

1 Artículo científico

2 **Evaluación de la actividad antifúngica de péptidos derivados de LfcinB (20-30) contra**
3 ***Candida albicans***

4 **Diana Marcela Amado¹, María José Jiménez¹, Yerly Vargas Casanova^{2,3}, Javier Eduardo García Castañeda³**

5 ¹ Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Calle 28 No. 5B-06, Bogotá D.C., Colombia

6 ²

7 ³Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 45 # 26-85, Bogotá D.C., Colombia

8 ³Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas, Instituto Tecnológico del Putumayo, Mocoa 860001, Colombia

9 Resumen: *Candida albicans* representa una amenaza creciente en entornos clínicos debido
10 a su capacidad de desarrollar resistencia a antifúngicos convencionales como el fluconazol.
11 En este estudio se evaluó la actividad antifúngica y el perfil hemolítico de péptidos
12 derivados de la región LfcinB (20-30) RRWQWRMKKLG, particularmente las variantes
13 diméricas modificadas ²⁶[F]-(20-27)₂ y ²⁶[F]-(20-26)₂, frente a tres cepas de *C. albicans* (una
14 cepa ATCC y dos clínicas resistentes al fluconazol). Los ensayos de concentración mínima
15 inhibitoria revelaron que el péptido ²⁶[F]-(20-26)₂ mostró una MIC de 100 µg/mL contra
16 las tres cepas, mientras que ²⁶[F]-(20-27)₂ presentó MIC de 100 µg/mL contra los aislados
17 clínicos. Las curvas de letalidad confirmaron una inhibición sostenida del crecimiento fún-
18 gico a concentraciones de 200 y 100 µg/mL hasta las 48 h. Además, se observó una mayor
19 susceptibilidad de las cepas resistentes al fluconazol en comparación con la cepa ATCC,
20 posiblemente relacionada con diferencias en la composición de la membrana. Por otro
21 lado, ambos péptidos mostraron una baja hemólisis incluso a 200 µg/mL, indicando una
22 baja toxicidad. Estos hallazgos destacan a los péptidos derivados de LfcinB modificados
23 como candidatos prometedores en el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas dirigidas
24 a cepas resistentes

25 **Palabras claves:** *Candida albicans*; Lactoferricina Bovina; Péptidos antimicrobianos; Acti-
26 vidad Antifungica

27

28 **1. Introducción**

29 Las enfermedades fúngicas representan una creciente preocupación en la salud pública a
30 nivel mundial debido a su alta incidencia y mortalidad. Los hongos patógenos suponen
31 una amenaza significativa, especialmente por la limitada cantidad de alternativas tera-
32 péuticas y el aumento en la resistencia a los antifúngicos convencionales (1). Estas enfer-
33 medades han incrementado su prevalencia debido al aumento de pacientes con alteracio-
34 nes del sistema inmunológico. En consecuencia, las infecciones fúngicas invasivas han
35 emergido como una causa importante de morbilidad y mortalidad, estimándose que pro-
36 vocan más de 1,6 millones de muertes anuales (2).

37 *Candida* sp. es una levadura que forma parte del microbiota normal del tracto gastrointes-
38 tinal, genitourinario y piel en humanos. No obstante, en individuos inmunocomprometi-

39 dos, puede convertirse en un patógeno oportunista causando diversas infecciones. El gé-
40 nero *Candida* comprende más de 200 especies (3), de las cuales *C. albicans*, *C. auris*, *C.*
41 *parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei* han sido clasificadas por la Organización
42 Mundial de la Salud (OMS) en 2022 dentro de los grupos de alta y crítica prioridad debido
43 a su patogenicidad y niveles de resistencia antifúngica (4). A nivel mundial, se estima que
44 alrededor de 1.565.000 personas padecen anualmente una infección del torrente sanguí-
45 neo por *Candida*, con una tasa de mortalidad del 63,6% (5). En Estados Unidos, la candi-
46 demia representa la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes que
47 se encuentran en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), así mismo, de las especies a *C.*
48 *albicans* se le atribuye cerca del 60% del total de candidiasis genital, oral, cutánea y es la
49 causa más frecuente de UCI (6)

50 *C. albicans* es el hongo oportunista más frecuente en humanos y es capaz de causar infec-
51 ciones que varían en gravedad, desde afecciones superficiales hasta infecciones invasivas
52 potencialmente letales. Su capacidad para adaptarse a diferentes entornos y aprovechar
53 situaciones de inmunosupresión o alteraciones en la microbiota hace que sea un patógeno
54 relevante en el ámbito clínico (7). Es capaz de producir moléculas que le permiten adhe-
55 rirse e invadir las células del cuerpo humano. El contacto con las células del hospedero
56 puede provocar un cambio de su forma de levadura a hifa, lo que le ayuda a invadir los
57 tejidos a través de un crecimiento dirigido. También libera enzimas llamadas hidrolasas,
58 que le permiten penetrar activamente las células del hospedero. Además, forma biopelí-
59 culas en superficies, lo que aumenta su resistencia a los tratamientos y al sistema inmuni-
60 tario. Su capacidad genética le permite adquirir resistencia a los medicamentos antifúngi-
61 cos con más facilidad (8).

62 La aparición de resistencia a los antifúngicos en especies de *Candida* es una amenaza seria
63 para la salud pública mundial. Según un informe de 2024 alrededor de 1.565.000 personas
64 tienen una infección del torrente sanguíneo por *Candida* o candidiasis invasiva cada año,
65 con 995.000 muertes (63,6%) causada por *Candida* resistente a los medicamentos (9).

66 Los Péptidos antimicrobianos (PAM) contienen entre 10 y 60 aminoácidos, su capacidad
67 anfipática es esencial para su integración en la membrana celular o su penetración en el
68 citosol. Su mecanismo de acción sobre los microorganismos se basa en diversas propieda-
69 des fisicoquímicas como la carga, la estructura, la longitud de la secuencia y la hidrofobi-
70 cidad (10) (11). Los PAM han ganado relevancia debido a sus características ventajosas en
71 comparación con los medicamentos convencionales. Entre sus cualidades se destacan sus
72 múltiples mecanismos de acción, que disminuyen la probabilidad de generar resistencia.
73 Además, al ser parte del sistema inmune, no provocan reacciones adversas graves y pre-
74 sentan un amplio espectro de acción que abarca virus, bacterias, parásitos y hongos, entre
75 otros (12). La Lactoferricina Bovina (LfcinB) es un PAM derivado de la lactoferrina (LF),
76 una glicoproteína de la familia de las transferrinas que se encuentra en fluidos biológicos
77 como la leche, saliva y lágrimas, y en los gránulos de neutrófilos. Esta molécula tiene un
78 amplio espectro de actividad antimicrobiana, antitumoral e inmunológica. Existen dos ti-
79 pos principales de lactoferrinas: LfcinH de origen humano y LfcinB de origen bovino,
80 siendo esta última más eficaz en su acción antimicrobiana y antifúngica.

81 LfcinB, un fragmento peptídico de 25 aminoácidos generado por la hidrólisis de la LFB
82 mediante pepsina gástrica presenta una estructura anfipática en forma de lámina β , con
83 una carga neta de +8 y una proporción del 48% de residuos hidrófobos. Aunque no con-
84 serva la capacidad de unión al hierro propia de la LF, muestra una mayor actividad anti-
85 microbiana (13). Actúa principalmente interactuando con la membrana de los patógenos,

especialmente con moléculas aniónicas de la superficie, lo que provoca la permeabilización o fragmentación de la membrana. LfcinB ha demostrado actividad bacteriostática, bactericida y antiadhesiva contra bacterias Gram positivas y negativas, incluidas cepas resistentes a antibióticos, y presenta un potencial antifúngico frente a una amplia variedad de hongos, como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., y *Aspergillus* spp., entre otros (14) (15). El mecanismo principal de acción de la LfcinB se basa en su interacción electrostática inicial entre las cadenas laterales catiónicas del péptido y los componentes de carga negativa de las membranas celulares. Una vez que la LfcinB se une, los residuos hidrófobos, como el triptófano, provocan la disrupción y desestabilización de la membrana celular (14). En el caso de *C. albicans*, además del daño directo a la membrana plasmática, se ha observado que la LfcinB induce la agregación del material citoplasmático, lo que indica una interacción con las estructuras internas de las blastoconidias. Por otro lado, secuencias análogas como Lfcin15 no solo causan daño en la superficie celular de *C. albicans*, sino que también tienen la capacidad de penetrar en las células, acumularse principalmente en vacuolas y activar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (16)

El estudio de los (PAM) y de la inmunidad innata comenzó en 1922, cuando Alexander Fleming describió la lisozima como una proteína con actividad bactericida (17). A partir de entonces, diversos estudios han demostrado el potencial antimicrobiano de proteínas como la lactoferrina (LF). En 1986, Rainard evidenció su actividad bacteriostática contra cepas de *Escherichia coli* aisladas de mastitis, observando una inhibición significativa con una concentración de 0.1 mg/mL (18). Al ser digerida por la pepsina gástrica, la LF genera un péptido conocido como (LfcinB), al cual se le atribuye un mayor efecto antimicrobiano y anticancerígeno que LF. La actividad antifúngica de LfcinB fue demostrada contra cepas de *C. albicans*, donde se halló que a concentraciones de entre 18 y 150 µg/mL (según la cepa) de LfcinB había un efecto letal para la levadura; este efecto se debe a la unión del péptido a la superficie celular y se evidenció un daño ultraestructural que conducía a la lisis de *C. albicans* (19). Posteriormente, en 1994, Longhi y colaboradores evaluaron el efecto de LfcinB en la invasión de células HeLa por la cepa de *E. coli* HB101 portadora del plásmido pRI203, el cual codifica para un gen de invasión celular; al utilizar concentraciones menores a la bactericida (0.5 µg/mL), la LfcinB inhibió 10 veces la capacidad de internalización de *E. coli* HB101 a las células de la monocapa HeLa (20). Con base a estos estudios ver tabla 1, se seleccionó el segmento y derivados de de LfcinB (20-30) como un potencial agente antifúngico, debido a su notable actividad frente a varias cepas evaluadas.

Péptido	Actividad	Cepas o células	Resultados
LfcinB	Antifúngica	<i>Candida albicans</i>	18 a 150 µg/ml (19)
LfcinB	Antibacteriana	<i>E. coli</i> HB101 (pRI203)	Redujo diez veces la capacidad de invacion celular (20)
RRWQWRMKKLG con sustituciones de K por R	Antibacteriana	<i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>	6.3 y 11.3 µg/ml respectivamente (21)
RRWQWRMKKLG	Antibacteriana	<i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	32.4 y 64.8 µM respectivamente (22)
KCRRWQWRMKK con sustituciones en los extremos N y C termina	Antibacteriana	<i>E. coli</i> (ATCC 25922 y UB 1005), <i>S. typhimurium</i> (C 7731 y ATCC 14028), <i>S. pullorum</i> C 7913, <i>S. enterica</i> subsp. CMCC 50071, <i>S. aureus</i> (ATCC 29213 y ATCC 25923) y <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Bacterias Gram negativas: 4 a 128 µM Bacterias Gram positivas: 8 a 128 µM (23)

(RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx	Antibacteriana	<i>E. coli</i> ATCC 25922 y ATCC 11775, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8, 60, 60 y 15 µM respectivamente (24)
(RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx con sustituciones de 26M	Anticancerígena	HTB-132 y MCF-7, líneas de cáncer de mama	IC50: 13 y 6 µM respectivamente al usar 26 [F] LfcinB (20-30) ₂ (25)
RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx (RRWQWRFKKG) ₂ K-Ahx	Anticancerígena	Líneas celulares de cáncer colorrectal CaCo-2 y HCT-116	IC50: 18 y 7 µM respectivamente (26)

Tabla 1. Antecedentes relevantes del estudio de péptidos derivados de LfcinB

En el presente estudio, se evaluó la actividad antifúngica de péptidos derivados de la secuencia LfcinB (20-30) RRWQWRMKKLG contra una cepa de referencia y dos aislados clínicos de *C. albicans* sensibles y resistentes a (FLC). Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima fungicida (CMF) de cada derivado peptídico, así como su actividad hemolítica.

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y materiales

C. albicans SC5314 fue adquirida a ATCC (Manassas, VA, USA), el aislado clínico *C. albicans* 256 HUSI-PUJ y clínico *C. albicans* 13 HUSI-PUJ fue obtenido de un paciente del Hospital San Ignacio y depositado en el banco de cepas del grupo MICOH-P de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Se emplearon diversos reactivos y materiales para la realización del estudio. Como medios de cultivo, se utilizaron agar dextrosa Sabouraud (SDA) y medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640). Se prepararon soluciones de trabajo con solución salina al 0,85 % y agua destilada estéril. Para la manipulación y procesamiento de muestras, se dispuso de asas de siembra, glóbulos rojos humanos tipo O+ conservados en tubos de 5 mL con anticoagulante EDTA, y Tween 20. Se utilizaron placas de Petri NEST, así como placas de prueba de 96 pocillos con fondo plano y fondo en U. Además, se contó con tubos Falcon de 50 mL para el manejo de glóbulos rojos y de 10 mL para otras soluciones. El equipamiento incluyó pipetas multicanal y micropipetas de distintos rangos (2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL), junto con puntas de (2-20 µL y 200 µL), (100-1000 µL) y (0,1-10 µL). También se utilizaron tubos Eppendorf de 2 mL, una cámara de flujo laminar, un lector ELISA (Expert Plus ASYS) y un espectrofotómetro biochrom.

2.2 Obtención de Péptidos de Lactoferricina bovina

Se utilizaron péptidos derivados de LfcinB (Tabla 1) sintetizados y caracterizados por el grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, utilizando la síntesis en fase sólida estrategia Fmoc/tBu, purificados usando cromatografía RP-SPE y caracterizados por RP-HPLC y MS, siguiendo el protocolo informado (17)

MONÓMEROS		DIMEROS	
CÓDIGO	SECUENCIA	CÓDIGO	SECUENCIA
LfcinB (20-30)	RRWQWRMKKLG	LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRMKKLG) ₂ -K-Ahx
²⁶ [K]	RRWQWRKKKLG	²⁶ [K]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRKKKLG) ₂ -K-Ahx
²⁶ [Nal]	RRWQWR-Nal-KKLG	²⁶ [Nal] ₂	(RRWQWR-Nal-KKLG) ₂ -K-Ahx
²⁶ [Bpa]	RRWQWR-Bpa-KKLG	²⁶ [Bpa] ₂	(RRWQWR-Bpa-KKLG) ₂ -K-Ahx
²⁶ [F]	RRWQWRFKKLG	²⁶ [F] ₂	(RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx
²⁶ [F]- (20-29)	RRWQWRFKKL	²⁶ [F]- (20-29) ₂	(RRWQWRFKKL) ₂ -K-Ahx
²⁶ [F]- (20-28)	RRWQWRFKK	²⁶ [F]- (20-28) ₂	(RRWQWRFKK) ₂ -K-Ahx
²⁶ [F]- (20-27)	RRWQWRFK	²⁶ [F]- (20-27) ₂	(RRWQWRFK) ₂ -K-Ahx
²⁶ [F]- (20-26)	RRWQWRF	²⁶ [F]- (20-26) ₂	(RRWQWRF) ₂ -K-Ahx
LfcinB (20-25)	RRWQWR	LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ -K-Ahx

Nota. Ahx: ácido aminohexanoico, Nal: residuo de (1-naftil)-L-alanina, Bpa: residuo de 4-benzoil-L-fenilalanina. Todos los péptidos fueron obtenidos sobre resina Rink-amida, por lo que en el extremo C-terminal la función es amida (-CONH₂)

Tabla 2. Secuencia de los péptidos derivados de LfcinB (20-30)

2.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó el método de microdilución en caldo según las normas Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (18), en placas de 96 pozos. Se dispensó 100 µL de medio RPMI y 100 µL del péptido los cuales se sometieron a diluciones seriadas en base 1/2, partiendo de una concentración de 200 µg/mL hasta 6.25 µg/mL.

Seguidamente, se preparó el inóculo ajustado. Para esto se partió de un cultivo de *C. albicans* incubado durante 24 horas a 37°C. De dicho cultivo se preparó un inóculo en solución salina al 0.9%, tomando colonias hasta alcanzar una concentración equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (DO: 595 nm 0.082-0.12). Posteriormente se realizaron diluciones 1/50 y 1/20 en medio RPMI con el fin de alcanzar una concentración final de inóculo entre 0.5 – 2.5x 10³ UFC/ml. Se agregó 100 µL del inóculo a todos los pozos, excepto aquellos destinados a controles.

La placa se incubó a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación se realizó una lectura visual a las 24 y 48 horas con ayuda del espejo invertido y se midió las absorbancias por medio del espectrofotómetro (DO 595 nm). Para los controles negativos (C-) se utilizó

200 μL de RPMI, agregando 100 μl de agua destilada y 100 μL de levadura, para los controles positivos (C+) se empleó un antifungico (FLC) a la CMI dictada por el CLSI para la cepa ATCC junto con 100 μL de levadura. Para el control técnico se utilizaron 200 μL de RPMI, y para el control de crecimiento, 100 μL de RPMI más 100 μL de levadura (19) (20).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P2:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P2:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P2:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P3:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P3:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P3:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P3:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
B	P1:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$									
C	P1:50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:50 $\mu\text{g}/\text{mL}$									
D	P1:25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:25 $\mu\text{g}/\text{mL}$									
E	P1:12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$									
F	P1:6.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:6.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	P1:6.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$									
G	CC	CC	CC	C+	C+	C+	C-	C-	C-	CT	CT	CT
H												

Figura 1. Distribución de las diluciones del péptido en la placa multipozos para la determinación de la CMI.

2.3 Concentración mínima fungicida (CMF)

Posterior a la lectura de la absorbancia en el ensayo de CMI, se realizó un subcultivo en placas de agar Sabouraud a partir de las diluciones. La acción fungicida se definió como la concentración mínima del péptido en la cual no se evidenció crecimiento fúngico. Cada ensayo se realizó por triplicado.

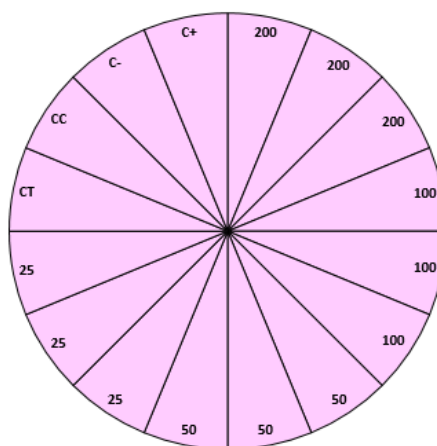


Figura 2. Distribución caja de Petri para CMF. Los números indican las concentraciones del péptido en $\mu\text{g/mL}$. Controles: Control positivo (+), Control negativo (-), Control de crecimiento (CC), Control de técnica (CT) .

2.4 Determinación de la cinética de la actividad antifúngica (Curvas de letalidad)

Se realizó este ensayo con el fin de determinar la acción del péptido sobre la levadura a través del tiempo y para realizarla se seleccionaron los péptidos con mayor actividad antifúngica para cada cepa en estudio. Para ello se hizo un ensayo basado en el método descrito (21), con algunas modificaciones. Los péptidos que tuvieron actividad se diluyeron en medio RPMI 1640 y se evaluaron en un rango de concentraciones equivalentes a 0.25 MIC, la mitad de la MIC (0.5 MIC), la MIC y 2 veces la MIC determinada para cada cepa.

Los aislados fueron subcultivados en agar SBD y se preparó un inóculo ajustado a $0,5\text{--}2,5 \times 10^3$ UFC/mL en medio RPMI 1640. Posteriormente, se añadieron $100 \mu\text{L}$ de esta suspensión a una placa de 100 pocillos que contenía diluciones seriadas de los péptidos en evaluación. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas y se realizaron mediciones de las absorbancias a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 horas, como control negativo se empleó medio RPMI y como control positivo se utilizó medio RPMI con $100 \mu\text{L}$ de inóculo. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software)

2.5 Ensayos de hemólisis

Con el fin de determinar el efecto citotóxico de los péptidos sintetizados derivados de LfcinB (20-30), se evaluó la actividad hemolítica de aquellos péptidos que presentaron mayor actividad antifúngica, basándose en el protocolo descrito por Solarte (32)

Se utilizó sangre total en EDTA, la cual fue centrifugada durante 5 minutos a 4500 rpm para obtener el botón de glóbulos rojos. Estos fueron lavados tres veces con SS y posteriormente se realizó una suspensión al 4% de glóbulos rojos. Para evaluar el péptido se hicieron diluciones seriadas de 200 a $6,25 \mu\text{g/mL}$ y se mezclaron $100 \mu\text{L}$ de cada dilución de péptido con $100 \mu\text{L}$ de la suspensión de glóbulos rojos al 4% en placas de 96 pozos de fondo redondo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 2 horas y posteriormente centrifugadas a 4500 rpm por 5 minutos, una alícuota del sobrenadante se dispensó en una placa de 96 pozos de fondo plano para leer la absorbancia a 540 nm. Como controles negativo y positivo se utilizaron solución salina y agua destilada respectivamente. Finalmente se determinó el porcentaje de hemólisis basado en la siguiente fórmula (32).

$$\%Hemólisis = \frac{Abs\ muestra - Abs\ control\ negativo}{Abs\ control\ positivo - Abs\ control\ negativo} * 100\%$$

3. Resultados y discusión

Los péptidos utilizados en este trabajo contienen secuencias derivadas de LfcinB (20-30). La actividad antifúngica se evaluó inicialmente frente a la cepa de referencia *C. albicans* ATCC SC5314 sensible al FLC y los aislado clínicos *C. albicans* HUSI-PUJ 256 y *C. albicans* HUSI-PUJ 13, que son resistentes a FLC.

3.1 Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima fungicida

Los péptidos fueron agrupados en dos familias y evaluados contra las tres cepas de *C. albicans*; cada familia está definida por la secuencia y formado por el monómero y dímero. La MIC es considerada como la menor concentración de péptido requerida para inhibir el crecimiento fúngico

Código	<i>C.albicans</i> ATCC SC5314		<i>C.albicans</i> PUJ-HUSI 13		<i>C.albicans</i> PUJ-HUSI 256	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
LfcinB (20-30)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [K]	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [Nal]	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [Bpa]	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [F]	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [F]- (20-29)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [F]- (20-28)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [F]- (20-27)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [F]- (20-26)	200	200	200	200	200	200
LfcinB (20-25)	>200	>200	>200	>200	>200	>200

Tabla 3. Valores de los efectos antifungicos en (µg/mL) para los péptidos de la familia LfcinB (20-30) RRWQWRMCKLG contra *C.albicans* ATCC SC5314 y *C.albicans* PUJ-HUSI 13 y 256

Código	<i>C.albicans</i> ATCC SC5314		<i>C.albicans</i> PUJ-HUSI 13		<i>C.albicans</i> PUJ-HUSI 256	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
LfcinB (20-30) ₂	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [K]- LfcinB (20-30) ₂	200	200	200	200	200	200
²⁶ [Nal] ₂	200	200	200	200	200	200
²⁶ [Bpa] ₂	>200	>200	200	200	200	200
²⁶ [F] ₂	200	200	200	200	200	200
²⁶ [F]- (20-29) ₂	>200	>200	>200	>200	>200	>200
²⁶ [F]- (20-28) ₂	200	200	200	200	200	200
²⁶ [F]- (20-27) ₂	200	200	100	100	100	100
²⁶ [F]- (20-26) ₂	100	100	100	100	100	100
LfcinB (20-25) ₂	>200	>200	>200	>200	>200	>200

Tabla 4. Valores de los efectos antifungicos en (µg/mL) para los péptidos de la familia LfcinB (20-30) RRWQWRMCKLG₂-K-Ahx contra *C.albicans* ATCC SC5314 y *C.albicans* PUJ-HUSI 13 y 256.

243 Los resultados muestran que la mayoría de los péptidos evaluados presentaron valores
244 de CMI superiores a 200 µg/mL en las tres cepas de *C. albicans*, lo que sugiere una baja
245 actividad antifúngica en las condiciones evaluadas. Por otro lado, algunas modificaciones
246 en las secuencias de los péptidos generaron ligeros cambios en la actividad antifúngica.
247 En el caso de los péptidos diméricos, se observó que el péptido ²⁶[F]-(20-27)₂ presentó una
248 MIC de 100 µg/mL frente a *C. albicans* Puj-Husi 13 y Puj-Husi 256, mientras que el péptido
249 ²⁶[F]-(20-26)₂ mostró una CMI de 100 µg/mL en las tres cepas evaluadas, lo que indica un
250 incremento en la actividad antifúngica en comparación con los demás péptidos. Estos ha-
251 llazgos concuerdan con investigaciones previamente realizadas (33).

252 Los péptidos ²⁶[F]-(20-27)₂ y ²⁶[F]-(20-26)₂, han demostrado una actividad antifúngica me-
253 jorada frente a cepas de *C. albicans*. Esta mejora se atribuye a un equilibrio óptimo entre
254 carga positiva (residuos de arginina [R, Arg] y lisina [K, Lys]), residuos hidrofóbicos (fe-
255 nilalanina [F, Phe] y triptófano [W, Trp]), factores clave en la interacción con las membra-
256 nas celulares fúngicas. Estudios han demostrado que la presencia de residuos de Arg y
257 Trp es esencial para la actividad antifúngica de estos péptidos. La sustitución de estos
258 aminoácidos por alanina reduce significativamente la actividad antifúngica, lo que resalta
259 la importancia de la carga positiva y la hidrofobicidad en la interacción con la membrana
260 de *C. albicans* (34). Además, la estructura dimérica de estas secuencias ha mostrado mejo-
261 rar su actividad antifúngica (34).

262 Teniendo en cuenta el mecanismo de acción propuesto para LfcinB, se ha sugerido que
263 sus residuos cargados positivamente interactúan electrostáticamente con componentes
264 aniónicos de la superficie fúngica, como fosfolípidos, facilitando la unión inicial del pép-
265 tido a la célula. Posteriormente, los residuos hidrofóbicos interactúan con la bicapa lipí-
266 dica de la membrana fúngica, rica en ergosterol, lo que puede conducir a una desestabili-
267 zación de la membrana, formación de poros o incluso lisis celular. Este mecanismo ha sido
268 observado en estudios previos donde LfcinB y sus derivados generaron daño ultraestruc-
269 tural en cepas de *C. albicans*, evidenciado mediante microscopía electrónica (35). Por tanto,
270 se plantea que la posición 26 de la secuencia LfcinB 20-30 debe estar ocupada por un resi-
271 duo de naturaleza hidrofóbica con características estructurales particulares, que permitan
272 una interacción efectiva con la membrana fúngica y que potencian la actividad antifúngica
273 del péptido (36).

274 Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos derivados de LfcinB (20–30)₂ presen-
275 taron mayor actividad antifúngica frente a cepas clínicas de *C. albicans* resistentes al flu-
276 conazol que frente a la cepa de referencia ATCC. Esta diferencia puede explicarse por
277 diversas adaptaciones estructurales y funcionales que desarrollan las cepas resistentes a
278 antifúngicos azólicos. En particular, se ha descrito que la resistencia al fluconazol conlleva
279 modificaciones en la composición lipídica y en la organización de la membrana plasmá-
280 tica, así como en la cantidad y distribución de ergosterol, lo cual puede aumentar la per-
281 meabilidad de la membrana o exponer componentes aniónicos que favorecen la interac-
282 ción electrostática con péptidos catiónicos como los derivados de LfcinB (37). Estas altera-
283 ciones, lejos de conferir una ventaja frente a los péptidos antimicrobianos, pueden hacer
284 que la membrana fúngica sea más vulnerable a la disrupción inducida por estos compues-
285 tos, lo que explicaría su mayor efectividad en cepas resistentes. (38)

286 Estos hallazgos sugieren que la optimización de la secuencia peptídica LfcinB 20-30, me-
287 diante la incorporación de residuos específicos y modificaciones estructurales como la di-
288 merización, puede potenciar la actividad antifúngica.

3.2 Evaluación de la actividad cinética antifúngica (Curvas de letalidad)

Las curvas de letalidad tienen el objetivo de evaluar el comportamiento de las levaduras tratadas con el péptido a través del tiempo y de esta manera determinar si el péptido ejerce una actividad fungistática o fungicida. Se seleccionaron los péptidos que presentaron la mayor actividad antifúngica según los resultados obtenidos en la tabla 4, y se evaluó su cinética de acción frente a la cepa. Para ello, se determinó el crecimiento fúngico en presencia del péptido en concentraciones de 200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$, correspondientes a $2\times\text{CMI}$, CMI , $0.5\times\text{CMI}$ y $0.25\times\text{CMI}$ respectivamente. Las mediciones se realizaron a intervalos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 horas para observar la evolución del crecimiento en el tiempo.

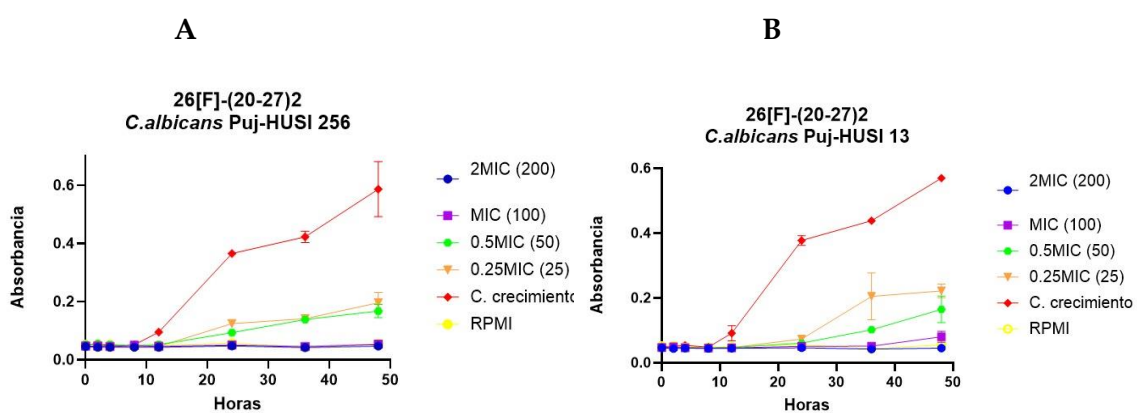


Figura 3. Curvas de letalidad del péptido $^{26}\text{[F]}-(20-27)_2$ contra A. *C. albicans* Puj-Husi 256, B. *C. albicans* Puj-Husi 13. Se representa con línea azul la concentración de $2\times\text{MIC}$, línea morada MIC , línea verde $0.5\times\text{MIC}$, línea naranja $0.25\times\text{MIC}$, línea roja el control de crecimiento y línea amarilla el control con RPMI.

Se observa en la Figura 3, una clara inhibición del crecimiento fúngico dependiente de la concentración y del tiempo causada por el péptido $^{26}\text{[F]}-(20-27)_2$. En ambas cepas, las concentraciones correspondientes a $1\times\text{MIC}$ (100 $\mu\text{g/mL}$) y $2\times\text{MIC}$ (200 $\mu\text{g/mL}$) mostraron una inhibición completa o casi completa del crecimiento hasta las 48 horas, evidenciado por valores de absorbancia cercanos a 0, similares al control negativo (medio RPMI). Esto indica una actividad fungicida sostenida del péptido a estas concentraciones. Por el contrario, las concentraciones subinhibitorias ($0.5\times\text{MIC}$ y $0.25\times\text{MIC}$) permitieron un crecimiento progresivo de la levadura, aunque menor en comparación con el control de crecimiento sin péptido.

Este patrón sugiere que el péptido $^{26}\text{[F]}-(20-27)_2$ tiene una acción dependiente de la dosis, y su efecto letal se manifiesta de manera más efectiva a concentraciones iguales o superiores a la CMI. La inhibición marcada observada puede atribuirse al mecanismo de acción propuesto para LfcinB, donde los residuos catiónicos interactúan con componentes de carga negativa en la membrana de *C. albicans*, facilitando la inserción de residuos hidrofóbicos y la posterior disrupción de la membrana celular (39).

Además, se puede destacar que la cepa PUJ-HUSI 256 mostró una respuesta ligeramente más sensible que la PUJ-HUSI 13 a concentraciones intermedias, lo que puede estar relacionado con diferencias en la composición lipídica o en la carga superficial de la membrana de cada cepa, lo cual puede modular la interacción con el péptido.

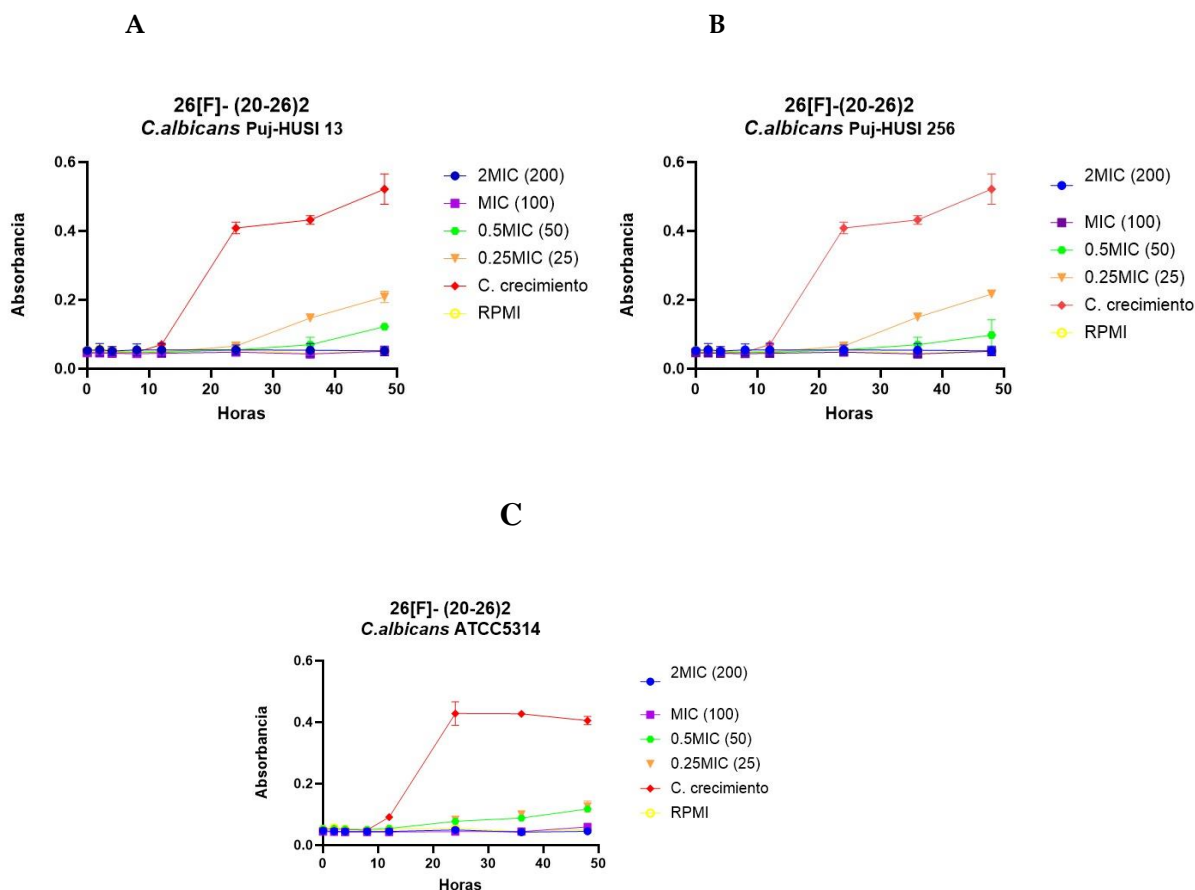


Figura 4. Curvas de letalidad del péptido $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-26)}_2$ contra **A.** *C. albicans* PUJ-HUSI 13, **B.** *C. albicans* PUJ-HUSI 256, **C.** *C. albicans* SC5314 ATCC. Se representa con línea azul la concentración de $2\times\text{MIC}$, línea morada MIC , línea verde $0.5\times\text{MIC}$, línea naranja $0.25\times\text{MIC}$, línea roja el control de crecimiento y línea amarilla el control con RPMI

Se observa en la Figura 4 que el péptido $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-26)}_2$ presenta una inhibición del crecimiento fúngico dependiente de la concentración y el tiempo. A concentraciones de $1\times\text{MIC}$ y $2\times\text{MIC}$, el crecimiento fue prácticamente nulo hasta las 48 horas, con valores de absorbancia, similares al control negativo, lo que indica una actividad fungicida sostenida. En cambio, a concentraciones subinhibitorias ($0.5\times\text{MIC}$ y $0.25\times\text{MIC}$), el crecimiento fue progresivo, aunque menor comparada con el control sin tratamiento.

Los datos muestran una inhibición significativa del crecimiento en las tres cepas a concentraciones iguales o superiores a la CMI (100 y 200 $\mu\text{g/mL}$), lo cual indica que ambos péptidos en su forma dimérica ejercen un efecto letal dependiente de la dosis y el tiempo. Sin

embargo, se observa que las cepas clínicas resistentes al fluconazol (Puj-HUSI 13 y 256) muestran una mayor sensibilidad a las concentraciones del péptido, evidenciada por una menor absorbancia incluso a concentraciones subinhibitorias (0.25 y 0.5×MIC), en comparación con la cepa ATCC.

Este comportamiento podría estar relacionado con diferencias en la composición y estructura de la membrana plasmática de las cepas resistentes. Se ha reportado que cepas resistentes a fluconazol presentan alteraciones en la ergosterol y un aumento en la exposición de fosfatidilserina y otros fosfolípidos aniónicos en la membrana externa, lo que podría favorecer la interacción electrostática con péptidos catiónicos como LfcinB y sus derivados (40). Además, se ha propuesto que estas cepas pueden presentar modificaciones en la fluidez de la membrana que aumentan su permeabilidad, haciendo que sean más susceptibles a mecanismos de acción que impliquen disrupción de la bicapa lipídica, como ocurre con LfcinB.

Las curvas de letalidad evidencian que los péptidos evaluados presentan actividad fungicida a concentraciones iguales o superiores a la CMI (100 µg/mL) y especialmente a 2×CMI (200 µg/mL), ya que en estos puntos se observa una reducción y absorbancia cercana a 0, lo cual indica muerte celular completa o casi completa hasta las 48 horas de incubación. Esta inhibición total del crecimiento fúngico, sin recuperación posterior, confirma un efecto letal sobre las células de *C. albicans*. Por otro lado, a concentraciones subinhibitorias como 0.5×CMI (50 µg/mL) y 0.25×CMI (25 µg/mL), se observa una disminución inicial del crecimiento, seguida de una recuperación progresiva en el tiempo. Este comportamiento corresponde a una actividad fungistática, donde el péptido inhibe temporalmente la proliferación fúngica sin causar la muerte celular total. Se permiten concluir que la acción de los péptidos son dependientes de la concentración, y que el paso de actividad fungistática a fungicida se da a partir de concentraciones iguales o superiores a la CMI

Estos resultados son consistentes con investigaciones previas que han demostrado el potencial de los péptidos derivados de LfcinB como agentes antifúngicos. En 2024 se reportó que los péptidos derivados de LfcinB presentaron actividad significativa frente a *C. albicans* y *C. auris*, tanto en cepas sensibles como resistentes a fluconazol (25). En 2022 se diseñó péptidos quiméricos ramificados derivados de LfcinB y Buforina II, encontrando que el motivo mínimo (RRWQWR)₂-K-Ahx-RLLRLLR presentaba una notable actividad antifúngica contra cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol. Esto refuerza el potencial terapéutico de los péptidos derivados de LfcinB como alternativa frente a infecciones resistentes, concordando con la eficacia observada en las cepas clínicas (26). Adicionalmente, en 2019 se demostró que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} RWQWRWQWR redujo significativamente la formación de biopelículas de *C. auris* resistentes a fluconazol, indicando que estos péptidos no solo inhiben el crecimiento fúngico, sino también su capacidad de adherencia y persistencia, aspectos clave en infecciones crónicas. Este comportamiento puede correlacionarse con la reducción de crecimiento observada en nuestros ensayos a las 24 y 48 horas (27).

3.3 Evaluación de la toxicidad hemolítica

El ensayo de hemólisis fue realizado para determinar la seguridad y potencial toxicidad de los péptidos seleccionados, se realizó un ensayo de hemólisis utilizando eritrocitos humanos. Este ensayo se llevó a cabo con los péptidos ²⁶[F]-(20-27)₂ y ²⁶[F]-(20-26)₂, los cuales mostraron la mayor actividad antifúngica en los experimentos previos. Se empleó una concentración de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml.

		% de Hemólisis de los péptidos					
		Concentración del péptido (µg/mL)					
Código	Secuencia	6.25	12.5	25	50	100	200
²⁶ [F]-(20-27) ₂	(RRWQWRFK) ₂ -K-Ahx	0	0.2	0.6	0.6	0.8*	0.9
²⁶ [F]-(20-26) ₂	(RRWQWRF) ₂ -K-Ahx	0.1	0.4	0.4	0.8	0.9*	1.1

Nota: * Efecto hemolítico a la concentración de la MIC

Tabla 5. Efecto hemolítico de los péptidos diméricos derivados de LfcinB (20-30)

Los resultados del efecto hemolítico para los péptidos ²⁶[F]-(20-27)₂ y ²⁶[F]-(20-26)₂ muestran niveles de hemólisis muy bajos incluso a concentraciones elevadas (hasta 200 µg/mL), sin superar el 1.1%. Este perfil indica una baja citotoxicidad frente a eritrocitos humanos, lo cual es favorable para su posible aplicación terapéutica. La ligera hemólisis observada a concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL (0.8–1.1%) es considerada clínicamente no significativa, ya que se encuentra por debajo del umbral de 5% que comúnmente se usa como referencia de seguridad en estudios preclínicos (43)

Estos hallazgos sugieren que los péptidos poseen un perfil de citotoxicidad favorable, al no generar daño en células humanas como los eritrocitos. Esta característica es esencial en el diseño y selección de agentes antifúngicos, ya que un alto grado de selectividad hacia las células fúngicas, sin comprometer la viabilidad de las células humanas, es un requisito fundamental para su desarrollo como potenciales candidatos terapéuticos. La falta de hemólisis observada también respalda la compatibilidad de estos péptidos y refuerza su posible aplicación clínica en futuras investigaciones.

3.4. Índice terapéutico

Finalmente, se calculó el índice terapéutico (IT) de los péptidos evaluados, utilizando como dosis efectiva la concentración mínima inhibitoria (MIC) determinada para cada cepa. En el caso del péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-26)₂, se consideraron las MIC obtenidas frente a *C. albicans* ATCC 5314, PUJ-HUSI 13 y PUJ-HUSI 256. Para el péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-27)₂, se utilizaron las MIC correspondientes a *C. albicans* PUJ-HUSI 13 y PUJ-HUSI 256.

$$\text{Índice terapéutico} = \text{TD}_{50} / \text{ED}_{50}$$

Los péptidos evaluados presentaron IT igual a 2, este valor sugiere que los péptidos poseen una actividad antifúngica efectiva con baja toxicidad hemolítica, lo que los posiciona como candidatos prometedores para su desarrollo como agentes antifúngicos alternativos.

Péptido	Secuencia	Cepa <i>C. albicans</i>	IT
$^{26}\text{[F]-LfcinB (20-27)}_2$	(RRWQWRFK) ₂ -K-Ahx	PUJ-HUSI 13	2
		PUJ-HUSI 256	2
$^{26}\text{[F]-(20-26)}_2$	(RRWQWRF) ₂ -K-Ahx	PUJ-HUSI 13	2
		PUJ-HUSI 256	2
		ATCC5314	2

Tabla 6. Índice terapéutico de los péptidos $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-27)}_2$ y $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-26)}_2$

4. Conclusiones

Los resultados de este estudio evidencian que modificaciones como la dimerización de la secuencia LfcinB (20-30) y fragmentos, mejoran la actividad contra cepas de referencia y aislados clínicos de *C. albicans*. En particular, los péptidos $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-27)}_2$ y $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-26)}_2$, mostraron actividad antifúngica significativa frente a cepas clínicas resistentes a fluconazol, sin inducir toxicidad hemolítica, lo que sugiere un buen perfil de selectividad. Las curvas de letalidad confirmaron esta observación, mostrando que tanto el péptido $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-27)}_2$, como el $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-26)}_2$, son efectivos en concentraciones iguales o superiores a su CMI, con efectos fungicidas durante 48 horas. Las concentraciones más bajas ($0.5 \times \text{CMI}$ y $0.25 \times \text{CMI}$) no lograron mantener esta inhibición, lo cual señala una relación dosis-dependiente y refuerza la necesidad de mantener una concentración mínima efectiva para lograr un efecto prolongado. Esta dinámica fue especialmente notoria en las cepas clínicas, donde el tratamiento con estos péptidos inhibió por completo el crecimiento durante el período de monitoreo, mientras que los controles mostraron crecimiento progresivo. Finalmente, estos hallazgos apoyan el potencial de estos péptidos como candidatos promisorios para el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas, y resaltan la importancia de continuar con estudios preclínicos que validen su eficacia y seguridad in vivo.

5. Referencias:

- Gómez BL. Las infecciones fúngicas: una amenaza creciente. Biomedica Revista del Instituto Nacional de Salud. 2023 agosto; 43(11-16).
- F. B. Prevalencia global y multinacional de enfermedades fúngicas: precisión estimada. J Fungi. 2017 Diciembre ; 3(57).
- Montes K OB. Identificación de especies de Candida a partir de muestras clínicas en un hospital terciario de Honduras. Pathogens. 2019 noviembre; 8(237).
- WHO. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022.
- D WD. Global incidence and mortality of severe fungal disease. The Lancet infectious diseases. 2024 Enero.

6. Bedout C GB. Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infection*. 2011 Sep.
7. infecciosas. Ca:Fdddsdpds. Public. 2024.
8. NyKA J. existencia a fármacos en especies patógenas de Candida, Desarrollos en microbiología y biotecnología aplicadas, Técnicas microbianas avanzadas en agricultura, medio ambiente y gestión de la salud. *Prensa academica*. 2023; 17(293-303).
9. Prof David W Denning F. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *THE LANCET Infectioud Diseases*. 2024.
10. Huan Y. KQ M. Péptidos antimicrobianos: clasificación, diseño, aplicación y progreso de la investigación en múltiples campos. *Front. Microbiol*. 2020.
11. Mishra AK CJ M. Péptidos antimicrobianos ricos en triptófano y ricos en prolina. *Moleculas*. 2018.
12. Paretyre p. Péptidos antimicrobianos: premisas y promesas. *Antimicrob*. 2017.
13. WYLZZEpGAz WL. Design of bovine lactoferricin-derived peptide and its expression and activity in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res. .*
14. SRTKAZRR. SM. Bovine Lactoferrin and Current Antifungal Therapy Against *Candida Albicans*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Indian Journal of Dermatology/Indian journal of dermatology*. 2023 Jan; 68(725).
15. Lactoferrin FSE.. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial. 2003 Nov.
16. GML. R. 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 PONTIFIC. 2019.
17. Wang B,TYP,BE,&AB. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*., 2017.
18. Rainard P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic. 1986; 11(4).
19. Bellamy W,WH,TM,KK,SS. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and*. 1993; 182(2).

20. Longhi C,CMP,BW,SL,&VP. Effect of lactoferricin B, a pepsin-generated peptide of bovine lactoferrin, on Escherichia coli. *Medical Microbiology and Immunology*. 1194.
21. Kang JH,LMK,KKL,&HKS.. Structure–biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin.. *International Journal of Peptide and Protein Research*. .
22. León Calvijo MA,LCAL,ARGA,RPJE,G. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against Escherichia coli ATCC 25922 and. *BioMed*. 2015.
23. Fleece ME,PS,MAJ,&HER. Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in Escherichia coli. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2018.
24. Vargas Casanova Y,RMAV,CKJ,LCAL,M. Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or. 2019.
25. nsuasty Cepeda DS,BCAC,OZA,LMJ. Peptides Derived from (RRWQWRMKKLG)2-K-Ahx Induce Selective Cellular Death. in Breast Cancer Cell Lines through Apoptotic Pathway. *International Journal of*. 2020.
26. Barragán-Cárdenas AC,ICDS,CMKJ,LJ,OZA,UPA,RMZJ,&Gc. LfcinB-Derived Peptides: Specific and punctual change of n amino acid in monomeric and dimeric sequences increase selective cytotoxicity in. 2022.
27. Barragán Cárdenas A, Insuasty-Cepeda D, Cárdenas-Martínez K, López-Meza J, Ochoa-Zarzosa A, Umaña-Pérez A, et al. Péptidos derivados de LfcinB: el cambio específico y puntual de un aminoácido en secuencias monoméricas y diméricas aumenta la citotoxicidad selectiva en líneas celulares de cáncer de colon. *Árabe. J. química*. 2022; 15.
28. NyKA J. existencia a fármacos en especies patógenas de Candida, Desarrollos en microbiología y biotecnología aplicadas, Técnicas microbianas avanzadas en agricultura, medio ambiente y gestión de la salud. *Prensa academica*. 2023 17;(293-303).
29. JPLaMS L. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. *Virulence*. 2021 Agosto; 13.
30. PGP TPM. Invasive Candidiasis.. *Infect Dis Clin North*. Epub. 2016.

31. Pemán ECyJ. Curvas de letalidad en antifúngicos. 1 Unidad de Bacteriología Experimental, Centro de Investigación y 2Servicio de Microbiología. Hospital Universitario La Fe. Valencia, España Rev Iberoam Micol. 1999; 16(82-85).
32. Quindío GATR1dibUd. PRUEBA DE HEMOLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS. Grupo De Inmunología Molecular GYMOL Universidad Del Quindio. 2017.
33. Torres MM. Péptidos quiméricos derivados de lactoferrina bovina y buforina II: actividad antifúngica contra cepas de referencia y aislados clínicos de *Candida* spp. MDPI. 2022.
34. Yerly Vargas CPBAXHGMJLC. Combining the Peptide RWQWRWQWR and an Ethanolic Extract of *Bidens pilosa* Enhances the Activity against Sensitive and Resistant *Candida albicans* and *C. auris* Strains. MDPI. 2023.
35. Bellamy W TMYKWHKKTm. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin.. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1121(1-2).
36. Hwang PM ZNSXACVH. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin.. *Biochemistry*. 1998.
37. Cowen LE SDHSRPPD. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015.
38. Shapiro RS RNCL. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2).
39. Hancock REW SH. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006; 24.
40. Mukherjee PK SDHCGM. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol*. 2005.
41. Casanova YV. Evaluación de la actividad antifúngica de péptidos sintéticos derivados de Lactoferrina Bovina solos o en combinación con extractos de *Bidens pilosa*. Dialnet. 2024.
42. Rubio L. Efecto del péptido LfcinB (21-25)pal en biopelículas de *Candida auris*. *Revista Jveriana*. 2019.
43. Radzikowski C DAKAea. Evaluation of hemolytic activity of selected antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(22).

44. OSTaCF SB. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*. 2020 May.
45. Neil AR Gow 1 BH. Importancia de la pared celular de *Candida albicans* durante el comensalismo y la infección. *PubMed*. 2012 Mayo.
46. François L. Mayer 1 DW,BH. Mecanismos de patogenicidad de *Candida albicans*. *PubMed*. 2013 Feb.
47. Bellamy W TMYK. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*. 1992; (1-2):130–6.
48. Wang G LXWZA. the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*. 2010; 37.
49. Aguilera O QBCGea. Antifungal effect of modified lactoferricin B(20–30) peptides on *Candida tropicalis* and interaction with ergosterol.. *peptides*. 2019; 113.
50. van der Weerden NL BMAM. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell Mol Life*. 2013.

454

455

456

457

458

459

460