error más en el manejo terapéutico del paciente. En un análisis de muestras de cuatro pacientes con candidemia en Sur África, se realizó la identificación mediante el uso de medio CHROMagar, Vitek-2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y API 20C AUX (bioMérieux), encontrando que todos los aislamientos fueron reconocidos erróneamente como *C. haemulonii* y *R. glutinis* [10].

Además, según lo registrado por SISPRO (*Sistema Integral de Información de la Protección Social*) del Ministerio de Salud en Colombia, entre el 2009 y 2016 se dieron 37.378 atenciones por urgencias asociadas a micosis. En este mismo periodo, se generaron 4.662 hospitalizaciones por micosis, con un cálculo aproximado de recursos invertidos de 33 mil millones de pesos [11].

Por otra parte, la rápida capacidad de dispersión de *C. auris* en ambientes hospitalarios que le permite a su vez una fácil colonización de los pacientes especialmente en estado crítico, se debe principalmente a la virtud que posee de persistir en las superficies de las habitaciones de los hospitales y en los dispositivos médicos por medio de agrupaciones de células asociadas a una matriz extracelular denominada biopelícula. Dicha biopelícula contribuye a la resistencia

antifúngica y al aumento de infecciones invasivas por el género *Candida spp* que representan alrededor de un 15-30% de las infecciones nosocomiales [1].

3. JUSTIFICACIÓN

La biopelícula fúngica continúa siendo un problema médico que complica el tratamiento de las micosis, principalmente porque una vez formada, muestra altos niveles de resistencia contra los antifúngicos más comunes. Estudios han demostrado ciertos mecanismos vinculados a la resistencia frente a antifúngicos asociados a bombas de flujo de salida, así como también una alta expresión de genes modificadores de glucano involucrados en un secuestro del medicamento al interior de la matriz extracelular que recubre la biopelícula [12].

Diversas investigaciones han caracterizado la biopelícula de *C. auris* comparándola también con *C. albicans* o de manera individual [6]. Sin embargo, en estos estudios se recalca la importancia de entender cada vez más la biopelícula de *C. auris* asociada no sólo a su capacidad de resistencia frente a medicamentos, sino también a las propiedades y las condiciones a las cuales se desarrolla con el fin de ampliar el conocimiento frente a estas.

Así mismo, cabe resaltar que la emergencia causada en Colombia por la aparición de esta levadura multidrogo resistente en al menos 5 departamentos con mayor densidad poblacional, hace imperativo la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que incluyan en su espectro de acción aislamientos clínicos con perfiles de resistencia. En efecto, los antifúngicos disponibles para el tratamiento de infecciones son pocos y por lo general presentan con frecuencia efectos secundarios y colaterales, por lo que su margen terapéutico es estrecho, limitando su utilización [13].

Es por ello que nuevas moléculas se han venido estudiando y se ha buscado que tengan características, tales como: que sean estables químicamente, que posean múltiples mecanismos de acción con el fin de generar menos resistencia, efectivas en enfermos con inmunosupresión grave, entre otras [14]. Dichas cualidades se han encontrado en los péptidos antimicrobianos, especialmente en péptidos derivados de la lactoferricina bovina (LfcinB), que se han relacionado con un alto espectro de acción contra múltiples bacterias, virus y hongos [15] lo que los hace sustancias prometedoras para el tratamiento de infecciones por *C.auris*.

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antifúngica del péptido LfcinB (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB en biopelículas de *Candida auris* resistente a fluconazol. Con esto se busca a futuro reducir tanto la mortalidad como la estancia hospitalaria causada por candidiasis invasiva de pacientes en estado crítico con tratamientos para enfermedades de base

como cáncer, VIH, que se encuentran en UCI, o que simplemente hayan superado algún tipo de cirugía [16]. Es así como no sólo se contribuye al tratamiento de infecciones invasivas, sino también al mejoramiento de las condiciones de salud y la calidad de vida de pacientes inmunocomprometidos, individuos que ocupan entre un 3-10% de la población colombiana [17].

4. MARCO TEÓRICO

4.1. MARCO CONCEPTUAL

4.1.1. Características de *Candida auris*

Candida auris es un hongo patógeno emergente que fue aislado por primera vez en Japón en el año 2009 a partir de la secreción del oído de una paciente [18]. Sin embargo, una revisión retrospectiva de aislamientos de *Candida* en Corea del Sur, mostró que la primera cepa de *C. auris* en realidad se remonta a 1996 y se identificó a partir de una infección del torrente sanguíneo en un niño [19]. Posteriormente, este hongo empezó a reportarse en diferentes lugares del mundo, y a lo largo de estos años ha cobrado una gran importancia en salud pública por ser un microorganismo multidrogo resistente, como se ha comentado previamente [17]. En Colombia ha habido casos de infecciones invasivas asociadas a *C. auris*, por lo cual en el año 2017 el *Instituto Nacional de Salud* (INS) emitió una alerta frente a esta levadura la cual sigue vigente hoy en día. En este informe se reportó que este hongo presenta patrones de resistencia a azoles y/o anfotericina b, mostrando además una alta capacidad de diseminación en ambiente intrahospitalario afectando especialmente a pacientes en estado crítico.

C. auris, es una especie de hongo perteneciente a la división Ascomycota que se caracteriza por crecer como levadura. Una levadura, es un microorganismo unicelular eucariota que se reproduce asexualmente por gemación mediante la producción de blastoconidias, que dan origen a otra célula genéticamente idéntica a la célula progenitora. Dentro de las estructuras más importantes en las levaduras se encuentra, la pared celular, que es la fracción más externa de la célula cuya función es actuar como una barrera protectora y permeable para evitar que la célula sufra daños osmóticos, físicos, entre otros; además, le brinda forma y le confiere rigidez. Esta estructura fúngica está formada por polisacáridos como β -glucanos, quitina y en una menor proporción por manoproteínas, siendo los β -glucanos el principal blanco terapéutico para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos [20].

Morfológicamente, *C. auris* se caracteriza por presentar colonias en forma ovoide en agar Sabouraud que pueden disponerse de forma individual o grupal. Poseen una textura viscosa, de color blanco, son lisas, brillantes y presentan un borde entero. No forma pseudohifas ni hifas, es decir que las blastoconidias originadas por el proceso de gemación no permanecen unidas entre sí

ni dispuestas en hilera, y esto se ha podido confirmar por medio de análisis comparativos del genoma con otras levaduras en donde *C. auris* no posee el gen de la candidalislina (ECE1) y la proteína de la pared celular hifal (HWP1), ambas altamente expresadas en *C. albicans* y asociadas a la formación de hifas.

Por otra parte, crecen óptimamente entre 37 y 40°C, en CHROMagar desarrolla colonias color rosado y asimilan N-acetilglucosamina, succinato y gluconato. En un estudio realizado sobre el comportamiento del crecimiento de *C. auris* se observó que ciertos aislados crecen en grupos (es decir, se producen brotes, pero las células hijas no se liberan), lo que da como resultado grandes agregados de organismos que no pueden romperse fácilmente in vitro [21]. También se han observado agregados de células de levadura en los riñones de ratones infectados con *C. auris*, lo que sugiere que la agregación podría ser un modo de evasión inmunitaria y persistencia en los tejidos [22]. Además, este patógeno es tolerante a la sal y las células se agregan en grupos grandes y difíciles de dispersar, lo que puede promover la persistencia en el entorno hospitalario [10].

Adicionalmente, cabe mencionar que *C. auris* es diploide y su árbol filogenético basado en las secuencias ITS (*Internal Transcribed spacer*) guardadas en bases de datos disponibles públicamente, ilustra la posición de *C. auris* dentro del clado de *Clavispora/Candida* encontrándose filogenéticamente cercana a *C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, *C. ruelliae* y *C. lusitaniae*, por lo que en su identificación puede confundirse erróneamente con especies pertenecientes a este complejo [19].

Así mismo, por medio de la *Secuenciación de Genoma Completo*, conocido como WGS (por sus siglas en inglés de *Whole Genome Sequencing*), de aislamientos pertenecientes a cinco países, se identificaron cuatro importantes clados de *C. auris* que se asocian con regiones geográficas, lo que sugiere una emergencia independiente de la levadura en cuatro regiones globales diferentes (Sudamérica, África, este de Asia y sur de Asia). Dichos clados fueron filogenéticamente caracterizados encontrando diferencias genómicas conocidas como *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), en donde una variación en la secuencia del ADN compromete una sola base de la secuencia del genoma [23].

Como se ha venido mencionado, las infecciones fúngicas invasivas son oportunistas y pueden llegar a causar una alta mortalidad en pacientes predominantemente inmunocomprometidos. Se

asocian a levaduras del género *Candida* entre las cuales se encuentra *C. auris* como principales agentes etiológicos causantes de dos entidades distintas de candidiasis invasiva: la candidiasis (en la cual se afecta la piel, las mucosas, etc) y la candidemia (limitada al torrente sanguíneo).

Para llegar a la colonización del hospedero, la levadura tiene varios mecanismos de virulencia que le confieren su alta capacidad infectiva e invasiva. La producción de fosfolipasas y proteinasas ha sido reconocida como relevante para la patogenicidad del hongo en el humano, ayudando en la adherencia e invasión de las células huésped [24]. Las hidrolasas son el mayor grupo de enzimas (42%) encontradas en el genoma de *C. auris*, seguidas de las transferasas (25%) y las oxidorreductasas (19%) [10].

Otro aspecto a recalcar es la capacidad de *C. auris* para colonizar y diseminarse en entornos hospitalarios. Una de sus características más alarmantes es la capacidad de esta levadura de adherirse y persistir en las superficies abióticas, incluidas las superficies secas y húmedas, el material de la cama, los pisos, los lavamanos y las camas, así como la piel humana, las orejas y cavidades nasales. En un estudio realizado en Estados Unidos, la capacidad de *C. auris* para persistir y colonizar las superficies plásticas de los dispositivos médicos se comparó con la de *Candida parapsilosis*, concluyendo que la viabilidad de *C. auris* fue mayor durante periodos largos de tiempo [10].

Todas las características mencionadas anteriormente contribuyen a que el tratamiento de este tipo de afecciones, cuando *C. auris* es el agente etiológico, no sólo se dificulte por su capacidad de virulencia sino también por la alta tasa de resistencia frente a antifúngicos como el fluconazol (FLC), por lo que es importante entender y conocer dichos mecanismos de resistencia que la convierten en una levadura de especial relevancia para su estudio [25] [10].

4.1.2. Mecanismos de resistencia: Biopelículas

Con el fin de combatir las infecciones fúngicas, se desarrollan varios tipos de fármacos antifúngicos como: los azoles, que se encuentran dirigidos a la biosíntesis del ergosterol el cual es un elemento clave en la membrana celular; los polienos, que se unen al ergosterol alterando la permeabilidad en la membrana; y las equinocandinas, que inactivan la 1,3- β -glucano sintasa

implicada en la síntesis de la pared celular. Particularmente el FLC, hace parte de la familia de los azoles y es un antimicótico fungiestático de primera línea clínica que es capaz de unirse a la enzima 14 alfa lanosterol desmetilasa (codificada por el gen ERG11) involucrada directamente en la biosíntesis del ergosterol, inhibiendo por tanto su función y causando la acumulación de esteroides tóxicos para la levadura [26].

Sin embargo, los microorganismos han adquirido mecanismos de resistencia frente a los antifúngicos por medio de mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico, o sobreexpresión de genes relacionados con formación de barreras de permeabilidad y sistemas de bombas de expulsión: ATP-binding cassette (ABC) y facilitadores mayores (MF). Análisis del genoma de *C. auris* han revelado un incremento en la actividad de transportadores asociados al ABC y bombas de eflujo asociadas a MF. De la misma manera el factor de transcripción TAC1 que regula la expresión del gen CDR (*Candida Drug Resistance*) que codifica para el sistema ABC en *C. albicans*, se encuentra presente en dos copias en *C. auris*. Adicionalmente, se ha encontrado evidencia de aumento de número de copias del gen ERG11 en aislamiento de *C. auris*, lo que contribuye también a su resistencia [27].

Frente a este panorama, otra forma de resistencia antifúngica muy importante presente en las levaduras es la formación de biopelículas. Se ha documentado que las biopelículas de *Candida* son resistentes a los antifúngicos de uso común, incluidos los azoles y los polienos. En un estudio se evaluó la susceptibilidad antifúngica de las biopelículas de *Candida* formadas en prótesis acrílicas in vitro, y se demostró que las biopelículas de *C. albicans* mostraron resistencia a la anfotericina B, nistatina, clorhexidina y fluconazol. En contraste, el crecimiento de células planctónicas fue susceptible a este agente. También, otro estudio en donde se evaluaron las biopelículas de *C. albicans* frente a fluconazol en discos de plástico, comprobó la resistencia de las levaduras frente a este derivado de azol por medio del ensayo de reducción de XTT [28] [29].

Las biopelículas de *Candida* representan una entidad clínica fundamental asociada no sólo a la resistencia adaptativa frente a los diferentes tipos de antifúngicos, sino también al exceso de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. A pesar de que *C. albicans* se ha descrito como la principal levadura implicada en procesos de formación de biopelículas, *C. auris* ha cobrado importancia en dicho aspecto también y es por esta razón que últimamente se han

realizado estudios sobre sus características, como por ejemplo en un trabajo realizado en el 2017 en el cual se evaluaron los fenotipos agregativos y no agregativos de *C. auris* asociados a su capacidad de formación de biopelículas [30].

Existen mecanismos a través de los cuales la capacidad de formar biopelículas le confiere a la levadura alta resistencia ante los antifúngicos. Entre estos predominan mecanismos asociados a la matriz extracelular (MEC), las bombas de flujo de salida y la sobreexpresión de los objetivos farmacológicos.

Antes de entrar a discutir la resistencia vinculada a la biopelícula, se hace necesario entender qué es, sus características, su composición, entre otros aspectos. Las biopelículas se definen como “agregados de microorganismos en donde las células se asocian con una matriz de producción propia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se adhieren entre si y/o con una superficie” [31] [32]. A través de interacciones intercelulares, tanto sociales (haciendo referencia a la comunicación entre las células) como físicas, junto con las propiedades de la matriz, el estilo de vida de la biopelícula es claramente distinto al de las células de vida libre [32].

La matriz es una interface entre la biopelícula y el entorno que define los procesos que ocurren dentro de la biopelícula y las interacciones con el mundo externo. Su proceso de formación es un proceso dinámico y depende de diferentes factores que influyen en su arquitectura. Entre estos factores se encuentra el flujo de líquidos el cual puede influir en el intercambio de nutrientes y la integridad estructural de las biopelículas, también el papel del sustrato correspondiente al tipo de material en donde crece la biopelícula, los nutrientes en los medios de crecimiento incluidos los azúcares, los lípidos y el suero como determinantes cruciales, y la presencia de especies adicionales de *Candida* o de diferentes cohabitantes bacterianos [33].

Dicha matriz le confiere a la biopelícula una organización espacial en la cual se generan interacciones complejas, dinámicas y sinérgicas, incluida la comunicación de célula a célula. También, le proporciona hidratación, nutrición por medio de captura de recursos, una mejor capacidad metabólica de las células y resistencia a antifúngicos. El componente principal de la matriz es el agua (97%) que contiene los elementos estructurales y funcionales como polisacáridos, proteínas, y DNA. Todos ellos le confieren a la biopelícula una tolerancia a la desecación cuando se genera estrés hídrico [32].

Poros y canales asociados a la matriz facilitan el transporte de líquidos, intercambio de nutrientes, de gases y otras moléculas con el medio ambiente fundamentales para el mantenimiento de la biopelícula. En efecto, este sistema de intercambio también se produce por medio de sitios de unión específicos en el citoplasma y la pared de las células que hacen parte de la biopelícula, en donde se incluyen intercambiadores tanto aniónicos como catiónicos capaces de absorber diferentes compuestos incluso en ambientes oligotróficos, es decir, con baja concentración de nutrientes [32].

El inicio de formación de la biopelícula se asocia a una primera fase de adherencia en la cual se coloniza una superficie mediada tanto por factores inespecíficos (hidrofobicidad de la superficie celular y fuerzas electrostáticas), como por adhesinas específicas en la superficie fúngica que reconocen ligandos en los lugares donde se formará la biopelícula. Con relación a lo anterior, en un estudio transcriptómico se identificaron proteínas claves en este paso de adherencia de secuencia similar a la aglutinina (*ALS*) entre las que se encuentra *ALS1* y *ALS5* en el transcriptoma de *C. auris* y con función reguladora en las biopelículas de la misma [32] [34].

En un segundo paso y luego de la unión de las células individuales a un sustrato, se genera la división celular seguida de la proliferación. El mecanismo de “*quorum sensing*” que es un fenómeno mediante el cual las células pueden comunicarse entre sí por medio de la secreción de moléculas señalizadoras, le permite alcanzar una densidad poblacional específica mediante la adaptación y sobrevivencia en el entorno. De esta manera, la biopelícula va madurando y creciendo en conjunto con la acumulación de nutrientes y otros componentes que llevarán a la producción de EPS. Finalmente, la complejidad de la biopelícula aumenta a medida que los microorganismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las levaduras interactúan con moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio circundante [35].

Ahora bien, la resistencia asociada a biopelículas es un fenómeno complejo y multifacético que ha sido descrito en una serie de patógenos fúngicos. En *C. auris*, existen varios mecanismos de resistencia predominantemente asociados con la matriz extracelular (MEC), sobreexpresión de dianas antifúngicas, y bombas de eflujo [36].

En un estudio transcriptómico sobre el perfil de resistencia mediado por biopelículas en *C. auris*, se encontró que las bombas de eflujo estaban reguladas positivamente en fases intermedias y

maduras de desarrollo de la biopelícula, lo cual contrasta con el análisis de biopelículas de *C. glabrata* expuestas al tratamiento con azoles, donde se observó una regulación positiva de los genes que codifican los transportadores ABC como MF. De hecho, para confirmar la función de estas proteínas de membrana dentro de las biopelículas, se evaluó la actividad de la bomba de flujo de salida en biopelículas de 12 y 24 h, las cuales mostraron un mayor flujo de salida en comparación con las células planctónicas [36].

Otro estudio reciente analizó el perfil transcripcional de células planctónicas en *C. auris* en respuesta a azoles y polienos. Tras la exposición de una cepa resistente de *C. auris* a la anfotericina B (polieno), se demostró que casi 40 genes se expresan diferencialmente entre los cuales se incluyen genes implicados en el transporte de hierro que se han descrito anteriormente en *C. albicans* como principales involucrados en la resistencia a la anfotericina B (39). Tres de estos genes (SIT1, PGA7 y RBT5) se demostró que se superponen en las biopelículas de *C. auris*, lo que indica que estos pueden jugar un papel importante en cuanto a resistencia [36].

Adicionalmente, otro mecanismo de resistencia evaluado en dicho estudio fue la formación de la matriz extracelular que funciona proporcionando estabilidad en la célula y secuestro de antifúngicos por la biopelícula, así como protección frente a factores ambientales tensionantes para el microorganismo. La formación del MEC se ve regulado por la mayor expresión de *KRE6* y *EXG*, glucan-1,3-beta-glucosidasa y un ortólogo cercano de *XOG1* en *C. albicans*, involucrados en la formación de la matriz [36].

Este mecanismo y los anteriores mencionados contribuyen al entendimiento de la capacidad de resistencia que tienen las biopelículas de *C. auris* frente a antifúngicos, sin embargo, faltan estudios que expongan la importancia de esta característica y su posibilidad de tratamiento en cepas resistentes. Lo anterior por tanto hace imperativo la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean no sólo eficaces en células planctónicas, sino también que tengan un efecto en las biopelículas de *C. auris* [36].

4.1.3. Tratamiento: Péptidos antimicrobianos (Lactoferricina B)

Los fármacos antifúngicos son limitados en comparación con los antibacterianos pues las estructuras celulares entre hongos y seres humanos son muy conservadas. Por lo tanto, la dificultad de tratamiento de infecciones fúngicas invasivas es consecuencia de tres razones fundamentales:

La primera arraigada al hecho de que existe un número limitado de medicamentos como por ejemplo en Colombia, donde sólo dos grupos de antifúngicos se encuentran en uso frente a candidemias: Polienos (anfotericina B) y Azoles (fluconazol); la segunda relacionada con la resistencia que presentan los microorganismos frente a los pocos antifúngicos que hay; y la tercera ligada a la toxicidad que poseen. Es por ello que la búsqueda de nuevas moléculas que compensen este vacío es muy importante, y una alternativa terapéutica que se ha venido estudiando en los últimos años son los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) en donde podemos encontrar a la LfcinB, un péptido derivado de la proteína Lactoferrina Bovina (LFB) [37].

Los PAMs son oligopéptidos que consisten en menos de 50 aminoácidos, son anfipáticos y llevan una carga neta positiva. Se han aislado de muchos organismos diferentes durante las últimas décadas desde bacterias hasta plantas, vertebrados e invertebrados. Históricamente, los PAMs también se han denominado péptidos de defensa del huésped catiónico, péptidos/proteínas antimicrobianos aniónicos, y demás. El descubrimiento de los PAMs se remonta a 1939, cuando Dubos extrajo un agente antimicrobiano de una cepa de *Bacillus* del suelo. Se demostró que este extracto protege a los ratones de la infección por neumococos. En el año siguiente, Hotchkiss y Dubos fraccionaron este extracto e identificaron un PAM que se denominó gramicidina. A pesar de la toxicidad reportada asociada con la aplicación intraperitoneal, la gramicidina se encontró efectiva para el tratamiento tópico de heridas y úlceras [38].

En total, se han descubierto o sintetizado más de 5,000 PAMs hasta la fecha, y su función radica en tener actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos asociándose directamente con la respuesta inmune innata. Amplios estudios sobre los PAMs han sugerido que ejercen su acción sobre la membrana citoplasmática de microorganismos susceptibles. Los PAMs pueden formar poros, desestabilizar la membrana, y también actuar inhibiendo la biosíntesis macromolar, así como por interacción con componentes vitales específicos dentro del microorganismo [38] [39].

El péptido LfcinB se deriva de la LFB, una glicoproteína de 703 aminoácidos con un peso de 80 kDa que hace parte de la familia de las transferrinas (proteínas que se unen al hierro), y se encuentra en las superficies de la mucosa, dentro de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares, y en los fluidos biológicos, incluida la leche, la saliva y el fluido seminal, lo que indica que puede

desempeñar un papel protector en la respuesta inmune innata. La LFB ha presentado actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitaria, anticancerígena y en la actualidad hace parte de diferentes medicamentos [40].

La LFB, contiene dos dominios antimicrobianos, la LfcinB y la lactoferrampin (LFampin). LfcinB consiste en los residuos 17–41 (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) (la secuencia subrayada corresponde al motivo mínimo con actividad antimicrobiana) de un fragmento de la región N-terminal de la LFB y posee una estructura de β-hoja plegada estabilizada por un puente disulfuro [41], [42], [43]. Se origina por medio de un proceso de hidrólisis como consecuencia de la acción de la pepsina gástrica, tiene una carga neta de +8 y presenta características anfipáticas, por lo que puede interactuar con la membrana plasmática de los microorganismos induciendo desestabilización, disrupción y permeabilidad [20], También, se ha evidenciado que la LfcinB se internaliza en la célula, sugiriendo otro mecanismo de acción [44], [45].

Al igual que la LFB, la LfcinB ha presentado actividad antimicrobiana contra bacterias, virus, parásitos y hongos. En un estudio se investigó la asociación entre la LFB y azoles (fluconazol e itraconazol), y los efectos terapéuticos de esta combinación, encontrando que el péptido presenta un sinergismo con los antifúngicos en la inhibición del crecimiento y la formación de hifas de cepas de *C. albicans* [41]. En otro estudio, La LFB y la LfcinB presentaron actividad inhibitoria contra cepas de *Trichophyto meniagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, los resultados indican que la actividad de estas dos moléculas depende de la cepa evaluada y del medio de cultivo utilizado [46].

Se ha encontrado también que el péptido Lf (1-11) que comprende los 11 primeros residuos de aminoácidos de la región N –terminal de la LF, exhibe actividad antifúngica contra *C. albicans* y *A. fumigatus* en donde su mecanismo de acción está relacionado con interacciones con la membrana fúngica, su naturaleza catiónica y la presencia de residuos hidrofóbicos como la valina y el tritófano [47]. En otro estudio realizado con este mismo péptido en diferentes especies de *Candida* entre las cuales se incluye a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*; al combinarlo de manera sinérgica con fluconazol, se demostró una actividad candidicida inicial seguida por un efecto fungistático durante una etapa posterior [43].

Aunque se ha sugerido que el mecanismo de acción de la LFB está mediado por la quelación del hierro, haciendo el medio deficiente de este metal y afectando la viabilidad del patógeno, también se ha descrito que la LFB interactúa directamente con las células fúngicas. Estudios de microscopia electrónica de barrido evidencian significativos daños en la pared celular inducidos por la LFB en especies patógenas de *Candida*, sugiriendo que la proteína es capaz de desestabilizar el exterior de la membrana celular alterando su permeabilidad y causando muerte celular [41].

Ahora bien, el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), adscrito al departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia ha venido diseñando y sintetizando péptidos derivados de la LfcinB con el fin de identificar secuencias más cortas con mayor actividad que la LfcinB y que la LFB. Se han identificado algunas secuencias promisorias como RWQWRWQWR, los péptidos diméricos y tetraméricos que contienen el motivo RRWQWR, entre otros [48], [49], [50] Los péptidos sintéticos presentan ventajas como: inocuidad, certeza de la composición de aminoácidos, permiten versatilidad en la forma de administración posibilitando mayor cobertura, presenta alto rendimiento, se obtienen moléculas de alta pureza y es económicamente viable [51].

Dichos péptidos han sido ensayados en bacterias y se han obtenido resultados favorables, por lo que sus características son óptimas para ser evaluados también en hongos. En el 2014, el grupo SAMP publicó un artículo en el cual péptidos derivados de LfcinB se diseñaron, sintetizaron, purificaron y caracterizaron, para posteriormente evaluar su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [52].

Los resultados obtenidos mostraron que los péptidos I.2 (RWQWRWQWR) y I.4 ((RRWQWR)₄K₂Ahx₂C₂) exhiben una actividad mayor o similar contra *E. coli* y *E. faecalis* cuando se compararon con la proteína LFB y algunos de sus péptidos derivados. Lo que demuestra que es posible diseñar y obtener péptidos sintéticos con actividad antibacteriana utilizando una metodología rápida y de bajo costo, obteniendo productos con alto grado de pureza [52].

Por otra parte, el grupo SAMP junto al grupo de investigación de Micosis Humanas y Proteómica (MICOH – P) de la facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana de Bogotá, ha realizado ensayos de screening (cribado) para evaluar el efecto antifúngico utilizando curvas de letalidad de

los péptidos estudiados con anterioridad en diferentes cepas de *Candida* entre las cuales se incluye a *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. auris*. Se puede evidenciar el efecto fungistático como fungicida en las diferentes cepas en donde se obtuvo para *C. auris*, la mayor actividad con el péptido palindrómico LfcinB (20-25)_{pal}.

Tabla 1. Efecto antifúngico de péptidos sintéticos derivados de LfcinB en diferentes cepas de *Candida* evaluadas por microdilución en caldo.

Código del péptido	Efecto antifúngico (Curva de letalidad)			
	Fungistático/Fungicida - µg/uL			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. auris</i>
LfcinB (20-25)	0.333 / 0.666	- / 0.666	- / 0.333	>0.666 / >0.666
LfcinB (20-25) ₂	- / 0.165	0.165 / 0.333	- / 0.165	0.666 / >0.666
LfcinB (20-25) ₄	0.333 / 0.666	- / 0.666	- / 0.333	0.666 / >0.666
LfcinB (20-25) _{pal}	0.165 / 0.333	0.165 / 0.333	0.165 / 0.333	0.165 / >0.666
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31)	- / 0.333	- / 0.666	0.165 / 0.333	>0.666 / >0.666

Todos los resultados anteriores son de vital importancia para abrir la posibilidad de estudiar el efecto de estos péptidos en biopelículas de *C. auris*, por lo que es necesario conocer aquellos antecedentes relacionados directamente con esta condición.

4.2 ANTECEDENTES

En relación con las biopelículas de *Candida*, diversos estudios han evaluado la capacidad antifúngica de péptidos derivados de la LFcinB y la LFB en estas.

En el 2017, un grupo de investigación realizó un estudio cuyo objetivo se centraba en el análisis de la actividad inhibitoria del péptido derivado de la lactoferrina N-terminal (hLF 1-11), contra las biopelículas producidas por aislamientos clínicos de *C. parapsilosis*. La actividad anti-biopelícula fue determinada en términos de reducción de la biomasa, actividad metabólica y la observación de la morfología de células sésiles en placas de microtitulación de poliestireno. Además, la fluctuación transcriptómica de genes relacionados con la adhesión celular, producción de matriz y desarrollo de hifas tras la exposición al péptido, fue evaluada por RT-PCR (PCR en tiempo real) [53].

Los resultados evidenciaron que la hLF 1 – 11 exhibe un efecto inhibitorio frente a la formación de biopelículas de todos los aislamientos de *C. parapsilopsis* analizados, induciendo una reducción en la densidad de la biopelícula pre formada, en la actividad metabólica y viabilidad de las células sésiles. Adicionalmente, la RT-PCR confirmó que el péptido regula negativamente genes claves asociados con la formación de biopelículas. Se concluye entonces que el hLF 1 – 11 puede ser un candidato prometedor para la prevención de biopelículas en *C. parapsilopsis* y el tratamiento de biopelículas maduras en catéter [53].

En otro estudio publicado en la revista científica PLOS ONE, se investigaron los efectos de un péptido denominado en inglés como “*synthetic killer peptide (KP)*” en las etapas de desarrollo de biopelículas de *C. albicans* resistentes y sensibles a fluconazol. Se evaluó la permeabilidad de la membrana y la respuesta al estrés oxidativo, así como el perfil transcripcional de genes involucrados con la formación de la biopelícula (adhesión celular, desarrollo de hifas y matriz, etc.) [54].

Se evidenció que el tratamiento con KP genera un incremento de la respuesta oxidativa y de la permeabilidad de la membrana. Además, la expresión de los genes mencionados con anterioridad fue reducida significativamente, y se observaron efectos inhibitorios en las cepas empleadas independientemente de su resistencia o susceptibilidad a fluconazol. Lo que sugiere la utilidad de la molécula para el tratamiento y prevención de infecciones relacionadas con biopelículas de *C. albicans* [54].

La levadura *C. albicans* igualmente fue protagonista en un trabajo de investigación realizado en Brasil, en el cual se evaluó la actividad de la histatina 5 (péptido antimicrobiano abundante en la saliva) y la lactoferrina humana (LfcinH) contra la formación de biopelículas de un aislamiento clínico de *C. albicans* resistente a fluconazol. Se determinó la morfogénesis mediante conteo diferencial, se realizó la cuantificación de biopelículas mediante un ensayo de reducción de cloruro de tetrazolio (XTT) y las características topográficas así como el espesor de la biopelícula, se analizaron mediante microscopia de escaneo láser confocal [55].

La histatina 5 inhibió la transición de levadura a hifa en una manera dosis dependiente, mientras que el efecto de la LfcinH en este mismo proceso fue inversamente proporcional a su concentración. Ambos compuestos fueron capaces de inhibir la actividad metabólica de la

biopelícula demostrando una capacidad citotóxica in vitro contra la biopelícula. Estos resultados apuntan a una posible aplicación de estos compuestos en el tratamiento de infecciones resistentes asociadas a biopelículas [55].

Además de la LFB y derivados de esta, otros PAMs se han estudiado como el Psd1 que es una defensina aislada de las semillas de la planta *Pisum sativum*. En esta investigación se evaluaron los efectos de dicho péptido en biopelículas de *C. albicans* y células planctónicas, comparando su actividad con la anfotericina B y el fluconazol. Se estudiaron tres variantes de *C. albicans*, una de ellas mutante deficiente en la glucosilceramida sintasa, que confiere resistencia a la acción antifúngica Psd1 [56].

La microscopía de fuerza atómica (AFM) se utilizó para evaluar los cambios morfológicos y biomecánicos en las células fúngicas encontrando alteraciones superficiales, con rotura de membrana y filtración de contenidos celulares. Los análisis de citometría y las imágenes de microscopía confocal mostraron que la *Psd1* causa la muerte celular, de manera dependiente del tiempo y la concentración. Estos resultados demuestran la acción pleiotrópica de Psd1 contra un patógeno fúngico humano relevante, lo que sugiere su uso como agente antimicótico natural [56].

Todos los antecedentes previos involucran la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas en diferentes levaduras del género de *Candida*, sin embargo, se desconoce la capacidad antifúngica de péptidos derivados de la LfcinB en biopelículas de *C. auris* resistente a fluconazol, por lo que se hace importante su estudio teniendo en cuenta la problemática presentada.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica del péptido Lfcinb (21-25)_{pal} RWQWRWQWR derivado de la LfcinB en biopelículas de *Candida auris* resistente a fluconazol.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la susceptibilidad antifúngica con fluconazol y péptido Lfcinb (21-25)_{pal} RWQWRWQWR derivado de la LfcinB en cepas de *Candida auris*.
2. Determinar la formación de biopelículas de *Candida auris* frente a diferentes condiciones (concentración de nutrientes, concentración del inóculo y tiempo de incubación).
3. Evaluar la actividad antifúngica del péptido Lfcinb (21-25)_{pal} RWQWRWQWR derivado de la LfcinB en etapas tempranas de la formación de biopelículas de *Candida auris* resistente a fluconazol.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención e identificación de cepas de *C. auris*

Se utilizaron las cepas de *C. auris* 445-PUJ-HUSI (sensible a fluconazol) y *C. auris* 537-PUJ-HUSI (resistente a fluconazol). Ambas cepas se obtuvieron del banco de microorganismos que se encuentra ubicado en el Laboratorio de Micosis Humanas y Proteómica del grupo de investigación de enfermedades infecciosas MICOH – P de la facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá.

Para la activación de las levaduras, las cepas se sembraron por medio de la técnica de aislamiento en medio sólido de agar Sabouraud y se llevaron a incubar a 37°C por 24 horas para su óptimo crecimiento. Luego, a partir de colonias aisladas obtenidas del cultivo, se realizó la correspondiente identificación de las mismas utilizando la espectrofotometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI - TOF MS) como se ha descrito anteriormente [57], con el fin de confirmar su identidad.

Para almacenar las cepas en el banco, se sembraron crioviales en tubos eppendorf a los cuales se les agregó 500 µL de glicerol al 80%, 500 µL de medio líquido Sabouraud y una cantidad considerable de colonia mezclados correctamente, y se llevaron al congelador a -80°C. Adicionalmente, a partir del cultivo en agar Sabouraud, se realizó un repique en agar Sabouraud semi inclinado (pico de flauta) y se llevó a la nevera a -4°C. Este último cultivo corresponde al set de trabajo a partir del cual todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo, asegurando que se realizan desde el segundo repique partiendo del banco.

6.2. Establecer la susceptibilidad antifúngica con fluconazol y péptido Lfcinb (21-25)_{pal} derivado de la Lfcinb en cepas de *C. auris*

Se llevó a cabo el ensayo de pruebas de susceptibilidad antifúngica con fluconazol utilizando el método de microdilución del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), siguiendo las guías M27-A3 y M27-S4 para determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC). La concentración final del antifúngico osciló entre 0,125 a 256 µg/ml de fluconazol (Sigma). Se realizaron diluciones seriadas de los tratamientos con medio RPMI 1640 en una placa de 96 pozos agregando 100 µL. Posteriormente se agregaron 100 µL del inóculo ajustado a una concentración final de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL, se incubaron a 35°C y se realizó lectura visual y

espectrofotométrica a las 48 horas. El control de calidad se aseguró probando las cepas recomendadas por CLSI que son *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 [58] [59]. Este mismo procedimiento se realizó también con el péptido Lfcinb (21-25)_{pal} con el fin de hallar la concentración a la cual la levadura es susceptible, y por consiguiente una aproximación a la concentración probable a la cual la biopelícula es sensible.

6.3. Suministro de péptidos derivados de la LfcinB

Los péptidos derivados de la LfcinB fueron sintetizados por el grupo SAMP por medio de la síntesis en fase sólida estrategia Fmoc/tBu, y fueron purificados por extracción en fase sólida (SPE) así como caracterizados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF.

El péptido dímero lineal palindrómico Lfcinb (21-25)_{pal} RWQWRWQWR, fue seleccionado para ser evaluado teniendo en cuenta su capacidad fungistática en *C. auris* en resultados previos del grupo SAMP.

6.4. Determinación de la formación de biopelículas de *C. auris* frente a diferentes condiciones (concentración de nutrientes, concentración del inóculo y tiempo de incubación)

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de crecimiento de la biopelícula de *C. auris*, se llevó a cabo la aproximación descrita por Herek, TC y colaboradores (2019) con algunas modificaciones que se describirán posteriormente.

Para empezar, se preparó medio agar dextrosa Sabouraud y a partir de las cepas conservadas en la nevera (cepa 445 y cepa 537), se realizó un repique de cada una y se llevó a incubar a 37°C por 48 horas. Pasado este tiempo, a partir del crecimiento de colonias en el medio, se hizo un subcultivo en caldo Sabouraud. El caldo preparado (se tiene en cuenta como 0% de glucosa), fue dividido en 5 schotts a un volumen de 200 ml cada uno y se les agregó adicionalmente una concentración de glucosa específica.

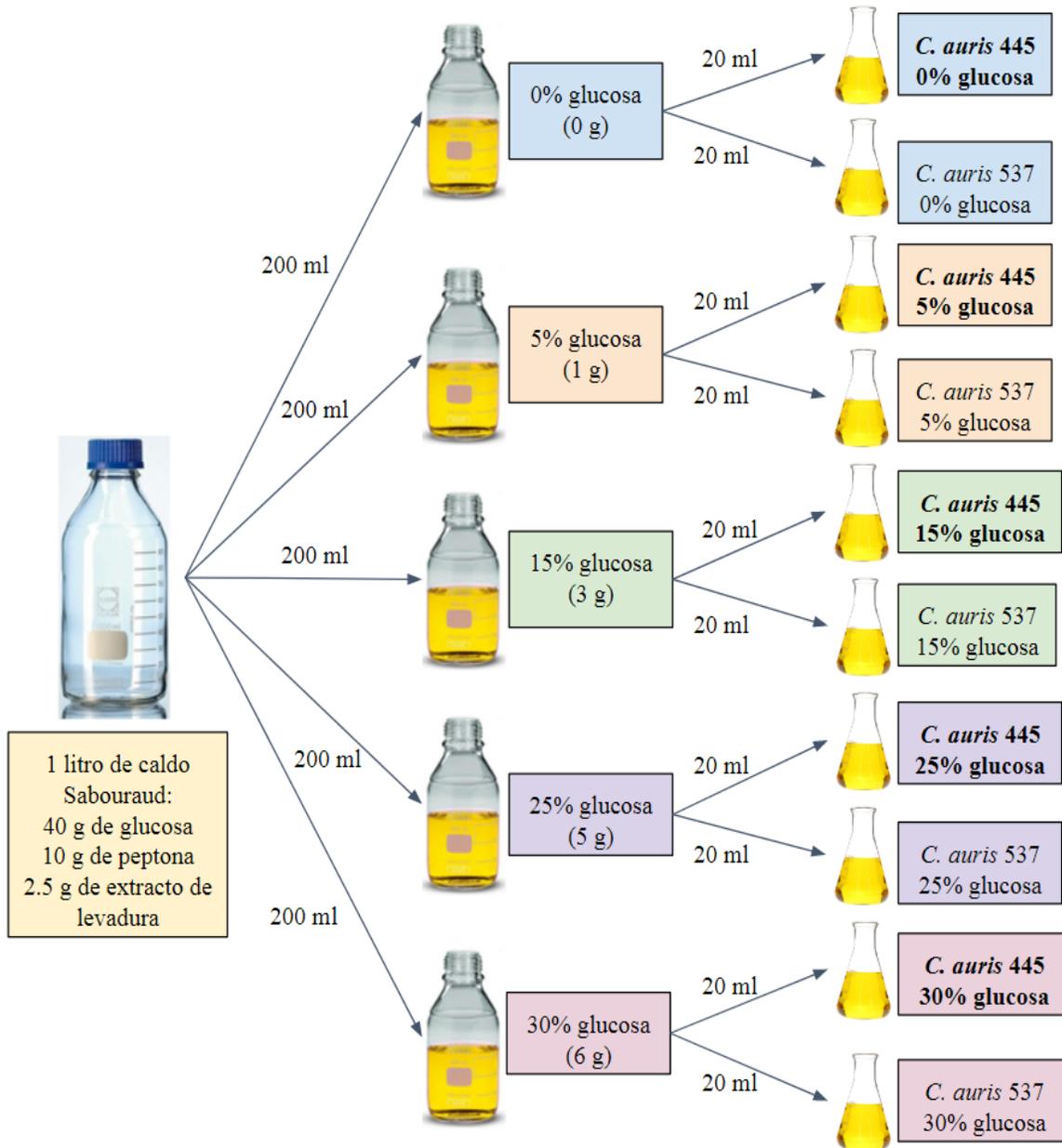


Figura 1. Distribución de diferentes concentraciones de glucosa en caldo Sabouraud.

Se tomaron aproximadamente 20 mL del schott con caldo y se agregaron a dos fiolas: una marcada con *C. auris* 445 y la otra con *C. auris* 537. En cada fiola se disolvió la colonia crecida en el agar según la cepa correspondiente. Este mismo procedimiento se realizó para las demás fiolas marcadas con diferentes concentraciones de glucosa. Luego de hacer el subcultivo, se dejaron las fiolas en agitación constante a 120 rpm por 18 horas y a 37°C. Este procedimiento se puede evidenciar en la Figura 1.

Al siguiente día, se realizó el ajuste del inóculo de cada una de las fiolas a 1×10^8 células/mL utilizando un espectrofotómetro (600nm). El blanco fue el caldo correspondiente a la concentración de glucosa para cada caso, y se buscó obtener un valor de absorbancia (Abs) entre 0,23 y 0,25. Una vez se establecieron los inóculos de cada cepa frente a cada concentración de glucosa, se procedió a realizar diluciones seriadas en base 10 con el fin de obtener inóculos de 1×10^7 y 1×10^6 células/mL.

A continuación, a partir de las suspensiones obtenidas, se transfirieron 200 μ L de cada uno a una placa de 96 pozos. La placa fue incubada a 37°C por 24 horas en cámara húmeda. La distribución en la placa se muestra en la Figura 2.

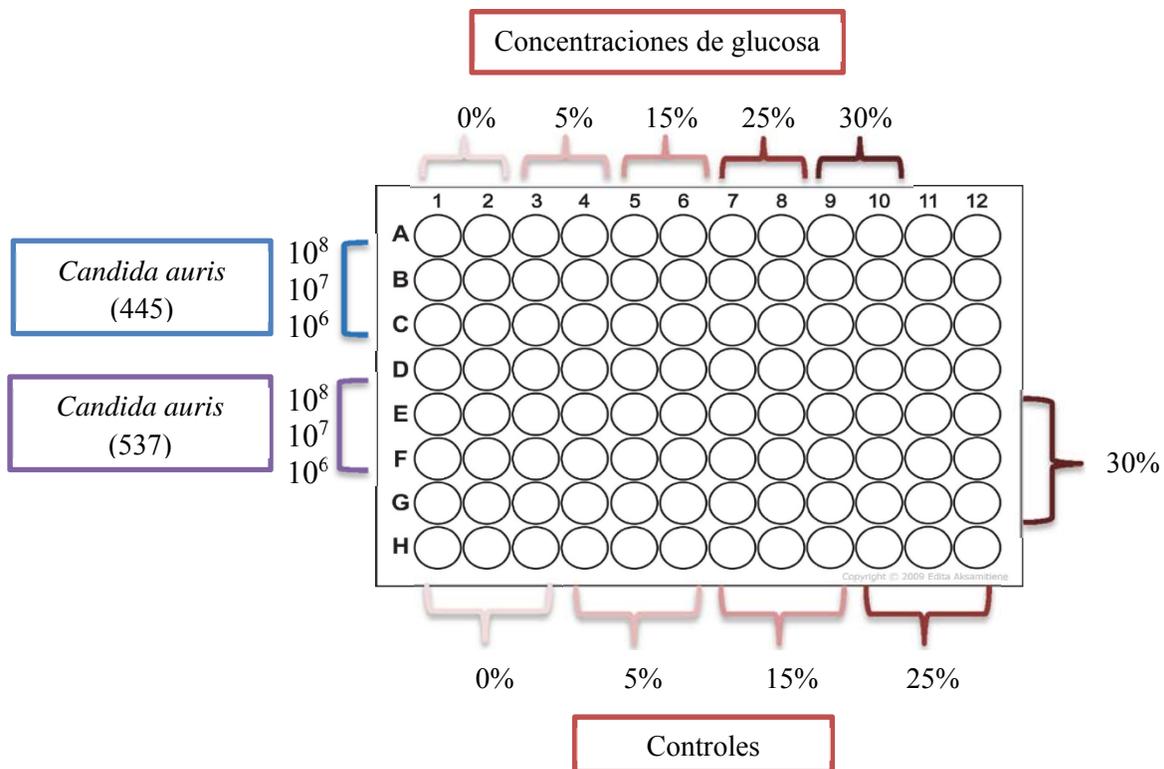


Figura 2. Distribución del plato multipozos a diferentes concentraciones de glucosa e inóculo. Se observan las diferentes concentraciones de inóculo de las dos cepas de *C. auris* evaluadas a distintas concentraciones de glucosa. Los controles ubicados en la parte inferior de la placa corresponden al medio fresco de glucosa sin inóculo.

Luego de pasado el tiempo de incubación, se procedió a remover 100 μ L de cada uno de los pozos para después agregar este mismo volumen de caldo Sabouraud fresco según el porcentaje de glucosa correspondiente para cada caso. La placa se incubó nuevamente por 48 horas a 37°C bajo

las mismas condiciones. Cumplido el tiempo estipulado, las células no adherentes fueron removidas tomando 200 μ L de cada pozo y agregando 200 μ L de solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X) estéril para lavar. Se agitó suavemente la placa y se retiró la solución salina para luego agregar nuevamente el mismo volumen de caldo Sabouraud fresco.

Enseguida, se le agregó a cada pozo 10 μ L de resazurina (*SIGMA – ALDRICH* 700 μ M) y se llevó a incubar a 37°C por 2 horas y media, cuidando de mantener la placa en oscuridad. Este ensayo se fundamenta en la reducción de resazurina por las células metabólicamente activas para producir un resultado color rosado altamente fluorescente que podrá ser evaluado por medio de un equipo de lector de placas de fluorescencia. Aquellas células metabólicamente no activas conservan el color azul característico de la resazurina.

Finalmente, y pasado el tiempo de incubación, la placa se leyó en el equipo de fluorescencia FLUOstar® Omega – BMG Labtech a 560 nm, los resultados se cuantificaron en *Relative Fluorescence Units* (RFU) [60]. Se registraron los datos obtenidos en Excel para su posterior análisis.

De acuerdo al ensayo descrito anteriormente, se realizaron otros más con el propósito de evaluar diferentes condiciones. Se duplicó el ensayo anterior siguiendo el mismo procedimiento descrito, sin embargo para esta ocasión se procedió a lavar la placa no a las 48 horas de incubación sino a las 24 horas. Las condiciones del resto del proceso no cambiaron. Se realizó un tercer último montaje con el fin de comparar los datos obtenidos con los dos primeros y correlacionarlos.

6.5. Evaluación del efecto del péptido LfcinB (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB en biopelículas de *C. auris* resistente a fluconazol

Para valorar el efecto del péptido Lfcinb (21-25)_{pal} en biopelículas de *C. auris*, se tuvo en cuenta la metodología descrita por Roscetto, E y colaboradores (2018), con modificaciones. Inicialmente, se realizó un subcultivo en caldo Sabouraud sólo a 0% de glucosa para ambas cepas, dejando incubar a 37°C y a una velocidad de 120 rpm por 18 horas. A partir del crecimiento de la levadura en el cultivo, se estableció el inóculo como se realizó previamente, pero para esta ocasión partiendo de una concentración de 10⁶ células/mL. Para ello, se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm de la misma manera que el procedimiento anterior, pero en un rango de absorbancia de

0,08 a 0,12 con el fin de obtener la concentración requerida. Teniendo la concentración requerida de la cepa para evaluar, se procedió a preparar el péptido.

El péptido Lfcinb (21-25)_{pal} suministrado por el grupo SAMP, se encontraba en refrigeración en la nevera a -4°C y en presentación sólida (polvo) con un peso de 5 mg. Para obtener una concentración de 5 mg/mL, se agregó 1 mL de agua destilada al envase en donde se encontraba el polvo. Se mezcló y a continuación, se procedió a preparar 3000 μL de péptido con medio caldo Sabouraud a 0% de glucosa a una concentración de 1600 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de péptido. Para ello, se agregó a un tubo falcon 960 μL de péptido y se aforó con 2040 μL de caldo Sabouraud para así obtener el volumen necesario para agregar a cada pozo.

Después, teniendo el inóculo así como el péptido preparados, se procedió a montar dos cajas de 96 pozos. A la primera caja, se le agregó el inóculo de 10^6 células/mL en un volumen de 100 μL tanto de la cepa sensible como de la cepa resistente en los pozos especificados y por triplicado teniendo en cuenta que estos son considerados el control de crecimiento agregando adicionalmente 100 μL de caldo Sabouraud a 0% de glucosa. Además, en los pozos siguientes en donde se evaluó el péptido, se repitió el mismo procedimiento descrito pero en lugar de agregarle caldo Sabouraud para completar un volumen de 200 μL , se agregaron 100 μL de péptido. Se agregaron 200 μL de caldo Sabouraud a 0% de glucosa como control del montaje, y se llevó a incubar la caja por 1 hora a 37°C .

Culminado el tiempo de incubación, se extrajeron 200 μL de todos los pozos y se agregaron 200 μL de caldo Sabouraud fresco a cada uno nuevamente. Se llevó a incubar la caja por 24 horas a 37°C , y al finalizar este tiempo se procedió a lavar la placa, se agregaron 10 μL de resazurina y se dejó incubando a 37°C en condiciones de oscuridad por una hora y media. Culminado este tiempo de incubación, se leyó la placa en el equipo de fluorescencia y se registraron los datos en Excel.

Con respecto a la segunda caja, se realizó la misma distribución que la primera pero con ciertas modificaciones. En primer lugar, se agregaron 100 μL del inóculo de 10^6 células/ml tanto de la cepa sensible como resistente en el control de crecimiento y en los pozos en donde se evaluó el péptido. Posteriormente, este volumen añadido se completó con 100 μL de caldo Sabouraud para obtener un volumen final de 200 μL y se llevó a incubar la caja por 1 hora a 37°C . Concluido el tiempo de incubación, se retiraron 200 μL de todos los pozos y se agregaron 200 μL del caldo

Sabouraud en los pozos de control de crecimiento y 100 μL de este mismo caldo en los pozos disponibles para evaluar el péptido. A estos últimos pozos, se les agregó adicionalmente 100 μL de péptido y se llevó la placa a incubar por 24 horas a 37°C. La continuación del procedimiento se realizó de la misma forma que con la caja 1. La distribución en la placa se muestra en la Figura 3.

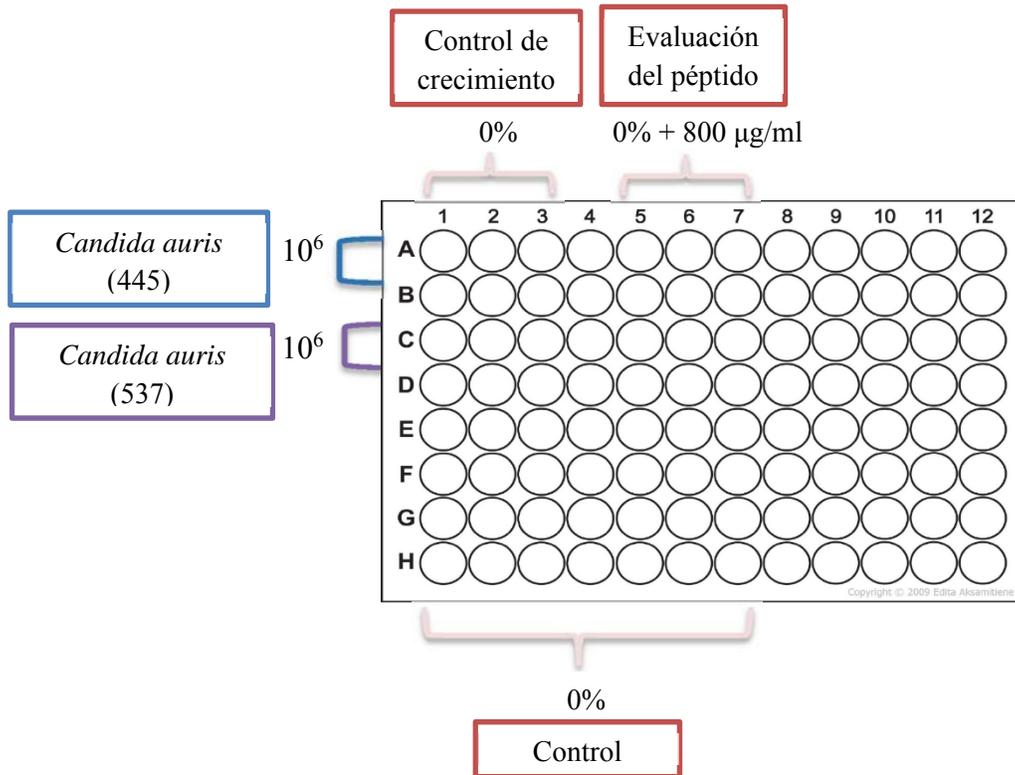


Figura 3. Distribución del plato multipozos a una concentración de inóculo de 10^6 células/mL en 0% de glucosa y evaluación del péptido. Se observa la concentración de inóculo de las dos cepas de *C. auris* evaluadas a 0% de concentración de glucosa siendo este el control de crecimiento. Adicionalmente, se observan los pozos en donde se evaluó el péptido a una concentración de 800 $\mu\text{g/ml}$, y en la parte inferior el control correspondiente al medio sin inóculo ni péptido ubicado en la fila G desde la columna 1 a la 7.

Para el análisis estadístico de la evaluación del péptido en la biopelícula se realizó la prueba de la t de Student en el programa *Prism – GraphPad*. La significancia estadística se determinó utilizando el método de Holm-Sidak, con p valor = 0.05.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Evaluación de la susceptibilidad antifúngica con fluconazol y péptido LfcinB (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB en cepas de *C. auris*

Las cepas de *C. auris* tanto 445 como 537 fueron correctamente identificadas en el equipo MALDI-TOF, lo que nos corroboró la veracidad de los resultados obtenidos en los montajes posteriores. Ahora bien, la susceptibilidad antifúngica con fluconazol permitió conocer la CIM a la cual la cepa de *C. auris* tanto 445 como 537 presenta sensibilidad y resistencia al antifúngico respectivamente. Se puede evidenciar en la Tabla 2 los resultados obtenidos.

Tabla 2. Prueba de susceptibilidad antifúngica con fluconazol en *Candida auris*.

Actividad antifúngica (48 horas) con FLC		
Cepa	Referencia	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. auris</i>	445-PUJ-HUSI	16
<i>C. auris</i>	537-PUJ-HUSI	64

De acuerdo a una publicación realizada por el CDC en la cual se evaluó la susceptibilidad antifúngica de aislamientos de *C. auris* resistentes frente a diferentes antifúngicos entre los cuales se encontraba el fluconazol, el punto de corte para la CIM registrada para este antifúngico fue ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$. El CDC comenta ante este resultado que dicha información se debe considerar como una guía general y no como un punto de corte definitivo para la resistencia, ya que la correlación entre los puntos de corte microbiológicos y los resultados clínicos no se conocen completamente hasta el momento [61].

Además, la CMI de fluconazol entre los aislamientos probados en CDC fue ≥ 256 , y se demostró que los aislamientos con CMI ≥ 32 tienen una mutación de resistencia en el gen *Erg11*, por lo que es poco probable que respondan al fluconazol. De esta forma, los resultados obtenidos verifican la resistencia de la cepa *C. auris* 537-PUJ-HUSI que incluso tiene un corte de inhibición mayor que el reportado por el CDC, y también verifican la sensibilidad de la cepa *C. auris* 445-PUJ-HUSI en la cual su CMI registrada se encuentra por debajo del punto de corte establecido [61].

La prueba de susceptibilidad antifúngica con el péptido Lfcinb (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB que posteriormente se evaluó en las biopelículas de *C. auris*, evidencia la concentración necesaria

para obtener un efecto tanto fungistático como fungicida. La Tabla 3 registra los valores resultantes.

Tabla 3. Prueba de susceptibilidad antifúngica con péptido LfcinB (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB en *Candida auris*.

Actividad antifúngica (48 horas) con péptido LfcinB (21-25) _{pal} derivado de la LfcinB			
Cepa	Referencia	Fungistático	Fungicida
		μg/mL (μM)	
<i>C. auris</i>	445-PUJ-HUSI	200 (135)	200 (135)
<i>C. auris</i>	537-PUJ-HUSI	200 (135)	>200 (>135)

El péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{pal} fue evaluado también por el grupo SAMP en diferentes cepas bacterianas donde se obtuvieron los siguientes resultados: *E. coli* ATCC 11775 (25 μg/mL CMI y 25 μg/mL CMB), *E. coli* ATCC 25922 (25 μg/mL CMI y 50 μg/mL CMB), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (100 μg/mL CMI y 200 μg/mL CMB), *E. faecalis* ATCC 29212 (100 μg/mL CMI y 100 μg/mL CMB), *S. aureus* ATCC 25923 (200 μg/mL CMI y 200 μg/mL CMB) [5]

De acuerdo a esto, los resultados obtenidos por el grupo SAMP evidencian que la concentración a la cual tiene efecto el péptido es diferente para cada microorganismo. Además, la concentración tanto de CMI como de CMB obtenida para *S. aureus* a la cual es activo el péptido, es similar a las obtenidas tanto para *C. auris* sensible como resistente. Esto quiere decir que el rango de actividad del péptido en células planctónicas de la levadura se encuentra alrededor de 200 μg/mL, por lo cual y basado en estos valores, la biopelícula se evaluó a concentraciones superiores de 200 μg/mL.

Es importante resaltar que los efectos fungicidas que fueron evidentes para este caso se encuentran en una concentración aún mayor en la cepa resistente de *C. auris* que en la cepa sensible, aunque los efectos fungistáticos para ambas cepas si fue el mismo.

7.2. Determinación de la formación de biopelículas de *C. auris* frente a diferentes condiciones (concentración de nutrientes, concentración del inóculo y tiempo de incubación)

Con el fin de establecer las óptimas condiciones de crecimiento de la biopelícula en *C. auris*, se evaluaron diferentes parámetros entre los cuales se destacó la concentración de nutrientes específicamente la glucosa, la concentración del inóculo y el tiempo de incubación. En el primer ensayo se compara el crecimiento de la biopelícula a diferentes concentraciones de glucosa del medio y también de inóculo de la levadura a un tiempo de incubación de 48 horas. Los resultados tanto para la cepa sensible como resistente de *C. auris* se evidencian en la Figura 4.

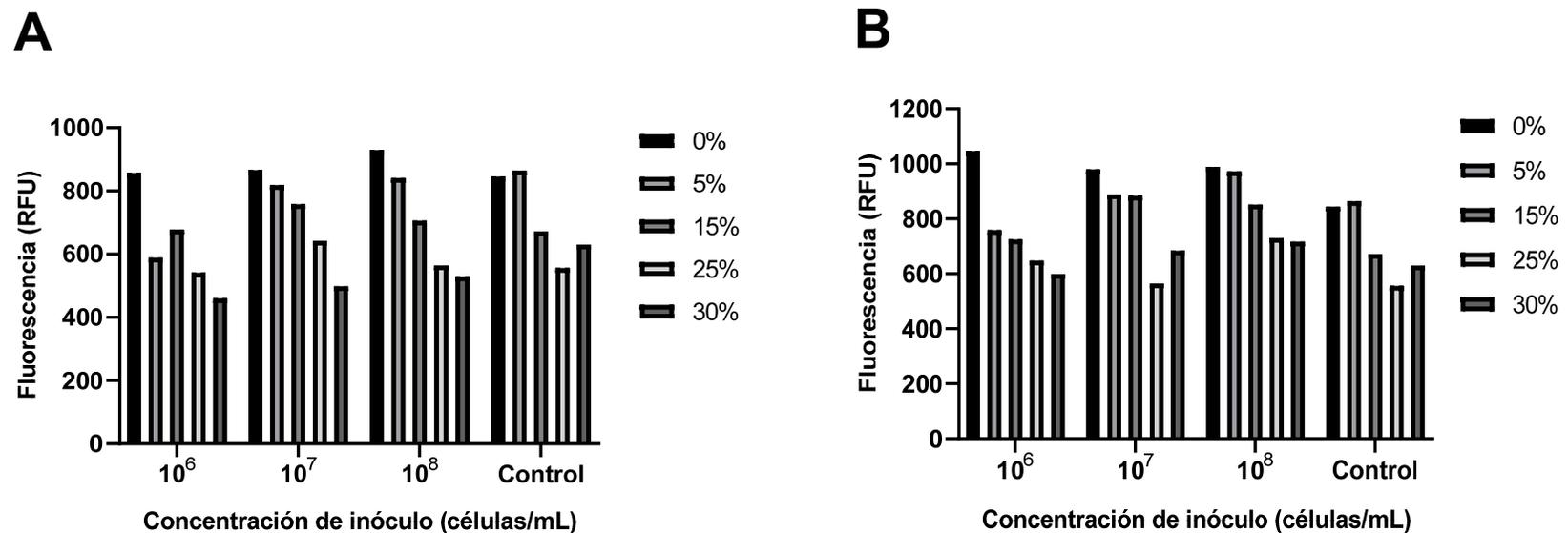


Figura 4. Primer ensayo de determinación de la formación de biopelícula de *C. auris*. Se observan las diferentes concentraciones de glucosa y de inóculo a 48 h de incubación, el control corresponde al medio de glucosa sin inóculo. (A), 445 PUJ-HUSI (B), 537 PUJ-HUSI.

Las gráficas demuestran un mayor crecimiento de la biopelícula a concentraciones menores de glucosa. En la cepa *C.auris* 445 se evidencia un incremento en la producción de la biopelícula a una concentración de 0% de glucosa para las tres diferentes concentraciones de inóculo, siendo el menor crecimiento al 30% de glucosa. Incluso, se observa una tendencia en la reducción de la biopelícula a una mayor concentración de glucosa tanto en 10^7 y 10^8 células/mL. En 10^6 células/ml, la mayor producción de biopelícula se observa a 0% de glucosa seguida por el 15% de glucosa. Además, se demuestra que no hay diferencia de crecimiento de la biopelícula cuando se evalúa la levadura a diferentes concentraciones, observándose un desarrollo muy similar en las tres condiciones.

En la cepa *C. auris* 537 se observa la misma tendencia que en la cepa sensible en donde hay un incremento en el crecimiento de la biopelícula a una concentración menor de glucosa. El crecimiento se reduce a concentraciones más altas de glucosa: en 10^6 células/ml hay menor producción a 30% de glucosa, en 10^7 células/ ml a 25% y en 10^8 células/ml a 30%. También, es posible afirmar que la concentración de inóculo no afecta el desarrollo de la biopelícula evidenciándose una semejanza para los tres parámetros evaluados.

La formación de biopelícula es escasamente mayor en la cepa resistente que en la sensible, en donde la producción más alta de biopelícula se registró alrededor de 1000 RFU en *C.auris* 537 y de 900 RFU aproximadamente en *C. auris* 445, por lo que se puede afirmar que ambas cepas tienen un crecimiento equivalente. Los pozos control tuvieron una tendencia similar a los pozos evaluados por lo que se concluye que se generó contaminación.

Para el segundo ensayo, se establecieron los mismos parámetros que el primero y lo único que varió fue el tiempo de incubación, que para esta ocasión se evaluó a las 24 horas. Los resultados obtenidos se evidencian en la Figura 5.

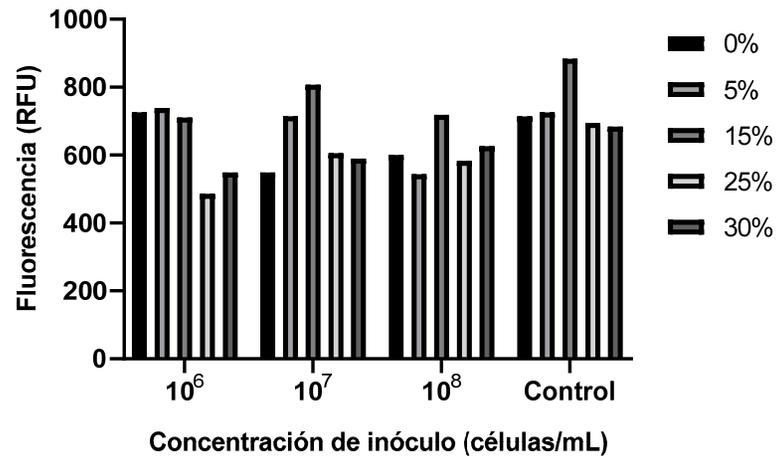
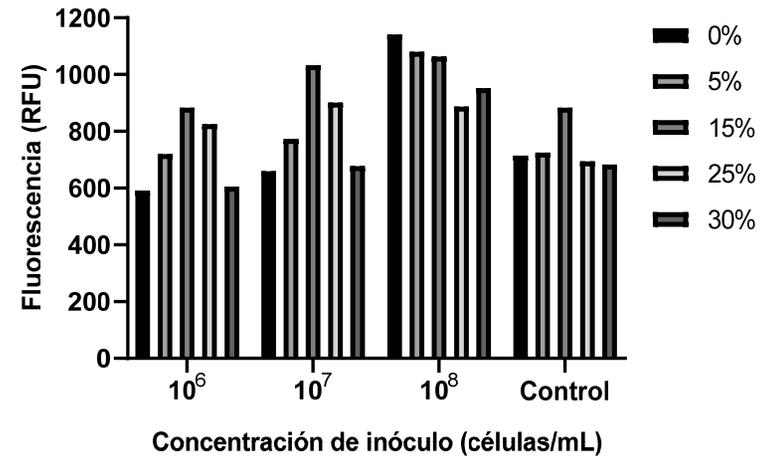
A**B**

Figura 5. Segundo ensayo de determinación de la formación de biopelícula de *C. auris*. Se observan las diferentes concentraciones de glucosa y de inóculo a 24 h de incubación, el control corresponde al medio de glucosa sin inóculo. (A), 445 PUJ-HUSI (B), 537 PUJ-HUSI.

A diferencia de las Figuras 4, las Figura 5 evidencia una mayor producción de biopelícula a una concentración de glucosa de 15% en la mayoría de los casos. Sin embargo, en la cepa sensible a 10^6 células/ml y en la cepa resistente a 10^8 células/ml, el crecimiento de la biopelícula se incrementa a una concentración de 0% de glucosa. Estos resultados al ser comparados con los anteriormente descritos, permiten concluir que la formación de la biopelícula en *C. auris* es mayor a una concentración de glucosa que varía entre 0% y 15%. Así mismo, en ninguna de las dos cepas valoradas se observó un crecimiento elevado a una concentración de 30% de manera constante para las diferentes concentraciones de inóculo, por lo que probablemente el aumento en la cantidad de glucosa no afecta la formación de la biopelícula.

Por otra parte, la diferencia entre la concentración de inóculo de la levadura tanto en la cepa resistente como en la cepa sensible no afectó la producción de biopelícula, viéndose una tendencia de crecimiento semejante para las tres condiciones. Sin embargo, la cepa resistente presenta un leve incremento en la producción de biopelícula que la cepa sensible como se comentó previamente.

Con respecto al tiempo de incubación se puede afirmar que no se presentan diferencias significativas en la formación de biopelícula, por lo cual lo que se haya formado a las 24 horas de incubación se mantiene constante hasta las 48 horas. Finalmente, y así como sucedió con el primer ensayo, los pozos control evidenciaron un crecimiento similar a los pozos evaluados, por lo tanto se concluye que hubo contaminación también. En el tercer ensayo y teniendo en cuenta los resultados previos, se evaluaron nuevamente las condiciones establecidas a las 24 horas de incubación y evitando la contaminación de los controles. Los resultados se muestran en la Figura 6.

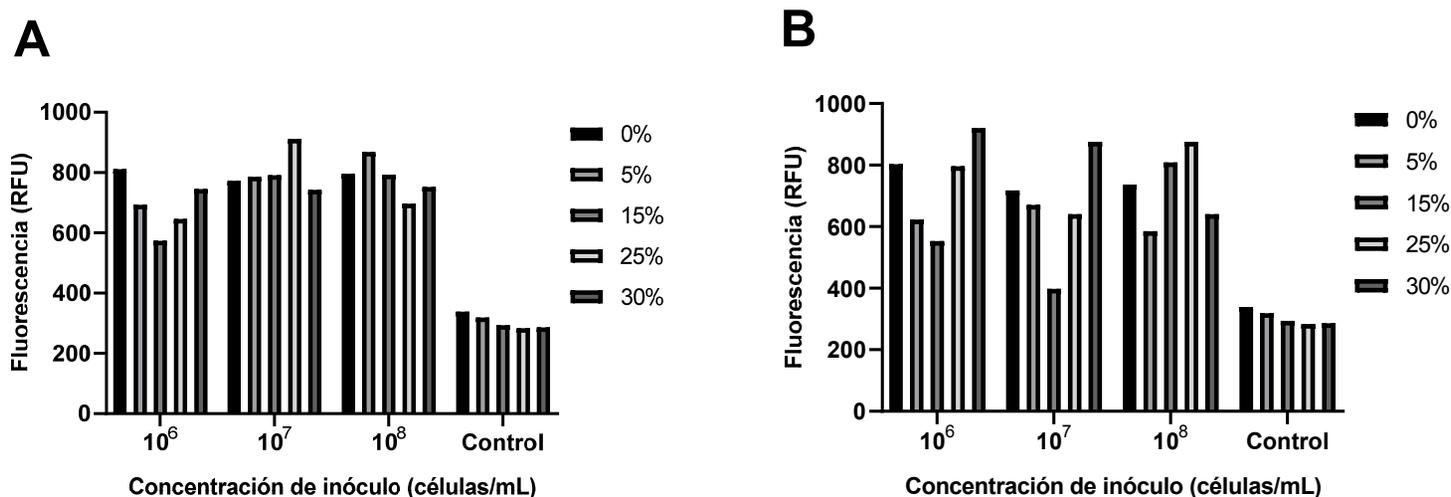


Figura 6. Tercer ensayo de determinación de la formación de biopelícula de *C. auris*. Se observan las diferentes concentraciones de glucosa y de inóculo a 24 h de incubación, el control corresponde al medio de glucosa sin inóculo. (A), 445 PUJ-HUSI (B), 537 PUJ-HUSI.

Los resultados de este ensayo revelaron detalles muy similares a los expuestos con anterioridad. La cepa de *C. auris* 445 presentó un crecimiento homogéneo tanto para las diferentes concentraciones de glucosa como para las de inóculo, lo cual sugiere que estas variables no afectan de forma significativa la formación de biopelícula. Con relación a la cepa de *C. auris* 537, se observa un incremento en la producción de biopelícula a una concentración de glucosa de 30% para los dos primeros inóculos, seguido de la concentración de glucosa nuevamente al 0% de glucosa. En lo que respecta a la concentración de inóculo, no se observa un aumento en la producción de biopelícula predominante en alguna de estas variables.

Estos resultados demuestran que posiblemente la levadura crece ya sea con mucha o poca glucosa, por lo que la concentración que haya en el medio de este nutriente probablemente no es indispensable para la formación de la biopelícula. De igual manera, con respecto a los resultados obtenidos podemos evidenciar que las concentraciones de inóculo no afectan la cantidad de biomasa producida por la biopelículas.

El ensayo realizado por Herek, T y colaboradores (2018), en el cual se basó la metodología de este experimento, tuvo como objetivo evaluar la respuesta de aislamientos de *Candida parapsilosis* ante la presencia de concentraciones de glucosa equivalentes a las encontradas en los catéteres durante la administración de nutrición parenteral (TPN), en la cual el carbohidrato estándar es el mencionado. Lo anterior debido a que el papel de TPN en candidemias aumenta alrededor de 3,6 veces en comparación con pacientes que no se someten a una nutrición por esta vía.

Los resultados de este estudio indicaron que altas concentraciones de glucosa estimulan la formación de biopelículas y la diferenciación celular en sangre de aislamientos de *C. parapsilosis*, lo cual se correlaciona directamente con la habilidad de la levadura de formar estructuradas biopelículas a concentraciones aumentadas de glucosa y su capacidad para colonizar diferentes dispositivos médicos. No obstante, las conclusiones obtenidas en este estudio no van en acuerdo con las de la evaluación de las cepas de *C. auris*, en donde no se evidencia siempre una mayor producción de biopelícula a una concentración incrementada de glucosa [62].

Esto se puede explicar teniendo en cuenta un estudio realizado en el 2017 el cual tuvo por objetivo determinar los efectos de glucosa, sucrosa y sacarina en el crecimiento, adhesión y formación de biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Los resultados mostraron que la adhesión de *C.*

tropicalis se favoreció tanto a 5 como a 10% de concentración de sacarosa, mientras que *C. albicans* promovió su adhesión con 5 y 10% de glucosa [63].

Aunque estos azúcares promueven la adhesión de ambas especies, el crecimiento de la biopelícula de ambas levaduras no fue promovida a un 10% debido a que en altas concentraciones de azúcar, la concentración de agua es menor, y este hecho actúa como un factor limitante en la producción de biopelícula. En concentraciones altas de azúcar las tasas de biosíntesis y desarrollo biopelícula-microorganismo aumentan. Sin embargo, en esta situación el agua disponible es un condicionante por la gran cantidad de glucosa y otros azúcares que hay en el medio, lo que imposibilita también una correcta formación de la matriz extracelular de la biopelícula que está conformada en un 97% de agua y en donde se encuentran componente fundamentales tales como polisacáridos, proteínas, DNA, entre otros [63].

De la misma forma en otros estudios en donde se evaluó el efecto de la concentración de glucosa en la formación de biopelículas de *Candida*, se encontró que el crecimiento de biopelículas de *C. albicans* en altas concentraciones de galactosa alcanzaron un máximo después de las 48 h y luego disminuyeron posiblemente como consecuencia del agotamiento de oxígeno y nutrientes en la biopelícula. También, al evaluar la producción de biopelícula en un medio con una concentración de glucosa de 100 mmol/L y 300 mmol/L, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de microorganismos viables [64], [65].

Por otro lado, la evaluación de la concentración del inóculo en *C. auris* permitió concluir que esta no genera un efecto importante en la formación de la biopelícula, por lo cual a las tres concentraciones valoradas la levadura es capaz de desarrollarse. En múltiples estudios en los cuales se ha evaluado la formación de biopelícula de *C. auris*, se ha utilizado un rango de crecimiento entre 10^6 y 10^8 células/mL, por lo cual se quiso conocer la concentración óptima de crecimiento de la biopelícula [6], [36], [30], [66]. Sin embargo, no se presentan diferencias para el desarrollo de la biopelícula en estas condiciones, lo que permite concluir que no hay una concentración óptima de crecimiento entre estos tres inóculos.

En cuanto al tiempo de incubación, se puede afirmar que no hay una diferencia significativa en relación a un tiempo prolongado de incubación de más de 48 horas. Esto conlleva a concluir que aquello que creció en la fase de maduración de la biopelícula dentro de las primeras 24 horas se

mantiene relativamente constante tiempo después. En un estudio realizado en Estados Unidos en donde se evaluó la formación de biopelícula de *C. auris*, se observó que *C. auris* y *C. albicans* poseen patrones de crecimiento similares alcanzando una fase estacionaria en aproximadamente 20 horas [36], [30].

También, en un artículo publicado en la revista mSphere de la Sociedad Americana de Microbiología en donde se analizó el perfil transcriptómico de *C. auris* asociado a la formación de biopelículas, se demostró que el desarrollo de la biopelícula se genera en una primera instancia de adherencia de la levadura a la superficie denominada “fase temprana” que se establece en un rango de hasta 4 horas, seguida por la “fase intermedia” que corresponde a la etapa de proliferación de la levadura en un tiempo de hasta 12 horas, y finalmente la “fase madura” en la cual se estructura completamente la biopelícula en un tiempo de 24 horas [36], [30].

Es importante resaltar que en la literatura no se encuentra mucha información sobre las condiciones óptimas para el crecimiento de la biopelícula en *C. auris*, por lo cual el propósito de evaluar las variables anteriores permite establecer los parámetros a los cuales se puede valorar el péptido. De esta forma, se realizó el montaje a una concentración de 10^6 células/mL, utilizando un tiempo de incubación de 24 horas y en un medio de 0% de glucosa.

7.3. Evaluación del efecto del péptido LfcinB (21-25)_{pal} derivado de la LfcinB en biopelículas de *C. auris* resistente a fluconazol

Para evaluar el efecto del péptido en la biopelícula de *C. auris*, se realizó el montaje especificado en la metodología utilizando el medio caldo Sabouraud con 0% de glucosa, un inóculo de 10^6 células/ml y un tiempo de incubación a las 24 horas. A continuación se muestran los resultados obtenidos para la primera caja montada en la cual el péptido se agregó previamente a su incubación de 1 hora, y la segunda caja montada en la cual el péptido se agregó posteriormente a la incubación de 1 hora (Figura 7).

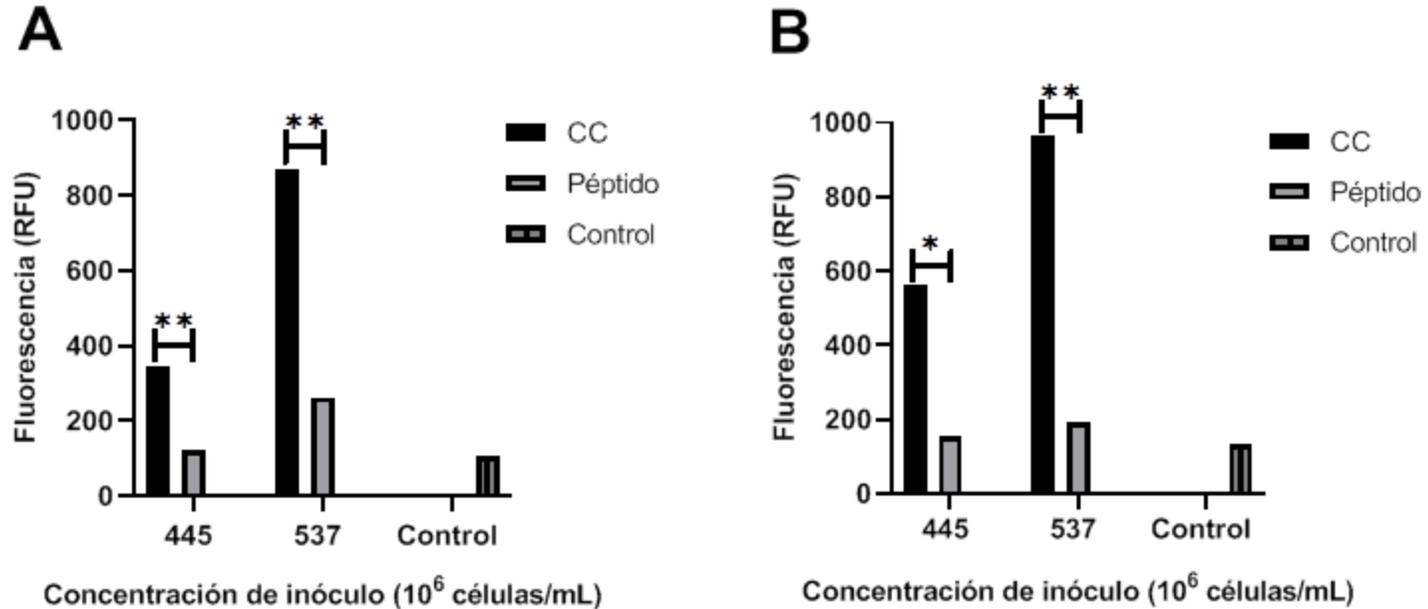


Figura 7. Evaluación del péptido LfcinB (21-25) derivado de la LfcinB en biopelículas de *C. auris*. Se evidencia la cepa 445 PUJ-HUSI y 537 PUJ-HUSI a una concentración de inóculo de 10^6 células/mL. El control de crecimiento (CC) corresponde al inóculo sin péptido y el control corresponde al medio de glucosa sin inóculo. (A), Inóculo y péptido pre incubados por 60 mins a 37°C , y posterior incubación de 24 h (Caja 1), $p=0,0019$ (445), $p=0,0010$ (537). (B), Inóculo pre incubado por 60 mins a 37°C , y posterior incubación de 24 h con péptido (Caja 2), $p=0,041$ (445), $p=0,0049$.

Con relación a la gráfica anterior (Figura 7) es posible afirmar que el crecimiento de la biopelícula es mayor en la cepa resistente que en la cepa sensible como se ha mencionado hasta el momento. De la misma manera, al comparar los resultados obtenidos para el primer experimento correspondiente a la caja 1 con el segundo asociado a la caja 2, se puede afirmar que se presenta una mayor producción significativa de biopelícula tanto en *C. auris* 445 como en *C. auris* 537 en la caja 1 donde el péptido fue agregado junto al inóculo.

Esto se encuentra relacionado directamente con la posibilidad de menor adhesión de las células presentes en el medio a la superficie de la placa al ser tratadas con el péptido, recordando que la formación de la biopelícula depende de la habilidad de las levaduras en adherirse a la superficie en la primera fase inicial de crecimiento.

Se ha demostrado que varios genes que codifican para proteínas de la pared celular unidas a GPI (Glicosilfosfatidilinositol) entre los cuales se incluye IFF4, CSA1, PGA26 y PGA52, se regulan positivamente en todas las etapas de formación de la biopelícula de *C.auris* pero destacando su importancia en los procesos de adhesión celular que suceden en las primeras fases de crecimiento. De la misma forma dos proteínas (ALS1 y ALS5) miembros de la familia de las aglutininas (ALS) que se encuentran asociadas a procesos de adherencia, se representaron en el transcriptoma de *C. auris* reguladas positivamente a lo largo de la formación de la biopelícula y con una mayor predominancia en etapas finales de maduración [36].

Ahora bien, las gráficas evidencian que tanto en la caja 1 como en la caja 2 se presentó una reducción significativa de la formación de biopelícula tanto en la cepa sensible como en la cepa resistente al agregar el péptido en etapas tempranas de crecimiento. El péptido LfcinB (21-25)_{pal} efectivamente previene la formación de la biopelícula en *C. auris* al reducir la adhesión de la levadura a la superficie de la placa.

Se puede afirmar que el péptido tiene acción similar tanto en las células adheridas e incubadas por 1 hora a las que se les agregó posteriormente el tratamiento, como en las células que lograron adherirse al ser incubadas junto al péptido por 1 hora. La reducción en la formación de la biopelícula a una concentración de 10^6 células/ml en la cepa sensible y resistente de *C. auris* se evidencia en un 70% aproximadamente para ambos ensayos. Así también, se puede apreciar una disminución en la producción de la biopelícula en comparación con el control de crecimiento llegando a registrarse una fluorescencia de aproximadamente 200 RFU para todos los casos.

Se ha demostrado en diferentes PAMs que la selectividad de la membrana celular de los microorganismos como sitio diana de acción depende de la composición de esta y de la carga que posee. La membrana de las células eucariotas se compone principalmente de lípidos como el glicerofosfolípido (GPL), lisolípidos y esfingolípidos los cuales poseen carga negativa. En hongos, la membrana posee una carga negativa por la elevada presencia de fosfatidilinositol (PI) y ácidos

fosfatídicos (PA), así como otros lípidos como el GSL (glucoesfingolípidos), por lo cual péptidos con carga catiónica pueden interactuar con estos componentes y generar una desestabilización de la membrana [67].

En efecto, se ha demostrado que los GSL ubicados en la membrana, están presentes en el crecimiento de levaduras participando activamente en señales de transducción y suministro de proteínas como GPI (glicosilfosfatidilinositol) involucradas en el anclaje transmembranal, la señalización de proteínas y los procesos de adhesión en la formación de la biopelícula como se mencionó previamente, lo que los convierte en un objetivo vulnerable frente a agentes antifúngicos [67].

Entre los estudios realizados por el grupo SAMP se resalta que el péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{pal} presenta residuos cargados e hidrofóbicos alternados lo que probablemente le confiere anfipaticidad a la cadena, y esto es un requisito indispensable para la interacción y disrupción de la membrana. De hecho, la anfipaticidad permite que la parte hidrofóbica del péptido interactúe con cadenas acílicas de los lípidos, mientras que la parte hidrofílica interactúa con las cabezas polares de los fosfolípidos en la membrana, lo que conlleva a una desestabilización [5], [68].

Lo anterior sugiere que el péptido evaluado probablemente tiene una acción directa sobre la membrana de *C. auris* que le ocasiona un desequilibrio no sólo en su estructura sino también en los diferentes procesos que se llevan a cabo allí como son los asociados a la adhesión. Esto impide que las células no puedan unirse correctamente a la superficie ni tampoco entre ellas, ocasionando la inhibición en la producción de la biopelícula.

El mecanismo de acción de los péptidos no puede estar asociado solamente a la membrana del microorganismo y es aquí en donde los componentes de la matriz de la biopelícula juegan un papel muy importante. El ambiente generalmente negativo de la matriz puede llegar a relacionarse directamente con una acción del péptido LfcinB (21-25)_{pal} ya que este es catiónico, lo que permite la unión y posterior acción de este. Además, los componentes de la matriz como lo son los polisacáridos, proteínas, ADN, entre otros, pueden tener afinidad con el péptido de acuerdo a las interacciones no sólo hidrofóbicas sino electrostáticas que pueden llegarse a formar [69].

De hecho, un estudio demostró que un péptido sintético derivado de una proteína anticongelante de garrapatas denominado P1 altera la arquitectura de la biopelícula de *Streptococcus mutans* disminuyendo significativamente las bacterias viables en la biopelículas. Aunque P1 puede unirse directamente a las células bacterianas, no muestra actividad bactericida. Por lo tanto, los autores plantearon la hipótesis de que este péptido podría perjudicar la secreción y/o interacción entre los polímeros extracelulares en la matriz [70].

Otro estudio investigó eDNA que es un componente común de la matriz de biopelículas, como un objetivo potencial para dos Host defense peptides (HDP) de peces homólogos, piscidin-1 y piscidin-3, que llevan motivos de unión de cobre C-terminales. La extracción de eDNA de biopelículas de *P. aeruginosa* tratados con cualquiera de los péptidos mostró una degradación del eDNA dependiente de cobre. Curiosamente, según estudios previos que utilizan membranas microbianas y de modelo, ambos péptidos parecen seguir mecanismos de ruptura de la membrana, lo que sugiere que los péptidos pueden actuar a través de múltiples mecanismos [70].

Este estudio permite sugerir aquellos mecanismos de acción que pueden estar asociados al péptido evaluado sobre la biopelícula de *C. auris*, sin embargo, para definir mejor su mecanismo de acción y funcionamiento se hace necesario analizar los genes asociados a la regulación de la biopelícula. En un estudio en donde se evaluó la actividad in vitro del péptido sintético hLF1-11 contra la biopelícula producida por aislamientos clínicos de *C. albicans* con diferente susceptibilidad al fluconazol, se caracterizó la biopelícula de esta por medio de transcriptómica para conocer el efecto del péptido en cuestión [71].

Teniendo en cuenta que el principal carbohidrato extracelular identificado es el β -1,3-glucano, sintetizado por la β -1,3-glucano sintasa (GSC1), la transcripción de GSC1 se incluyó como un índice de la producción de matriz. Se encontró que efectivamente el péptido hLF1-11 regulaba el gen GSC1. Sin embargo, el estudio concluye que poco se sabe acerca de la regulación de la producción de matriz de biopelículas, que se basa en mecanismos reguladores complejos que involucran varios factores de transcripción, por lo que se hace necesario estudiar dichos mecanismos [71].

8. CONCLUSIONES

A pesar de que en la literatura la formación de la biopelícula de *C. auris* no está completamente caracterizada, los resultados obtenidos contribuyen a una aproximación de las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo. Es así como se sugiere que la levadura crece indiscriminadamente ya sea en un medio con mucha o poca glucosa pero con una preferencia evidente por un ambiente escasamente glúcido.

De igual manera, las concentraciones de inóculo evaluadas en 10^6 , 10^7 y 10^8 células/ml no presentan diferencias para el desarrollo de la biopelícula, lo que permite concluir que no hay una concentración óptima de crecimiento entre estos tres inóculos.

Con relación al tiempo que tarda en formarse la biopelícula de *C. auris* se puede concluir que aquello que creció en la fase de maduración de la biopelícula dentro de las primeras 24 horas se mantiene relativamente constante tiempo después, por lo que no se observan diferencias significativas de crecimiento entre las 24 y 48 horas de incubación.

El péptido LfcinB (21-25)_{pal} efectivamente previene la formación de la biopelícula de *C. auris* en etapas tempranas de crecimiento. Particularmente en la cepa resistente, la reducción de la producción de la biopelícula se logra con una concentración de péptido (800 $\mu\text{g/mL}$) mucho mayor que los valores de MIC registrados para este estudio (64 $\mu\text{g/mL}$).

La acción del péptido LfcinB (21-25)_{pal} es similar tanto en las células adheridas e incubadas por 1 hora a las que se les agregó posteriormente el tratamiento, como en las células que lograron adherirse al ser incubadas junto al péptido por 1 hora, evidenciándose una reducción en la formación de la biopelícula para ambos casos de aproximadamente 75%.

El péptido LfcinB (21-25)_{pal} se contempla como un posible candidato para el tratamiento de infecciones de *C. auris* asociadas a biopelículas.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuros estudios que el análisis de la producción y el desarrollo de la biopelícula se evalúen no sólo por métodos que indiquen la actividad metabólica levadura, sino también la densidad de la misma. También, es importante realizar la evaluación de la formación de la biopelícula en catéter con el fin de tener un acercamiento más real a las condiciones en las cuales se generan las infecciones por *C. auris*.

Para entender el mecanismo de acción del péptido se recomienda realizar un estudio transcriptómico en donde se analicen aquellos genes involucrados en la formación de la biopelícula y cómo se pueden ver afectados por la presencia del tratamiento. Asimismo, se propone realizar un sinergismo de los antifúngicos convencionales con el péptido de interés y estudiar su efecto en biopelículas de *C. auris*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. S. Loreto y J. S. M. Tondolo, «Introductory Chapter: Epidemiology of Invasive Fungal Infection - An Overview,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.intechopen.com/online-first/introductory-chapter-epidemiology-of-invasive-fungal-infection-an-overview>.
- [2] Anónimo, «Candida auris: A Drug-resistant Germ That Spreads in Healthcare Facilities,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-drug-resistant.html>.
- [3] C. Figueras Nadal, «Infección fúngica invasiva (IFI): actualización,» [En línea]. Available: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/ifi.pdf>.
- [4] A. Chowdhary, C. Sharma y J. F. Meis, «Candida auris: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436850/>.
- [5] Y. V. Casanova, «Evaluación de la actividad antibacteriana de péptidos diméricos y tetraméricos derivados de lactoferricina bovina contra bacterias gram positivas y gram negativas,» 2018. [En línea]. Available: <http://bdigital.unal.edu.co/70883/1/TESIS%20YVC%20%28Vf%20JEGC-ZR%29%20%20versi%C3%B3n%20final%20empastar%20231118%20-%20Repositorio.pdf>.
- [6] P. Larkin E, «The Emerging Pathogen Candida auris: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation.,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28223375>.
- [7] T. Marcio Nucci, «Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey,» 2013. [En línea]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059373>.
- [8] C. Chowdhary A, «Multidrug-resistant endemic clonal strain of Candida auris in India.,» 2014. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357342>.
- [9] J. O. Sekyere, «Candida auris: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen,» 2018. [En línea]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.578>.
- [10] L. Rossato y A. Lopes Colombo, «Candida auris: What Have We Learned About Its Mechanisms of Pathogenicity?,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03081/full#B33>.
- [11] T. Marcio Nucci, «Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey,» 2013. [En línea]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059373>.

- [12] G. Dominguez, «Conserved role for biofilm matrix polysaccharides in *Candida auris* drug resistance,» 2018. [En línea]. Available: <https://msphere.asm.org/content/4/1/e00680-18.abstract>.
- [13] I. R. Campsa y M. Cuenca-Estrell, «Antifúngicos para uso sistémico,» 2009. [En línea]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-antifungicos-uso-sistemico-S0213005X09002924>.
- [14] J. Allevato, R. Negroni y R. Galimberti, «Antifúngicos,» 2007. [En línea]. Available: http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf.
- [15] F. Seganti L, «Antibacterial activity of lactoferrin against virus,» *Biometals*, pp. 295-299, 2004.
- [16] RO, «*Candida* in the ICU.,» 2009. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375635>.
- [17] G. Soraya E. Morales-López, «12. Morales-Lopez SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzon A. Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris*, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jan; 23(1): 162–164.,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5176232/>.
- [18] H. Satoh K, «*Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital.,» 2009. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161556>.
- [19] H. Emily S. Spivak, «*Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen,» 2018. [En línea]. Available: <https://jcm.asm.org/content/jcm/56/2/e01588-17.full.pdf>.
- [20] G. Malbrán, «Consideraciones del Laboratorio Nacional de Referencia en Micología Clínica de Argentina sobre la emergencia de *Candida auris*,» 2016. [En línea]. Available: <http://www.anlis.gov.ar/inei/micologia/?p=454>.
- [21] E. Borman AM, «Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species.,» 2016. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547827>.
- [22] R. Ben-Ami, «Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel,» [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5324804/>.
- [23] A. C. Nancy, «Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey,» 2018. [En línea]. Available: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(18\)30597-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(18)30597-8/fulltext).
- [24] M. Polke, «Polke, M., Hube, B., and Jacobsen, I. D. (2015). *Candida* survival strategies. *Advances in Applied Microbiology*. 91, 139–235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002,» 2014. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216414000537?via%3Dihub>.
- [25] M. Welsh, «Survival, persistence and isolation of the Emerging Multidrug-Resistant pathogenic yeast surfaces.,» *J. Clin Microbiology*, pp. 299-3005, 2017.

- [26] L. Yujie Zho, «ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of *Candida albicans* during the oral mucosal infection,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41368-018-0013-2>.
- [27] G. José F. Muñoz, «Genomic basis of multidrug-resistance, mating, and virulence in *Candida auris* and related emerging species,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/04/11/299917.full.pdf>.
- [28] J. H. y. P. K. Mukherjee, «*Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance,» 2016. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566167/>.
- [29] G. Ramage, «Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms,» 2001. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90680/>.
- [30] L. Sherry, «Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098553>.
- [31] S. Michel Vert, «Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012),» 2012. [En línea]. Available: <http://publications.iupac.org/pac/pdf/2012/pdf/8402x0377.pdf>.
- [32] K. Hans-Curt Flemming, «Biofilms: an emergent form of bacterial life,» 2016. [En línea]. Available: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.94>.
- [33] J. Chandra y P. K. Mukherjee, «*Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance,» 2016. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566167/>.
- [34] J. F. Muñoz, L. Gade y N. A. Chow, «Genomic basis of multidrug-resistance, mating, and virulence in *Candida auris* and related emerging species,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/04/11/299917.full.pdf>.
- [35] E. González, «Formación y desarrollo de biofilm: su impacto en los sistemas de abastecimiento y distribución de agua potable,» 2016. [En línea]. Available: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/66667/Documento_completo__%20Lic.%20Evangelina%20Gonzalez..pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- [36] R. Kean, C. Delaney y S. Leighann, «Transcriptome assembly and profiling of *Candida auris* reveals novel insights into biofilm-mediated resistance.,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29997121>.
- [37] A. Pfaller, «Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.,» 2007. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223626>.
- [38] A. Bahar y D. Ren, «Antimicrobial Peptides,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873676/>.
- [39] Kraan, J. v. Marle y K. Nazmi, «Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin,» 2005. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112390>.

- [40] SebastienFarnaud y R. W. Evans, «Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties.,» 2003. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568385>.
- [41] L. Leboffe, F. Giansanti y G. Antonini, «Antifungal and Antiparasitic Activities of Lactoferrin,» 2009. [En línea]. Available: https://www.researchgate.net/profile/Francesco_Giansanti/publication/233564370_Antifungal_and_Antiparasitic_Activities_of_Lactoferrin/links/00b49521ef4fa34c6e000000/Antifungal-and-Antiparasitic-Activities-of-Lactoferrin.pdf?origin=publication_detail.
- [42] C. D. Fjell, «Designing antimicrobial peptides: form follows function.,» 2011. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173434>.
- [43] Lupetti, A., Paulusma-Annema, A., Welling, M. M., Dogterom-Ballering, H., Brouwer, C. P., Senesi, S., et al. (2003). Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 262–267. doi: 10.1128/AAC.47.1.262-267.2003
- [44] L. Carrillo, R. Fierro Medina y J. Manríquez Rocha, «Design, Synthesis, and Use of Peptides Derived from Human Papillomavirus L1 Protein for the Modification of Gold Electrode Surfaces by Self-Assembled Monolayers,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6150238/>.
- [45] S. Farnaud, «Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties.,» 2003. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568385>.
- [46] M. Bellamy W, «Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N -terminal region of bovine lactoferrin.,» *J Appl Bacteriol*, p. 472–9, 1992.
- [47] Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraud, L., et al. (2016). Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* 21, 752. doi: 10.3390/molecules21060752
- [48] A. Solarte, «A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model,» 2017. [En línea]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174707>.
- [49] I. L. Diaz, «Design of Micelle Nanocontainers Based on PDMAEMA-b-PCL-b-PDMAEMA Triblock Copolymers for the Encapsulation of Amphotericin B,» 2015. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4674649/>.
- [50] Y. V. Casanova, «Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines.,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28961215>.
- [51] A. Giuliani, G. Pirri y S. F. Nicoletto, «Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics,» 2007. [En línea]. Available:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.90.2088&rep=rep1&type=pdf>.

- [52] L. Calvijo, «Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,» 2015. [En línea]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/453826/abs/>.
- [53] R. Fais, «The N-Terminus of Human Lactoferrin Displays Anti-biofilm Activity on *Candida parapsilosis* in Lumen Catheters,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5693879/>.
- [54] S. Paulone, «The synthetic killer peptide KP impairs *Candida albicans* biofilm in vitro.,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704490>.
- [55] J. A. Curvelo, «Histatin 5 and human lactoferrin inhibit biofilm formation of a fluconazole resistant *Candida albicans* clinical isolate,» 2019. [En línea]. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652019000100622&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- [56] S. Gonçalves, «Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and Biofilms,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00249/full>.
- [57] C Giraldo, «First report of sporadic cases of *Candida auris* in Colombia.,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29421668>.
- [58] J. H. Rex, «Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard,» 2008. [En línea]. Available: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf.
- [59] B. D. Alexander, «Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts,» 2017. [En línea]. Available: https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf.
- [60] B. LABTECH, «Lector de placas de fluorescencia,» [En línea]. Available: <https://www.bmglabtech.com/es/lector-de-placas-de-fluorescencia/>.
- [61] CDC, «Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>.
- [62] T. C. Herek, «Biofilm formation by blood isolates of *Candida parapsilosis* in the presence of a hyperglycemic solution at comparable concentrations of total parenteral nutrition.,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30652791>.
- [63] W. M.M, «The Effect of Nutritive and Non-Nutritive Sweeteners on the Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29131083>.
- [64] N. V. F. Bezerra, «Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms.,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30916487>.

- [65] S. P. Hawser, «Biofilm Formation by Candida Species on the Surface of Catheter Materials In Vitro,» 1994. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186203/pdf/iai00003-0155.pdf>.
- [66] C. J. Seneviratne, «Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of Candida albicans Biofilms,» 2008. [En línea]. Available: <https://aac.asm.org/content/52/9/3259.short>.
- [67] Marina Rautenbach, «Antifungal peptides: To be or not to be membrane active.,» 2016. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27234616>.
- [68] J. F. O. Garzón, «Antimicrobial Activity of Cationic Peptides Designed from Neutral Peptide,» 2017. [En línea]. Available: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/59665/html>.
- [69] M. Ammons, «Lactoferrin: A bioinspired, anti-biofilm therapeutic,» 2013. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648868/>.
- [70] M. Dostert, «Design and Assessment of Anti-Biofilm Peptides: Steps Toward Clinical Application,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.karger.com/Article/FullText/491497#ref18>.
- [71] P. Morici, «Inhibition of Candida albicans Biofilm Formation by the Synthetic Lactoferricin Derived Peptide hLF1-11,» 2016. [En línea]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167470>.
- [72] M. Hentrich, «Central venous catheter-related infections in hematology and oncology: 2012 updated guidelines on diagnosis, management and prevention by the Infectious Diseases Working Party of the German Society of Hematology and Medical Oncology,» 2014. [En línea]. Available: <https://academic.oup.com/annonc/article/25/5/936/156307>.
- [73] W. Michael A. Pfaller, «Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends,» 2006. [En línea]. Available: https://academic.oup.com/cid/article/43/Supplement_1/S3/319177.
- [74] C. Feudtner, «The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis,» 2005. [En línea]. Available: <https://academic.oup.com/cid/article/41/9/1232/277397>.
- [75] J. Fortún, «Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones,» 2012. [En línea]. Available: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2010-micologia.pdf>.
- [76] E. Roscetto, «Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against Candida spp. clinical isolates,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-35530-0>.