

Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol frente al tratamiento convencional en un modelo *in vitro* de histoplasmosis

Antifungal effect of an itraconazole nanobioconjugate compared to conventional treatment in an *in vitro* model of histoplasmosis



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

1 8 0 3

Daniela López Buitrago

Trabajo de investigación para optar por el título de

Magister en Microbiología y Bioanálisis

Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Marzo 2022

Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol frente al tratamiento convencional en un modelo *in vitro* de histoplasmosis

Daniela López Buitrago

**Trabajo de investigación para optar por el título de
Magister en Microbiología y Bioanálisis**

Tutora: Susana Pamela Mejía de los Ríos, MSc, Candidato a Doctor

Comité tutorial

Luz Elena Cano Restrepo, PhD

Juan David Puerta Arias, MSc, Candidato a Doctor

Jaiberth Cardona Arias, MSc, Candidato a Doctor

Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Marzo 2022

A mi padre Humberto, el ángel que me guía y me llena de fortaleza para seguir adelante, sus recuerdos y enseñanzas son la motivación para continuar en este anhelado proceso

A mi madre Leonor, porque gracias a su amor y apoyo incondicional he logrado avanzar y convertirme en la profesional que soy ahora

A mi hermana Luz Adriana, por sus consejos y gran ejemplo de empatía y responsabilidad, pilares en la construcción de mi vida personal y profesional

A mi tutora Susana Pamela Mejía y a los miembros del comité tutorial por su tiempo, dedicación y acompañamiento durante todo mi proceso de formación

A la doctora Luz Elena Cano por confiar en mí y abrirme las puertas del grupo de Micología Médica y Experimental

A mis compañeros de trabajo, integrantes del grupo de Micología Médica y Experimental, por su amistad, unión y sobre todo por estar siempre dispuestos a colaborar desinteresadamente

Tabla de contenido

Capítulo I	1
1.1 Resumen	1
1.2. Marco teórico	3
1.2.1. Definición de histoplasmosis y descripción del agente etiológico	3
1.2.2. Epidemiología de la histoplasmosis	5
1.2.3. Formas clínicas de la histoplasmosis	7
1.2.4. Inmunopatogénesis de la histoplasmosis	9
1.2.5. Tratamiento de la histoplasmosis	14
1.2.5.1. <i>Limitaciones de las terapias actuales</i>	14
1.2.6. La nanomedicina como alternativa terapéutica	15
1.2.6.1. <i>Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para el tratamiento de la histoplasmosis</i>	17
1.3. Planteamiento del problema	20
1.4. Hipótesis	20
1.5. Objetivos	21
1.5.1. Objetivo general	21
1.5.2. Objetivos específicos	21
1.6. Referencias	22
Capítulo II	32
2.1. Trabajo de investigación: Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol frente al tratamiento convencional en un modelo <i>in vitro</i> de histoplasmosis	32
2.2. Resumen	32
2.3. Abstract	32
2.4. Introducción	34
2.5. Materiales y métodos	37
2.5.1. <i>Procedimientos de laboratorio y condiciones de cultivo</i>	37
2.5.2. <i>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i>	39
2.5.3. <i>Evaluación de la citotoxicidad del nanobioconjugado en macrófagos</i>	40
2.5.4. <i>Estudio de la actividad antimicótica del nanobioconjugado en un modelo celular in vitro</i>	40

2.5.5. Especificidad del nanobioconjugado	41
2.5.6. Análisis de PCR en tiempo real (qPCR)	42
2.5.7. Análisis estadístico	43
2.6. Resultados	44
2.6.1. Actividad antimicótica del nanobioconjugado	44
2.6.2. Biocompatibilidad del nanobioconjugado.....	45
2.6.3. Efecto de la actividad antimicótica del nanobioconjugado en macrófagos detectado por UFC	46
2.6.4. Especificidad del nanobioconjugado	47
2.6.5. Efecto inmunomodulador del nanobioconjugado.....	48
2.7. Discusión	50
2.8. Financiación	57
2.9. Conflictos de interés	58
2.10. Referencias	58
3. Conclusiones	65
4. Perspectivas	66
5. Artículos en preparación	66
6. Presentación en eventos	66

Índice de figuras

Capítulo I

Figura 1. Morfotipos de <i>H. capsulatum</i>	4
Figura 2. Áreas estimadas con histoplasmosis en el mundo	6
Figura 3. Formas clínicas de la histoplasmosis (HPM)	7
Figura 4. Interacciones de <i>H. capsulatum</i> con fagocitos del hospedero	12

Capítulo II

Figura 1. Modelo experimental	37
Figura 2. Comparación de la actividad antimicótica de las diferentes formulaciones de ITZ contra <i>H. capsulatum</i>	44
Figura 3. Citotoxicidad de ITZ encapsulado en nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo F4/80 en macrófagos J774A.1	45
Figura 4. Efecto antifúngico de ITZ encapsulado en NPs funcionalizadas con el anticuerpo F4/80 para eliminar levaduras de <i>H. capsulatum</i> , en co-cultivo con macrófagos J774A.1	47
Figura 5. Endocitosis de NPs con Rojo de Nilo encapsulado, funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 en co-cultivo de macrófagos J774A.1 con levaduras de <i>H. capsulatum</i>	48
Figura 6. Análisis por qPCR de la expresión de ARNm de citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias en macrófagos J774A.1 infectados con levaduras de <i>H. capsulatum</i>	50

Índice de tablas

Capítulo I

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>H. capsulatum</i>	13
--	----

Capítulo II

Tabla 1. Secuencia de primers	44
--	----

Abreviaturas

AMB: Anfotericina B

BHI: Brain Heart Infusion

CAT: Catalasa

CD: Cluster of differentiation

CIB: Corporación para Investigaciones Biológicas

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CLRs: C-type lectin receptors

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

EROS: Especies reactivas de oxígeno

FLC: Fluconazol

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HDP: Histoplasmosis Diseminada Progresiva

HPM: Histoplasmosis

IFN- γ : Interferon Gamma

Ig: Immunoglobulin

IL: Interleukin

ITZ: Itraconazol

L: Levadura

M: Micelio

MTT: Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio

NO: Nitric oxide

NPs: Nanopartículas

PAMPs: Pathogen associated molecular pattern

PMNs: Polimorfos nucleares neutrófilos

PRRs: Pattern recognition receptors

ROS: Reactive oxygen species

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SOD: Superóxido dismutasa

TLR: Toll-like receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Capítulo I

1.1. Resumen

Este documento está conformado por dos manuscritos: una revisión que sintetiza generalidades de la histoplasmosis (HPM) y el uso de la nanomedicina como alternativa prometedora para el tratamiento de esta infección intracelular (capítulo I); además, un artículo en el cual se demuestra el efecto antimicótico mejorado del itraconazol (ITZ) encapsulado en nanopartículas (NPs) de PLGA funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 (NPs-ITZ-F4/80) para eliminar levaduras de *H. capsulatum* en co-cultivo con macrófagos J774A.1 (capítulo II).

Histoplasma capsulatum es el agente causal de la histoplasmosis (HPM), una micosis que ha sido reportada en todos los continentes, con una alta incidencia en América. Se trata de una afección sistémica que puede afectar tanto individuos inmunosuprimidos como inmunocompetentes, aunque las manifestaciones clínicas son mucho más severas en los primeros, como los infectados con el VIH. Su tratamiento representa un reto debido a sus múltiples limitaciones como la dificultad para alcanzar concentraciones adecuadas a nivel intracelular y las interacciones medicamentosas, lo que hace que se requieran dosis repetidas durante largo plazo y se ocasionen efectos adversos como hepatotoxicidad. La encapsulación de fármacos en nanopartículas funcionalizadas es una alternativa terapéutica valiosa que ayuda a minimizar los problemas de la terapia convencional mediante el direccionamiento específico de fármacos y su liberación sostenida y controlada en las células blanco.

Pese a su relevancia, en el ámbito mundial, se han realizado pocas investigaciones que evalúen la eficacia de este tipo de tecnologías en el tratamiento de la HPM. Este trabajo evaluó el efecto antimicótico de itraconazol libre y encapsulado con o sin funcionalización un modelo *in vitro* de HPM. El método de microdilución para levadura (M27-A3) permitió determinar que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 0,015 µg/mL para NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80. El ensayo de citotoxicidad demostró que las diferentes formulaciones de ITZ no afectaron la viabilidad celular de macrófagos J774A.1. La cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) mostró que el tratamiento con

ITZ encapsulado y funcionalizado (NPs-ITZ-F4/80) proporciona un mayor efecto antimicótico contra *H. capsulatum* en co-cultivo con macrófagos J774A.1. Adicionalmente, los hallazgos obtenidos mediante microscopía de fluorescencia, demostraron que existe una mayor captación celular de las NPs cuando están funcionalizadas en comparación con las NPs sin funcionalizar, lo cual sugiere que la efectividad del tratamiento con NPS-ITZ-F4/80 observado en los ensayos de UFC, puede deberse a un aumento en la concentración de ITZ a nivel intracelular. Los análisis de PCR en tiempo real evidenciaron que al encapsular el ITZ se genera un efecto inmunomodulador sobre los macrófagos infectados, el cual se potencia por los anticuerpos anti F4/80 empleados en la funcionalización de las NPs.

1.2. Marco teórico

1.2.1. Definición de histoplasmosis y descripción del agente etiológico

Las micosis endémicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y representan un grave problema de salud pública, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos [1,2]. Entre estas micosis se encuentra la histoplasmosis (HPM), enfermedad de origen pulmonar primario con posibilidad de diseminación a otros órganos y sistemas. Es causada por las especies del género *Histoplasma*, pertenecientes al filum Ascomycota, orden Onygenales, familia Ajellomycetaceae [3]. Históricamente se han reconocido tres variedades distintas de la especie *H. capsulatum*, determinadas por la distribución geográfica, la morfología y los síntomas clínicos que produce: *H. capsulatum* var. *capsulatum* (distribuida a nivel mundial, agente clásico de la enfermedad en humanos), *H. capsulatum* var. *duboisii* (patógeno para humanos en África) e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (patógeno para equinos), separados en ocho clados filogeográficos: norteamericano clase 1 (NAm 1), norteamericano clase 2 (NAm 2), Grupo Latinoamericano A (LAm A), Grupo Latinoamericano B (LAm B), australiano, holandés, euroasiático y africano [4,5]. Sin embargo, recientemente se realizaron análisis genéticos y filogenéticos del genoma completo de 30 aislados de *Histoplasma* recolectados de cuatro áreas donde la histoplasmosis es endémica y sugirieron una reorganización taxonómica del género así: *H. capsulatum sensu stricto* (para referirse al linaje panameño), *Histoplasma mississippiense* sp. nov. (anteriormente denominado como NA 1), *Histoplasma ohioense* sp. nov. (anteriormente conocido como NA 2) e *Histoplasma suramericanum* sp. nov. (antes conocido como LAm A) [6].

H. capsulatum es un hongo dimórfico térmico que posee la capacidad de cambiar de una fase miceliar (M) saprófita, que se desarrolla a temperatura ambiente en la naturaleza, en suelos con alto contenido de nitrógeno enriquecidos con excretas de aves o murciélagos, o en cultivos *in vitro* a temperaturas < 35°C, hacia una fase levaduriforme (L) en cultivos *in vitro* a 37°C o en los tejidos del hospedero (fase tisular) (Figura 1). Este dimorfismo térmico es considerado un factor de virulencia [7]. Las levaduras cultivadas *in vitro* en medios enriquecidos como el BHI (por su sigla en inglés *Brain Heart Infusion*) o

el HMM (por su sigla en inglés *Human Macrophage Medium*), a una temperatura de 37°C, tardan en crecer una semana y macroscópicamente se caracterizan por la formación de colonias pequeñas, cremosas, de color blanco-amarillento; al microscopio, se observan blastoconidias ovales y pequeñas, con una longitud entre 2 y 4 μm [8]. El crecimiento *in vitro* de la fase miceliar, tarda aproximadamente de tres a seis semanas y se puede formar dos tipos de colonias: blanca albina (A de albina) o café (B del inglés *Brown*), ambas de aspecto vellosa, surcado y seco. Microscópicamente, se observan hifas septadas y delgadas con un diámetro entre 1 y 2,5 μm que producen macroconidias y microconidias tuberculadas. Las primeras son grades con pared gruesa y un diámetro de 7 a 15 μm , generalmente presenta tubérculos. Las segundas son ovales, con pared delgada y un diámetro entre 2 a 6 μm [9,10].

En la superficie de la pared celular de *H. capsulatum* en fase de levadura se encuentran los componentes que le permiten entrar en contacto con las células del hospedero, especialmente macrófagos y células dendríticas [11] y sobrevivir al interior de las mismas. Entre estas moléculas se incluyen proteínas de choque térmico (ej., Hsp60, Hsp70), otras proteínas (ej., Yps3) polisacáridos de pared (ej., β -1,3-glucanos), entre otros [9].

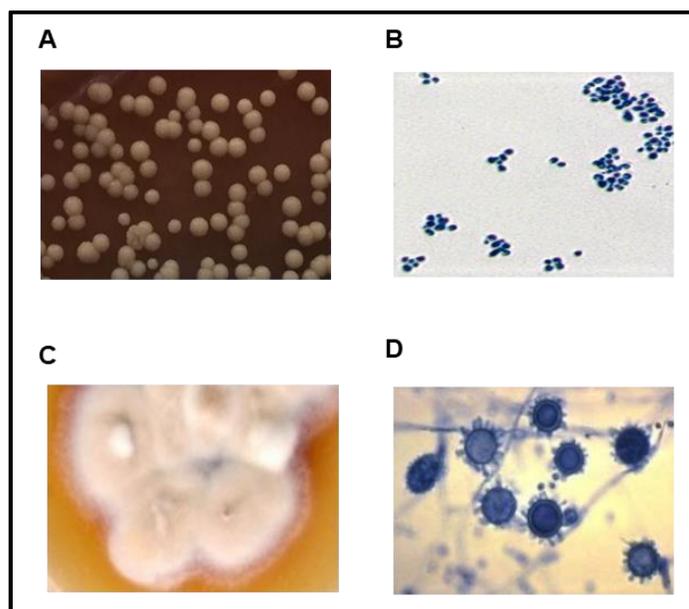


Figura 1. Morfotipos de *H. capsulatum*. Fase levaduriforme (L), apariencia macroscópica (A) y microscópica (B). Fase miceliar (M), apariencia macroscópica (C) y microscópica (D).

1.2.2. Epidemiología de la histoplasmosis

La HPM tiene una amplia distribución geográfica, siendo reportada en más de 60 países en todos los continentes y llegando a ser considerada como enfermedad altamente endémica en algunos países de América y África (Figura 2) [12]. Las áreas endémicas en América Latina, son las zonas de clima templado, subtropical o tropical húmedo, cercanas a cursos de agua dulce y suelos que contienen deyecciones de pájaros negros, como los estorninos, aves de corral y murciélagos [13]. En Norteamérica, las zonas endémicas de mayor importancia corresponden a los valles de los ríos Mississippi y Ohio [14]. De acuerdo a algunos estudios realizados en estos valles, la incidencia para esta enfermedad es de 6,1 casos por cada 100.000 y hasta el 90% de la población ha estado expuesta a *H. capsulatum* al menos una vez durante su vida [15,16]. En América Latina, la incidencia de esta micosis aumentó en gran medida por la pandemia del VIH/SIDA (Virus de la Inmunodeficiencia Humana/ Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida); países como Brasil, Guayana Francesa, Argentina, Colombia, Venezuela, Guatemala y Panamá son altamente endémicos [17,18]. Según estudios de Adenis AA *et al.* las áreas con una incidencia $\geq 1,5\%$ en personas que viven con el VIH son Guyana, Centroamérica (excepto México), Argentina y Venezuela [19].

En Colombia, la incidencia e impacto real de la histoplasmosis en la salud pública no son muy claros, dado que no es una enfermedad de notificación obligatoria. Recientemente Álvarez-Moreno *et al.* calcularon una tasa de incidencia en Colombia de 0,6 por 100.000 habitantes, a partir de casos reportados, estadísticas de la enfermedad y algunos parámetros poblacionales [20]. Además, a lo largo de la historia se han descrito un total de 18 brotes, de los cuales 415 personas se expusieron y 188 (45,3%) resultaron infectadas y las actividades que condujeron a la infección por el hongo, se relacionaron con fuentes ambientales, especialmente visitas a cuevas y manejo de excretas de aves [21]. Sin embargo, los factores de riesgo han cambiado, de acuerdo con los datos publicados por Arango M *et al.* en Colombia, más del 70% de los pacientes con HPM presentan comorbilidad con la infección por el VIH [22].

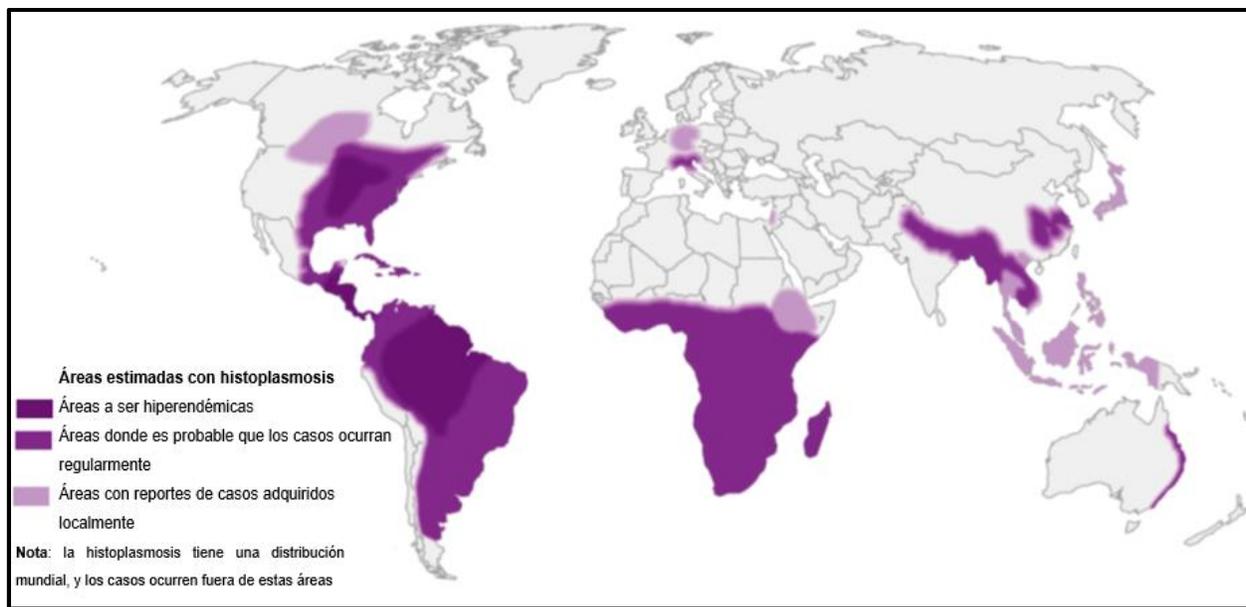


Figura 2. Áreas estimadas con histoplasmosis en el mundo. Modificado de CDC (por su sigla en inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*).

No obstante, el panorama epidemiológico de la HPM puede cambiar debido al cambio climático y al uso antropogénico de la tierra lo que favorece la expansión de las áreas geográficas en las que *H. capsulatum* puede sobrevivir, creando así la posibilidad de que la infección se adquiriera fuera de las áreas que clásicamente se consideraban endémicas para este microorganismo [23].

Los factores asociados al desarrollo de la HPM dependen del hongo (tamaño del inóculo y virulencia de la cepa) y del hospedero (edad, género, condiciones inmunológicas). En los adultos la HPM se presenta más en los hombres que en las mujeres, en una relación 3:1, los niños y los ancianos son más propensos a desarrollar primoinfección con tendencia a la diseminación [8]. Es más frecuente en personas que trabajan en la agricultura y la construcción o que frecuentan cuevas, puesto que son escenarios donde los suelos están enriquecidos con excretas de aves y murciélagos que favorecen el crecimiento del hongo [24]. La HPM es mucho más severa en aquellos individuos que presentan algún tipo de inmunodeficiencia, especialmente los infectados con el VIH, los trasplantados de órganos sólidos, los que reciben terapias con inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por su sigla en inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*) u otros fármacos inmunosupresores [25,26]. Actualmente se le considera como una enfermedad

altamente prevalente en pacientes con SIDA, presentando una incidencia de coinfección del 0,9% que, en áreas endémicas, puede llegar hasta el 27%. Además, en el 29% de los casos, se considera una infección definitoria de SIDA [27]. Estudios recientes, reportan tasas de mortalidad superiores al 30% entre los pacientes coinfectados [28,29].

1.2.3. Formas clínicas de la histoplasmosis

Las manifestaciones clínicas de la HPM son el resultado de un proceso multifactorial, ya que dependen de: i) la cantidad y frecuencia del inóculo inhalado; ii) el estado inmune del hospedero; y iii) el grado de virulencia de la cepa responsable de la infección [30].

En el año 1981, Goodwin *et al.* propusieron una clasificación de las formas clínicas de la HPM con el fin de identificar signos y síntomas, establecer un diagnóstico y posterior tratamiento [31]. Dicha clasificación aún continúa vigente (Figura 3).

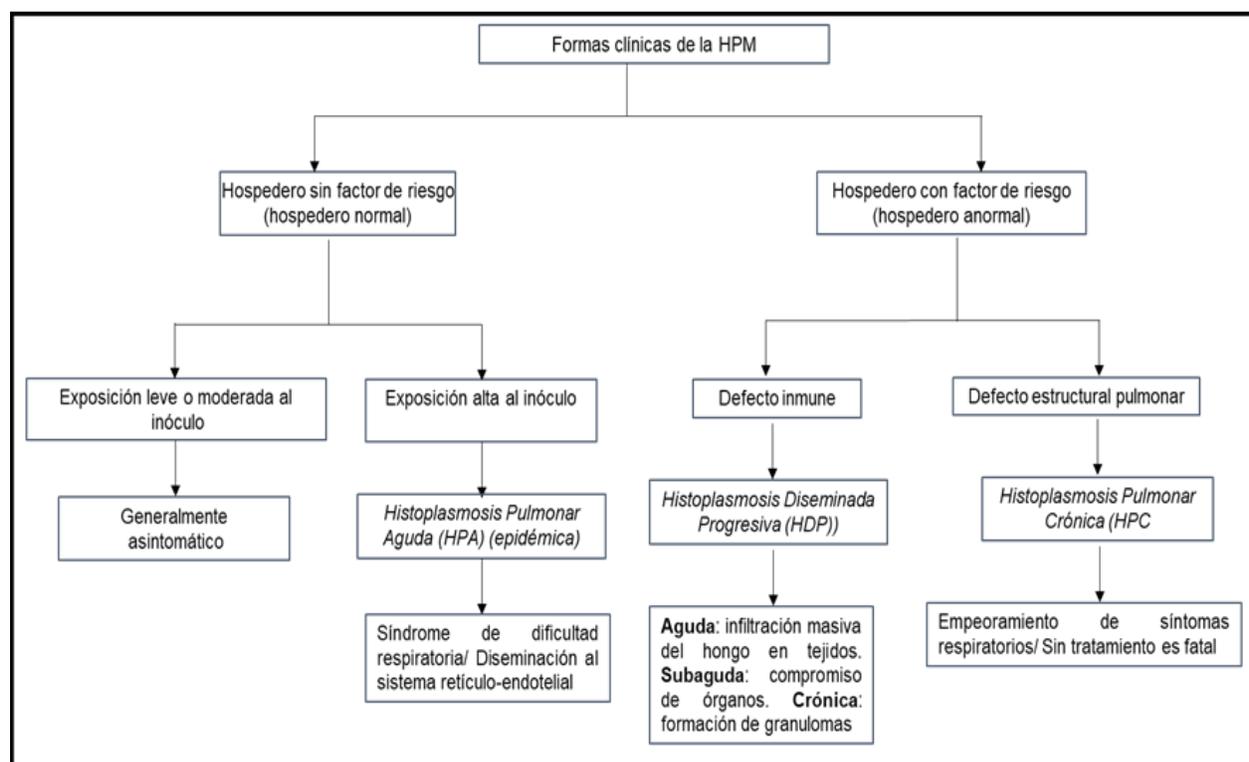


Figura 3. Formas clínicas de la HPM (figura elaborada con información proveniente de Goodwin *et al.* 1981)

En las primeras semanas, posterior al contacto con el hongo, antes de desarrollarse la inmunidad celular, se da inicio en el hospedero a una infección pulmonar primaria, durante la cual el hongo se disemina por vía hematógica a órganos del sistema reticuloendotelial. Cuando se desarrolla la inmunidad celular, en el 95% de los casos la infección pulmonar y extrapulmonar se resuelven espontáneamente [32,33]. Sin embargo, en los pacientes con un defecto inmune, la histoplasmosis es progresiva y pueden desarrollar las siguientes manifestaciones clínicas:

- La forma pulmonar aguda se presenta en hospederos inmunocompetentes y cerca del 5% de los casos presentan síntomas como tos seca, fiebre, escalofríos, cefalea, malestar general, disnea, dolor en el pecho y fatiga. Si ocurre diseminación de la infección fuera del pulmón, podría presentarse hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía que se resuelven sin terapia [34].
- La forma pulmonar crónica se presenta en pacientes con una enfermedad pulmonar estructural como enfisema y cicatrices fibrosas de tuberculosis. Su curso es lento y sus manifestaciones son fatiga, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, empeoramiento de los síntomas respiratorios previos con disnea, tos con producción de esputo y, algunas veces, hemoptisis. Puede ser fatal si el paciente no recibe tratamiento [35].
- La Histoplasmosis Diseminada Progresiva (HDP), se refiere al crecimiento y multiplicación continua hongo en diferentes órganos y sistemas diferentes al pulmón. Esta forma puede desarrollarse por reactivación de una infección antigua o como consecuencia de la diseminación de una nueva infección, especialmente en pacientes inmunocomprometidos como las personas en extremos de vida, los sometidos a terapia con corticosteroides, antineoplásicos o antagonistas del TNF- α , los trasplantados de órgano sólido y principalmente los pacientes infectados por el VIH que tienen recuentos de CD4 inferiores a 150 células /mL. El curso clínico de la HDP se puede clasificar en agudo, subagudo y crónico dependiendo del tiempo de evolución y sus manifestaciones clínicas y patológicas [10,32,36].

1.2.4. Inmunopatogénesis de la histoplasmosis

La HPM inicia cuando el hospedero inhala aerosoles que contienen las partículas infectantes del hongo (microconidias y pequeños fragmentos miceliares) las cuales, debido a su pequeño tamaño (menor a 4 μm), llegan hasta los alveolos pulmonares y a los espacios intersticiales, donde interactúan con una variedad de fagocitos, incluidos macrófagos, neutrófilos y células dendríticas que ejercen una función defensora inespecífica al reconocer e internalizar algunas de las estructuras micóticas. Inicialmente, se da el proceso de adhesión en el cual las microconidias y los pequeños fragmentos de hifas se unen a las integrinas CD11/CD18 presente en la superficie de macrófagos y neutrófilos para ser fagocitadas [30].

La transición a levadura de *H. capsulatum* es un evento crítico y determinante en la patogénesis de la infección y ocurre por la temperatura corporal del hospedero (37°C) que actúa como señal de diferenciación y traducción de señales de los factores de transcripción Drk1 y Ryp necesarios para el crecimiento de la fase levadura y la expresión de moléculas importantes para su virulencia como Sod3, Yps3, Cbp1 y CatB [37,38]. Los fagocitos del hospedero expresan en la superficie una variedad de PRRs (por su sigla en inglés *pattern recognition receptors*) que incluyen los receptores tipo *toll* (TLRs, por su sigla en inglés *toll-like receptors*) y receptores de lectinas tipo C (CLR, por su sigla en inglés *C-type lectin receptors*) que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por su sigla en inglés *pathogen-associated molecular pattern*) de *H. capsulatum* tales como la Hsp60, Yps3, ácidos nucleicos, glucanos, mananos, entre otros, promoviendo su fagocitosis y la producción de citoquinas [11] (Figura 4).

Los macrófagos son considerados como las células efectoras más importantes en la resistencia del hospedero contra la HPM, participando tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Estas células expresan TLR2, el primer TLR documentado en unirse a *H. capsulatum* y desencadenar respuesta inmune. Su ligando es la proteína de superficie Yps3, tras su reconocimiento, se activa la proteína adaptadora MyD88 que sirve de unión entre el receptor extracelular y la vía interna de señalización que conduce a que el factor de transcripción NF- κ B ingrese al núcleo y active varios genes de respuesta inmune innata como el TNF- α y el IFN- γ [39]. También expresan Dectina-1, un miembro de los

CLRs, el cual se une específicamente a los β -glucanos, uno de los componentes principales de la pared celular de *H. capsulatum* y el más inflamatorio [40]. Tras el reconocimiento de β -glucanos, Dectina-1 media las vías NFAT y NF- κ B dependientes de Sky y las vías Raf-1 independientes de Sky para promover la producción de citoquinas y quimioquinas, que a su vez promueve la defensa antifúngica a través de las repuestas Th1 con la producción de IFN- γ , IL-12, GM-CSF (por su sigla en inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y TNF- α y respuesta Th17 que resulta ser beneficiosa, pero no esencial para el control de *H. capsulatum*, produciendo citoquinas inflamatorias como IL-17, IL-6 y GM-CSF [41,42]. Además, la señalización de Dectina-1 modula respuestas antifúngicas a través de la fagocitosis, la producción de ROS y la activación de inflamosomas, que son esenciales en la escisión y la activación de la pro-IL-1 β a IL-1 β activa. Así, este PRR puede inducir numerosas respuestas inmunes, tanto innatas como adaptativas, desempeñando un papel esencial en la inmunidad contra *H. capsulatum* [43] (Figura 4).

Por otro lado, los neutrófilos se unen a las levaduras de *H. capsulatum* opsonizadas a través de una variedad de receptores incluidos CR1, CR3 y Fc γ RIII y son fundamentales para controlar la infección al retrasar la proliferación de la levadura hasta que se pueda activar la inmunidad adaptativa [11]. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que dicho control fungistático está mediado por el contenido de sus gránulos azurófilos que contiene catepsina G, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI) y las defensinas de neutrófilos humanos HNP-1, HNP-2 y HNP-3, las cuales pueden restringir el crecimiento de *H. capsulatum* de manera dosis dependiente [44] (Figura 4).

Por su parte, las células dendríticas se unen a *H. capsulatum* a través de la interacción del receptor de fibronectina VLA-5 con la glicofilina A (CypA). Expresan receptores tipo Toll como el TLR7 y el TLR9 que reconocen ácidos nucleicos del hongo e inducen la producción de IFN tipo I. También expresan Dectina 1 y 2 que se unen a componentes de la superficie del hongo y conllevan a la activación del inflamasoma NLRP3 [11,45,46] (Figura 4). Estas células, son también las responsables de presentar los antígenos de *H. capsulatum* a los linfocitos del sistema inmune adaptativo, al tiempo que estimulan su proliferación y se da inicio a una respuesta inmune protectora Th1 en el hospedero

inmunocompetente, con producción de citoquinas importantes como el IFN- γ y TNF- α que activan a los macrófagos en el sitio de infección, inhibiendo así el crecimiento intracelular de *H. capsulatum* mediante diversos mecanismos, entre ellos: el secuestro de hierro y zinc, dos metales indispensables para su replicación en el interior de la célula; la producción de radicales derivados del oxígeno y del nitrógeno y la fusión de lisosomas con la liberación de enzimas proteolíticas al fagosoma [47].

En contraste, *H. capsulatum*, evolutivamente, ha desarrollado estrategias que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero, replicarse y vivir intracelularmente dentro de los macrófagos y eventualmente viajar al núcleo para inducir su lisis y liberarse para infectar nuevas células, iniciando así, un nuevo ciclo en otros macrófagos, los cuales pueden migrar por vía linfática hacia los ganglios hiliares y mediastinales; y luego, por el conducto torácico, invadir el torrente sanguíneo y diseminarse a los distintos órganos y tejidos, especialmente los del sistema reticuloendotelial (hígado, bazo y ganglios linfáticos) estableciendo infecciones persistentes que dependiendo del estado inmune del hospedero, se convierten en crónicas o latentes [30,48].

Entre los principales mecanismos de virulencia de *H. capsulatum*, se encuentra su dimorfismo térmico, los componentes de su pared y la producción de moléculas para superar las limitaciones nutricionales. Por ejemplo, existen cepas de *H. capsulatum* que expresan en sus paredes celulares α -glucanos que enmascaran los β -glucanos. La presencia o no de este polisacárido de pared celular, ha permitido clasificar el hongo en quimiotipos I y II, siendo este último el grupo que posee los α -glucanos [49]. Además, secretan una β -glucanasa, Eng1, que actúa eliminando los β -glucanos residuales expuestos en la superficie lo cual reduce el reconocimiento inmunitario a través de dectina-1 y las posteriores respuestas inflamatorias, aumentando su patogénesis [11,50]. Este hongo, tiene la capacidad de contrarrestar las especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la expresión de las enzimas superóxido dismutasa (Sod1 y Sod3) y catalasas (CatB y CatP); bloquear la acidificación del fagosoma, producir o captar y transportar nutrientes esenciales como hierro, zinc, cobre y vitaminas [51]. En la tabla 1 se describen los principales factores de virulencia de *H. capsulatum* reportados hasta el momento.

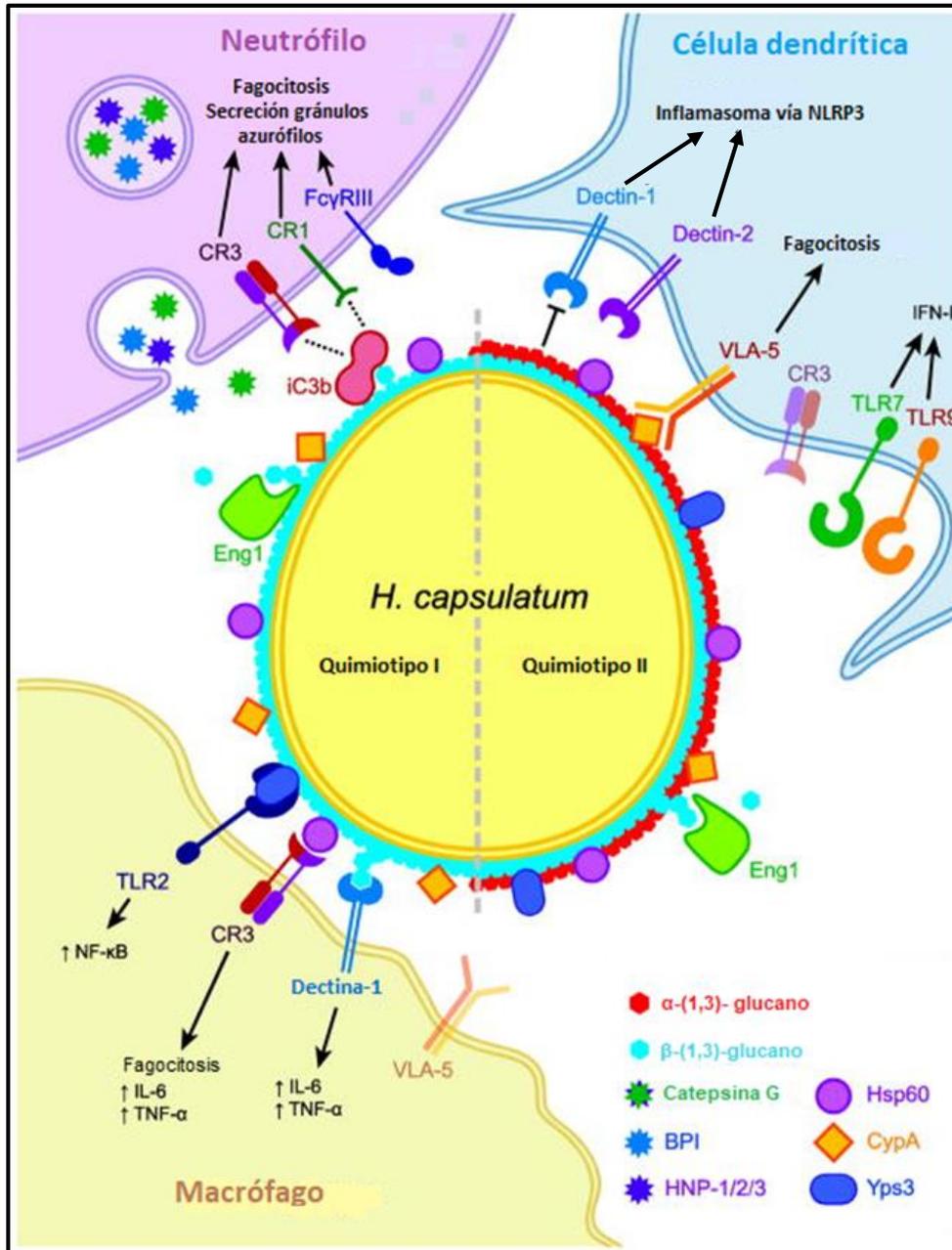


Figura 4. Interacciones de *H. capsulatum* con fagocitos del hospedero. Modificado de Ray SC, Rappleye CA. Semin Cell Dev Biol. 2019. Los fagocitos del hospedero expresan una variedad de receptores capaces de reconocer levaduras de *H. capsulatum*. Los macrófagos fagocitan las levaduras a través de la interacción de CR3 con la proteína Hsp60, mientras que las DC lo hacen a través de la interacción del receptor VLA-5 con la glicofilina A (CypA). Los PMN se unen a *H. capsulatum* opsonizado mediante los receptores CR1, CR3 y FcγRIII, además, responden liberando de sus gránulos azurófilos

compuestos fungistáticos como la catepsina G, BPI y HNP-1, 2 y 3. Los receptores de señalización TLR2 y Dectina-1 reconocen la proteína de superficie Yps3 y los β -glucanos, respectivamente. Sin embargo, *H. capsulatum* produce una serie de moléculas que le permiten minimizar muchas de las interacciones PAMP-PRR. Por ejemplo, reduce el reconocimiento de β -glucanos inmunoestimuladores al enmascararlos con α -(1,3)-glucanos y/o al eliminarlos con la β -glucanasa, Eng1.

Tabla 1. Factores de virulencia de *H. capsulatum*

Mecanismo de virulencia		Función	Referencias
Dimorfismo	Cambio de morfotipo a 37°C	Adaptación a los tejidos del hospedero y patogénesis	[37]
Alteraciones en la pared	α - glucanos	Enmascaramiento de β -glucanos	[38]
	Eng-1	Eliminación enzimática de β -glucanos	
	Yps3	Interacción directa con macrófagos	
	Hsp60	Ingreso a las células sin desencadenar respuestas inflamatorias marcadas	
Inactivación de ROS	Sod1 y Sod3	Eliminación de superóxidos	[52]
	CatB y CatP	Eliminación de peróxido de hidrógeno	
Respuesta hipoxia	Srb1	Adaptación al ambiente hipóxico	[53]
Adquisición de nutrientes esenciales	Ggt1	Para reducir el hierro dentro del fagosoma	[51]
	Zrt2	Transportador de zinc	
	Ctr3	Transportador de cobre	
	Sid1	Biosíntesis de sideróforos	
	Cpb1	Captar calcio	
Vitaminas	Produce de <i>novo</i> riboflavina y pantotenato para satisfacer sus necesidades metabólicas		
Inducción de apoptosis	Agregados alrededor del núcleo	Fragmentación del ADN	[48]

1.2.5. Tratamiento de la histoplasmosis

Para el tratamiento de la HPM grave, inicialmente se recomienda el uso de anfotericina B (AMB) en forma liposomal por su menor nefrotoxicidad y mayor efectividad [54]. Luego se continúa la terapia con un medicamento tipo azol, como el voriconazol, el posaconazol y el ITZ, siendo este último el fármaco de elección para tratar las diferentes formas clínicas de la enfermedad en estadios leves y moderados. El tratamiento inicia con una dosis de carga de 200 mg cada ocho horas por tres días para obtener niveles terapéuticos en cinco a siete días y asegurarse de mantener concentraciones plasmáticas de al menos 1 mg/mL. La duración del tratamiento es de al menos 12 meses para las formas aguda y crónica y tiempos aún mayores para la forma diseminada progresiva [55]. El uso de otros azólicos como el fluconazol (FLC) y el voriconazol no es frecuente debido a que son menos efectivos que el ITZ, especialmente en los pacientes con SIDA [56,57]. Además, se ha reportado resistencia al FLC en pacientes que fracasaron en el tratamiento [58].

1.2.5.1. Limitaciones de las terapias actuales

Las formulaciones de AMB son el estándar para tratar formas pulmonares graves o formas diseminadas, pero su uso se asocia con nefrotoxicidad, el efecto adverso más reportado (del 34- 60% de los pacientes) [59,60]. Además, las reacciones agudas relacionadas con la infusión de este fármaco son frecuentes puesto que estimula directamente la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por las células fagocíticas mononucleares, produciendo vómitos, fiebre y escalofríos [61]. Los trastornos sanguíneos, especialmente la anemia y las alteraciones electrolíticas, como la hipomagnesemia y la hipopotasemia, se presentan en el 60% y el 28% de los pacientes, respectivamente [55,62]. Por su parte, el ITZ usado como terapia única en las formas leves y moderadas de la HPM o como terapia gradual después de la AMB, presenta varias limitaciones asociadas con las interacciones farmacológicas y los efectos secundarios. El efecto adverso más reportado es la hepatotoxicidad con una tasa global del 3,6% al 4,3% [63]. Además, produce náuseas, vómito, diarrea, erupciones cutáneas y cefalea. Adicionalmente, el ITZ interacciona con varios fármacos utilizados en el tratamiento del SIDA (nevirapina, lopinavir/ritonavir) y la tuberculosis (rifampicina, rifabutina), lo que

puede provocar una alteración de los niveles en sangre [64]. La molécula de ITZ presenta varios problemas relacionados principalmente con su baja solubilidad en agua y fluidos corporales, afectando directamente su capacidad de absorción y biodisponibilidad sistémica luego de ser administrado de forma oral [65]. Las formulaciones comerciales de ITZ (Sporanox) contienen hidroxipropil- β -ciclodextrina, un coadyuvante que mejora su solubilidad y biodistribución, pero está contraindicada en pacientes con insuficiencia renal por problemas en la eliminación eficiente del adyuvante [60,66]. Todas estas limitaciones de las terapias convencionales se relacionan con un suministro de dosis altas y frecuentes del antimicótico ocasionando efectos adversos ya mencionados y promoviendo el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los agentes terapéuticos [67,68].

1.2.6. La nanomedicina como alternativa terapéutica

Las nuevas terapias se centran en aumentar la eficacia de los medicamentos mediante el uso de sistemas de administración sitio-dirigidos, permitiendo la intervención específica del blanco deseado, con la dosis adecuada y en el tiempo conveniente, contribuyendo así al control y evitando la propagación de las enfermedades infecciosas [69]. En este sentido, los avances recientes en el campo de la nanotecnología han demostrado que pueden ayudar a superar problemas de estabilidad y biodisponibilidad del agente terapéutico, así como disminuir la toxicidad inespecífica que puede tener lugar [70]. En el caso particular de las enfermedades infecciosas, se ha logrado desarrollar nanopartículas (NPs) orgánicas e inorgánicas con esta tecnología, que protegen las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, mostrando un incremento en la actividad antimicrobiana, independiente del tipo de medicamento (antimicrobianos, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios) [71–74], y favoreciendo su uso clínico y administración a través de vías menos invasivas para el paciente [75].

Adicionalmente, las NPs funcionalizadas con ligandos como proteínas, anticuerpos, carbohidratos, vitaminas, péptidos, entre otros, permiten la liberación del fármaco de manera específica dado que estos favorecen las interacciones con las membranas celulares, logrando concentraciones más altas a nivel intracelular [76,77]. Además, por

su liberación sostenida y controlada, se previenen las interacciones no deseadas, la degradación del fármaco antes de llegar al tejido o célula blanco; al tiempo que disminuyen su toxicidad y efectos secundarios adversos y se previene el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los agentes terapéuticos [69,78].

En conjunto, la modulación en la composición de la nanocápsula y la funcionalización de la superficie mediante el uso de ligandos con alta afinidad y especificidad por receptores expresados en las membranas de las células diana, permiten desarrollar nanotransportadores que liberan el fármaco de forma lenta y constante en el sitio de infección. Además, al favorecer la interacción con las células se mejora su reconocimiento y captación celular, logrando así concentraciones óptimas de fármaco a nivel intracelular donde reside el microorganismo. De esta forma se puede reducir la cantidad y la frecuencia de la dosis, ayudando a prevenir el desarrollo de resistencia [79]. Por otro lado, enfocados únicamente en la modificación de la superficie de las NPs con ligandos dirigidos para alcanzar el objetivo molecular de interés, los nanotransportadores se pueden direccionar hacia receptores celulares que activen vías de señalización relacionadas con una respuesta inmune específica o la modulación directa del estado de activación de los macrófagos, favoreciendo así, el control del microorganismo y evitando que se propague [80,81].

Los polímeros sintéticos y naturales son uno de los materiales más utilizados para desarrollar nanotransportadores y esto se debe principalmente a que son estables, pueden cargar gran cantidad de fármaco, y tienen la capacidad de transportar uno o varios principios activos, o una combinación de agentes terapéuticos en una misma formulación [82]. Además, su administración puede darse por diferentes rutas y permiten ser funcionalizados en su superficie con ligandos que mejoran la captación celular, liberando la carga terapéutica en el sitio específico, logrando así, niveles terapéuticos intracelulares rápidamente [75].

Entre los polímeros más utilizados se encuentra el co-polímero poli-(láctico-co-glicólico) PLGA, polímero sintético biocompatible, biodegradable, y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su sigla en inglés *Food and Drug Administration*)

para aplicaciones médicas y farmacéuticas [83]. Durante su degradación en fluidos fisiológicos, sufre hidrólisis de los enlaces éster, produciendo ácido láctico y ácido glicólico que finalmente se degradan para formar energía, dióxido de carbono y agua a través del ciclo de Krebs [84]. Además, si se modula la relación entre monómeros de ácido láctico (LA) y glicólico (GA), el PLGA permite la liberación controlada y sostenida de las moléculas encapsuladas durante varios días, aumentando la biodisponibilidad y mejorando el efecto terapéutico [85]. Actualmente, el PLGA es uno de los polímeros más utilizados a nivel clínico y debido a sus propiedades, en especial a nivel superficial, puede ser modificado con ligandos como anticuerpos monoclonales (mAb) mediante asociaciones físicas simples o reacciones de conjugación [86].

1.2.6.1. Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para el tratamiento de la histoplasmosis

En la literatura se encuentran reportados múltiples estudios en los cuales han evaluado diferentes tipos de NPs para el tratamiento de infecciones que buscan superar las limitaciones de las terapias convencionales.

Alhowyan *et al*, en un estudio con modelos *in vitro* y *ex vivo* observó que el uso de ITZ encapsulado en NPs de PLGA, mejora considerablemente la actividad antifúngica contra *Candida albicans* e incrementa la permeabilidad intestinal del fármaco [87]. Así mismo, Khan y col, con un modelo animal de criptococosis, demostró que la encapsulación de AMB y FLC en NPs de PLGA previa al tratamiento, favoreció la liberación sostenida de ambos medicamentos, prolongando su tiempo en circulación sanguínea, mostrando así, una reducción significativa de la carga fúngica y un aumento en la tasa de supervivencia de los ratones infectados y tratados [88].

La encapsulación de rifampicina en nanopartículas de quitosano con un núcleo de PLGA y funcionalizadas con 1,3- β -glucano, mejoraron significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), citoquinas pro-inflamatorias y aumentaron las concentraciones intracelulares del fármaco [89]. Otras evaluaciones *in vivo* de ITZ encapsulado en NPs de PLGA y recubiertas con

DMSA demostraron una mejora en la biodistribución del fármaco y una disminución de la toxicidad en ratones infectados con *P. brasiliensis* y tratados con el compuesto [74]. En un modelo *in vitro* de leishmaniasis, se observó que la encapsulación de ITZ con NPs de PLGA y posterior funcionalización con manosa disminuyen la toxicidad del antimicótico y mejoran la eficacia del tratamiento, probablemente debido a la endocitosis mediada por receptores [72]. Así mismo, otras investigaciones han demostrado que las nanoesferas de PLGA cargadas con AMB y funcionalizadas con manano y otros carbohidratos, modulan la activación de macrófagos mediada por receptores, promoviendo un entorno pro-inflamatorio que potencia la terapia contra la leishmaniasis [90]. Con lo anterior, se podría concluir que los nanobioconjugados, denominándose así a la combinación de nanomateriales, como el PLGA, y algunas biomoléculas, como los anticuerpos, podrían ser considerados como una alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas [91].

Los macrófagos son considerados como la primera línea de defensa del hospedero contra *H. capsulatum*. Como células del sistema inmune, presentan una alta heterogeneidad y plasticidad, y expresan múltiples receptores en su membrana plasmática, que favorecen la interacción con el hongo e inducen la activación de señales de respuesta inflamatoria necesarias para eliminar o detener el crecimiento del patógeno [92]. Dentro de estos receptores, se encuentra el F4/80, expresado en varias subpoblaciones de macrófagos tisulares de ratón, incluyendo los de tejido pulmonar, hepático, de sistema nervioso central, peritoneo y pulpa roja esplénica. Su estructura está compuesta de dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio de siete transmembranas (TM7), convirtiendo esta molécula en un miembro de la familia de receptores EGF-TM7 [93]. En humano, su homólogo es el receptor 1 de la hormona similar a la mucina (EMR1) cuya expresión está restringida a los eosinófilos [94]. El antígeno F4/80 es una glicoproteína de superficie celular de 160 kDa ampliamente utilizada como marcador específico de macrófagos murinos [95].

Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de anticuerpos anti F4/80 en la funcionalización de nanotransportadores, se convierte en un atractivo nanotecnológico para el desarrollo de modelos experimentales que buscan mejorar las terapias antimicóticas nuevas y

existentes contra *H. capsulatum*. Su uso podría proporcionar una administración dirigida y absorción eficaz del fármaco, que permitan alcanzar los niveles terapéuticos intracelulares y evite la administración repetida y prolongada, que favorece la aparición de efectos adversos, como la hepatotoxicidad, y el posible desarrollo de resistencia por parte del microorganismo. Además, al ejercer un efecto sinérgico con el fármaco, las NPs funcionalizadas podrían modular la respuesta inmune a través de la inducción o supresión de citoquinas específicas, potenciando así el efecto de la terapia.

Esta revisión evidencia la complejidad clínica, epidemiológica y terapéutica de la HPM, describiendo su estado actual en temas como la definición del evento y el agente etiológico, una síntesis del panorama epidemiológico de la enfermedad, su horizonte clínico, inmunopatogénesis y tratamiento. Además, frente a las múltiples limitaciones de las opciones terapéuticas convencionales, expone las potencialidades de la nanomedicina para mejorar los problemas actuales de eficacia y seguridad de los tratamientos disponibles.

1.3. Planteamiento del problema

La HPM es una micosis endémica y sistémica producida por el hongo dimórfico *H. capsulatum*. Ha sido reportada en más de 60 países en todos los continentes, con una alta incidencia en el continente americano [30]. Es una enfermedad altamente prevalente en pacientes con VIH/SIDA y representa una causa importante de mortalidad en esta población, especialmente en países con acceso limitado a los servicios de salud y pruebas de diagnóstico [17]. El tratamiento de la HPM está basado en el uso de agentes antimicóticos tipo azoles, como el ITZ, considerado el fármaco de primera elección para tratar las formas leves y moderadas de la HPM [55]. Sin embargo, se ha reportado la aparición de varios efectos adversos, como náuseas, vómito, diarrea, erupciones cutáneas, cefalea y hepatotoxicidad, siendo este último el más reportado [63]. Además, el ITZ presenta otras limitaciones como la baja biodisponibilidad sistémica, alta susceptibilidad a hidrólisis gastrointestinal e interacción con otros medicamentos [64,65]. En ese sentido, una alternativa para solucionar estos inconvenientes es la nanoencapsulación del ITZ en NPs, que brinden un aumento considerable de la estabilidad y biodisponibilidad sistémica del fármaco, permitiendo no solo disminuir las dosis y tiempos de suministro, sino también el desarrollo de resistencia y efectos secundarios adversos [69,78]. Adicionalmente, se propone la funcionalización con moléculas que permitan brindar una mayor especificidad y lograr una terapia dirigida hacia las células u órganos infectados por *H. capsulatum* convirtiéndose así en una solución terapéutica para esta infección.

1.4. Hipótesis

El nanobioconjugado de itraconazol presenta un mejor efecto antimicótico que el tratamiento convencional, lo cual está relacionado con la funcionalización de las NPs.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol frente al tratamiento convencional en un modelo *in vitro* de histoplasmosis.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antimicótica del nanobioconjugado en un modelo *in vitro* de histoplasmosis.
2. Evaluar la citotoxicidad del nanobioconjugado en un modelo *in vitro*.
3. Evaluar la especificidad del nanobioconjugado por macrófagos.
4. Evaluar el efecto inmunomodulador del nanobioconjugado en macrófagos infectados con *H. capsulatum*.

1.6. Referencias

1. Malcolm TR, Chin-Hong PV. Endemic Mycoses in Immunocompromised Hosts. *Curr Infect Dis Rep*. 2013 Dec 7;15(6):536–43.
2. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011 Nov; 49(8):785-98.
3. Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas DA, Cifuentes J, Taylor ML. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: An overview. *Rev Iberoam Micol*. 2014 Jan;31(1):11–5.
4. Rodrigues AM, Beale MA, Hagen F, Fisher MC, Terra PPD, de Hoog S, et al. The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. *Stud Mycol*. 2020 Sep;97:100095.
5. Teixeira M de M, Patané JSL, Taylor ML, Gómez BL, Theodoro RC, de Hoog S, et al. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. Vinetz JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jun; 1;10(6):e0004732.
6. Sepúlveda VE, Márquez R, Turissini DA, Goldman WE, Matute DR. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. Taylor JW, editor. *MBio*. 2017 Dec; 29;8(6): e01339-17.
7. Beyhan S, Sil A. Sensing the heat and the host: Virulence determinants of *Histoplasma capsulatum*. *Virulence*. 2019 Dec; 1;10(1):793–800.
8. Bonifaz A. Histoplasmosis. En: Mc Graw Hill Interamericana. *Micología médica básica*. 6th ed. México, D.F: McGraw Hill; 2020:327-347.
9. Guimarães AJ, Nosanchuk JD. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. *Front Microbiol*. 2011 Nov;2:225.
10. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Feb;41(1):13–30.

11. Ray SC, Rappleye CA. Flying under the radar: *Histoplasma capsulatum* avoidance of innate immune recognition. *Semin Cell Dev Biol*. 2019 May;89:91–98.
12. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, Sarosi GA. Histoplasmosis Infections Worldwide: Thinking Outside of the Ohio River Valley. *Curr Trop Med Reports*. 2015 Jun 11;2(2):70–80.
13. Negroni R. Histoplasmosis en América Latina. *Biomédica*. 2011 Mar 31;31(3):301.
14. Ashraf N, Kubat RC, Poplin V, Adenis AA, Denning DW, Wright L, et al. Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia*. 2020 Oct 10;185(5):843–865.
15. Manos NE, Ferebee SH, Kerschbaum WF. Geographic Variation in the Prevalence of Histoplasmin Sensitivity. *Dis Chest*. 1956 Jun;29(6):649–68.
16. Baddley J. Geographic Distribution of Endemic Fungal Infections among Older Persons, United States. *Emerg Infect Dis*. 2011 Sep;17(9):1664–9.
17. Nacher M, Leitao TS, Gómez BL, Couppié P, Adenis A, Damasceno L, et al. The Fight against HIV-Associated Disseminated Histoplasmosis in the Americas: Unfolding the Different Stories of Four Centers. *J Fungi*.
18. Cano-Torres JO, Olmedo-Reneaum A, Esquivel-Sánchez JM, Camiro-Zuñiga A, Pérez-Carrisoza A, Madrigal-Iberri C, et al. Progressive disseminated histoplasmosis in Latin America and the Caribbean in people receiving highly active antiretroviral therapy for HIV infection: A systematic review. *Med Mycol*. 2019 Oct 1;57(7):791–799.
19. Adenis AA, Valdes A, Cropet C, McCotter OZ, Derado G, Couppie P, et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2018 Oct;18(10):1150–1159.
20. Alvarez-Moreno C, Cortes J, Denning D. Burden of Fungal Infections in Colombia. *J Fungi*. 2018 Mar 21;4(2):41.
21. Jiménez RA, Urán ME, de Bedout C, Arango M, Tobón AM, Cano LE, et al. [Outbreak of acute histoplasmosis in a family group: identification of the infection

- source]. *Biomedica*. 2002 Jun;22(2):155–9.
22. Arango M, Castañeda E, Agudelo CI, De Bedout C, Agudelo CA, Tobón A, et al. Histoplasmosis: results of the Colombian national survey, 1992-2008. *Biomedica*. 31(3):344–56.
 23. Maiga AW, Deppen S, Scaffidi BK, Baddley J, Aldrich MC, Dittus RS, et al. Mapping *Histoplasma capsulatum* Exposure, United States. *Emerg Infect Dis*. 2018 Oct;24(10):1835–1839.
 24. Diaz JH. Environmental and Wilderness-Related Risk Factors for Histoplasmosis: More Than Bats in Caves. *Wilderness Environ Med*. 2018 Dec;29(4):531–540.
 25. Assi M, Martin S, Wheat LJ, Hage C, Freifeld A, Avery R, et al. Histoplasmosis After Solid Organ Transplant. *Clin Infect Dis*. 2013 Dec 1;57(11):1542–9.
 26. Hage CA, Bowyer S, Tarvin SE, Helper D, Kleiman MB, Joseph Wheat L. Recognition, Diagnosis, and Treatment of Histoplasmosis Complicating Tumor Necrosis Factor Blocker Therapy. *Clin Infect Dis*. 2010 Jan;50(1):85–92.
 27. Tobón ÁM. Protocolo de estudio y manejo de histoplasmosis. *Infectio*. 2012 Dec;16:126–8.
 28. Cherabie J, Mazi P, Rauseo A, Ayres C, Larson L, Rutjanaweck S, et al. Long-Term Mortality after *Histoplasma* Infection in People with HIV. *J Fungi*. 2021 May 8;7(5):369.
 29. Almeida M de A, Almeida-Silva F, Guimarães AJ, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. *Int J Infect Dis*. 2019 Sep;86:147–156.
 30. Gomez BL y Tobón AM. Histoplasmosis. En: Vesga O, Vélez L, Leiderman E, Restrepo ÁM. *Enfermedades infecciosas de Homo sapiens Tomo III*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2015: 304–336.
 31. Goodwin RA, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in Normal Hosts. *Medicine (Baltimore)*. 1981 Jul;60(4):231–266.

32. González A. Histoplasmosis. En: Tobón AM, López LF, Gómez BL. Fundamentos de las micosis humanas. 1st ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2018: 285–302.
33. Salzer HJF, Burchard G, Cornely OA, Lange C, Rolling T, Schmiedel S, et al. Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. *Respiration*. 2018;96(3):283–301.
34. Tobón AM, Gómez BL. Pulmonary Histoplasmosis. *Mycopathologia*. 2021 Oct 8;186(5):697–705.
35. Hage C, Azar M, Bahr N, Loyd J, Wheat L. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015 Sep 23;36(05):729–45.
36. Myint T, Leedy N, Villacorta Cari E, Wheat LJ. HIV-Associated Histoplasmosis: Current Perspectives. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2020 Mar 19;12:113–125.
37. Shen Q, Rappleye CA. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. *Curr Opin Microbiol*. 2017 Dec;40:1–7.
38. Mittal J, Ponce MG, Gendlina I, Nosanchuk JD. *Histoplasma Capsulatum*: Mechanisms for Pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2019;422:157-191.
39. Aravalli RN, Hu S, Woods JP, Lokensgard JR. *Histoplasma capsulatum* yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. *J Neuroinflammation*. 2008;5(1):30.
40. Goyal S, Castrillón-Betancur JC, Klaile E, Slevogt H. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. *Front Immunol*. 2018 Jun 4;9:1261.
41. Horwath MC, Fecher RA, Deepe GS. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. *Future Microbiol*. 2015 Jun;10(6):967–75.
42. Fischer M, Müller JP, Spies-Weisshart B, Gräfe C, Kurzai O, Hünninger K, et al. Isoform localization of Dectin-1 regulates the signaling quality of anti-fungal

- immunity. *Eur J Immunol*. 2017 May;47(5):848–59.
43. Huang JH, Liu CY, Wu SY, Chen WY, Chang TH, Kan HW, et al. NLRX1 Facilitates *Histoplasma capsulatum*-Induced LC3-Associated Phagocytosis for Cytokine Production in Macrophages. *Front Immunol*. 2018 Dec 3;9.
 44. Newman SL, Gootee L, Gabay JE, Selsted ME. Identification of Constituents of Human Neutrophil Azurophil Granules That Mediate Fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. Mansfield JM, editor. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5668–72.
 45. Van Prooyen N, Henderson CA, Hocking Murray D, Sil A. CD103+ Conventional Dendritic Cells Are Critical for TLR7/9-Dependent Host Defense against *Histoplasma capsulatum*, an Endemic Fungal Pathogen of Humans. Klein BS, editor. *PLOS Pathog*. 2016 Jul 26;12(7):e1005749.
 46. Chang TH, Huang JH, Lin HC, Chen WY, Lee YH, Hsu LC, et al. Dectin-2 is a primary receptor for NLRP3 inflammasome activation in dendritic cell response to *Histoplasma capsulatum*. Sil A, editor. *PLOS Pathog*. 2017 Jul 3;13(7):e1006485.
 47. Cano LE, Rojas W, Gómez LM, Aristizabal B, Lopera D. Respuesta inmune en las infecciones por hongos. En: Rojas W, Anaya JM, Cano LE, Aristizabal BH, Gómez LM. *Inmunología de Rojas*. 18th ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2018:345–55.
 48. Pitangui Nde S, Sardi Jde C, Voltan AR, dos Santos CT, da Silva Jde F, da Silva RA, et al. An Intracellular Arrangement of *Histoplasma capsulatum* Yeast-Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. *Front Microbiol*. 2016 Jan 11;6:1526.
 49. Edwards JA, Alore EA, Rappleye CA. The Yeast-Phase Virulence Requirement for α -Glucan Synthase Differs among *Histoplasma capsulatum* Chemotypes. *Eukaryot Cell*. 2011 Jan;10(1):87–97.
 50. Garfoot AL, Dearing KL, VanSchoiack AD, Wysocki VH, Rappleye CA. Eng1 and Exg8 Are the Major α -Glucanases Secreted by the Fungal Pathogen *Histoplasma*

- capsulatum. *J Biol Chem*. 2017 Mar;292(12):4801–10.
51. Garfoot AL, Rappleye CA. Histoplasma capsulatum surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. *FEBS J*. 2016 Feb;283(4):619–33.
 52. Holbrook ED, Smolnycki KA, Youseff BH, Rappleye CA. Redundant Catalases Detoxify Phagocyte Reactive Oxygen and Facilitate Histoplasma capsulatum Pathogenesis. Deepe GS, editor. *Infect Immun*. 2013 Jul;81(7):2334–46.
 53. Dade J, DuBois JC, Pasula R, Donnell AM, Caruso JA, Smulian AG, et al. Hc Zrt2, a zinc responsive gene, is indispensable for the survival of Histoplasma capsulatum in vivo. *Med Mycol*. 2016 Nov 1;54(8):865–75.
 54. Johnson PC. Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B Compared with Conventional Amphotericin B for Induction Therapy of Histoplasmosis in Patients with AIDS. *Ann Intern Med*. 2002 Jul 16;137(2):105.
 55. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):807–25.
 56. Murray M, Hine P. Treating progressive disseminated histoplasmosis in people living with HIV. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Apr 28;4(4):CD013594.
 57. Hendrix MJ, Larson L, Rauseo AM, Rutjanawech S, Franklin AD, Powderly WG, et al. Voriconazole Versus Itraconazole for the Initial and Step-down Treatment of Histoplasmosis: A Retrospective Cohort. *Clin Infect Dis*. 2021 Dec 6;73(11):e3727–32.
 58. Wheat LJ, Connolly P, Smedema M, Brizendine E, Hafner R. Emergence of Resistance to Fluconazole as a Cause of Failure during Treatment of Histoplasmosis in Patients with Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome. *Clin Infect Dis*. 2001 Dec;33(11):1910–3.
 59. Bongomin F, Kwizera R, Baruch Baluku J, Grace Asio L, A. Otu A. Treatment of Histoplasmosis. in: *Histoplasma and Histoplasmosis*. IntechOpen; 2020.

60. Tragiannidis A, Gkampeta A, Vousvouki M, Vasileiou E, Groll AH. Antifungal agents and the kidney: pharmacokinetics, clinical nephrotoxicity, and interactions. *Expert Opin Drug Saf.* 2021 Sep 2;20(9):1061–74.
61. Lewis RE. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc.* 2011 Aug;86(8):805–17.
62. Wade RL, Chaudhari P, Natoli JL, Taylor RJ, Nathanson BH, Horn DL. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jul;76(3):361–7.
63. Kyriakidis I, Tragiannidis A, Munchen S, Groll AH. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opin Drug Saf.* 2016 Dec 16;1–17.
64. Caceres DH, Valdes A. Histoplasmosis and Tuberculosis Co-Occurrence in People with Advanced HIV. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2019 Aug 9;5(3):73.
65. Zong L, Li X, Wang H, Cao Y, Yin L, Li M, et al. Formulation and characterization of biocompatible and stable I.V. itraconazole nanosuspensions stabilized by a new stabilizer polyethylene glycol-poly(β -Benzyl- L -aspartate) (PEG-PBLA). *Int J Pharm.* 2017 Oct;531(1):108–17.
66. Rabinow B, Kipp J, Papadopoulos P, Wong J, Glosson J, Gass J, et al. Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *Int J Pharm.* 2007 Jul;339(1–2):251–60.
67. Spellberg B. The Maturing Antibiotic Mantra: “Shorter Is Still Better.” *J Hosp Med.* 2018 May 1;13(5):361-362.
68. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015 Apr;40(4):277–83.
69. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release.* 2016 Feb 28;224:86–102.
70. Fernando S, Gunasekara T, Holton J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and

- mechanisms of action. *Sri Lankan J Infect Dis*. 2018 May 6;8(1):2.
71. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem*. 2019 Nov;12(7):908–31.
 72. Biswaro LS, Garcia MP, da Silva JR, Neira Fuentes LF, Vera A, Escobar P, et al. Itraconazole encapsulated PLGA-nanoparticles covered with mannose as potential candidates against leishmaniasis. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2019 Apr;107(3):680–687.
 73. Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011 Dec;156(2):128–45.
 74. Cunha-Azevedo EP, Py-Daniel KR, Siqueira-Moura MP, Bocca AL, Felipe MSS, Tedesco AC, et al. In vivo evaluation of the efficacy, toxicity and biodistribution of PLGA-DMSA nanoparticles loaded with itraconazole for treatment of paracoccidioidomycosis. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018 Jun;45:135–141.
 75. Chenthamara D, Subramaniam S, Ramakrishnan SG, Krishnaswamy S, Essa MM, Lin F-H, et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res*. 2019 Dec 21;23(1):20.
 76. Tarudji AW, Kievit FM. Active targeting and transport. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020:19–36.
 77. Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release*. 2008 Feb 11;125(3):210-27.
 78. Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Jun;43(6):485–96.
 79. Qi H, Shan P, Wang Y, Li P, Wang K, Yang L. Nanomedicines for the Efficient Treatment of Intracellular Bacteria: The “ART” Principle. *Front Chem*. 2021 Oct 20;9:775682.
 80. Andrade RGD, Reis B, Costas B, Lima SAC, Reis S. Modulation of Macrophages

M1/M2 Polarization Using Carbohydrate-Functionalized Polymeric Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2020 Dec 28;13(1):88.

81. Barros D, Costa Lima SA, Cordeiro-da-Silva A. Surface functionalization of polymeric nanospheres modulates macrophage activation: relevance in Leishmaniasis therapy. *Nanomedicine*. 2015 Feb;10(3):387–403.
82. Sánchez A, Mejía SP, Orozco J. Recent Advances in Polymeric Nanoparticle-Encapsulated Drugs against Intracellular Infections. *Molecules*. 2020 Aug 18;25(16):3760.
83. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res*. 2016 Oct 14;33(10):2373–87.
84. Elmowafy EM, Tiboni M, Soliman ME. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *J Pharm Investig*. 2019 Jul 16;49(4):347–80.
85. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv*. 2015 Jan;6(1):41–58.
86. Sequeira JAD, Pereira I, Ribeiro AJ, Veiga F, Santos AC. Surface functionalization of PLGA nanoparticles for drug delivery. In: *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*. Elsevier; 2020. p. 185–203.
87. Alhowyan AA, Altamimi MA, Kalam MA, Khan AA, Badran M, Binkhathlan Z, et al. Antifungal efficacy of Itraconazole loaded PLGA-nanoparticles stabilized by vitamin-E TPGS: In vitro and ex vivo studies. *J Microbiol Methods*. 2019 Jun;161:87–95.
88. Khan AA, Alanazi AM, Jabeen M, Khan S, Malik A. Additive potential of combination therapy against cryptococcosis employing a novel amphotericin B and fluconazole loaded dual delivery system. *Eur J Pharm Sci*. 2018 Jul;119:171–178.
89. Dube A, Reynolds JL, Law W-C, Maponga CC, Prasad PN, Morse GD. Multimodal nanoparticles that provide immunomodulation and intracellular drug delivery for infectious diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2014

May;10(4):831–8.

90. Barros D, Costa Lima SA, Cordeiro-da-Silva A. Surface functionalization of polymeric nanospheres modulates macrophage activation: relevance in Leishmaniasis therapy. *Nanomedicine*. 2015 Feb;10(3):387–403.
91. Dennis AM, Delehanty JB, Medintz IL. Emerging Physicochemical Phenomena along with New Opportunities at the Biomolecular–Nanoparticle Interface. *J Phys Chem Lett*. 2016 Jun 2;7(11):2139–50.
92. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*. 2017 Dec 29;15(1):53.
93. Dos Anjos Cassado A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:161-179.
94. Hamann J, Koning N, Pouwels W, Ulfman LH, van Eijk M, Stacey M, et al. EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol*. 2007 Oct;37(10):2797–802.
95. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. 1981;11(10):805–15.

Capítulo II

2.1. Trabajo de investigación

Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol frente al tratamiento convencional en un modelo *in vitro* de histoplasmosis

Daniela López Buitrago^{1, 2*}, Susana P. Mejía^{3, 2}, Luz E. Cano².

¹ Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Maestría en Microbiología

² Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

³ Grupo Tándem Max Planck en Nanobioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

*Correspondencia autor: daniela-lb@hotmail.com

2.2. Resumen

La Histoplasmosis (HPM) es una micosis de importancia en América Latina que puede afectar tanto individuos inmunosuprimidos como inmunocompetentes. Su tratamiento representa un reto debido entre otras cosas, a la dificultad para alcanzar dosis adecuadas a nivel intracelular y a las interacciones farmacológicas que pueden presentarse en algunos pacientes polimedcados, lo cual hace que se requieran dosis repetidas durante largo plazo y se ocasionen efectos adversos como hepatotoxicidad. La nanomedicina permite encapsular fármacos, dirigirlos selectivamente a poblaciones celulares específicas y ofrecer una liberación sostenida en el sitio objetivo, alcanzando así niveles terapéuticos intracelulares que ayudan a minimizar los efectos secundarios, las interacciones no deseadas y demás problemas de la terapia convencional. En el presente estudio se evaluó ITZ encapsulado en NPs de PLGA funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 para su liberación dirigida y controlada en macrófagos infectados con el hongo *H. capsulatum*. El método de microdilución para levadura (M27-A3) y el ensayo MTT permitieron determinar que la CMI es 0,015 µg/mL para NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80. El ensayo de citotoxicidad, demostró que ninguna de las concentraciones utilizadas de ITZ libre, encapsulado en NPs y funcionalizado con anticuerpos anti F4/80 fue tóxica para los macrófagos J774A.1, las cuales mantuvieron una viabilidad > 80%. La cuantificación de

unidades formadoras de colonias (UFC) mostró que el tratamiento con ITZ encapsulado y funcionalizado (NPs-ITZ-F4/80) proporciona un mayor efecto antimicótico contra *H. capsulatum* en co-cultivo con macrófagos J774A.1. Cabe destacar que dicha nanoformulación redujo significativamente el número de UFC en comparación con el ITZ encapsulado sin funcionalizar (NPs-ITZ). La microscopía de fluorescencia confirmó que existe una mayor captación celular de las NPs cuando están funcionalizadas en comparación con las NPs sin funcionalizar, lo cual sugiere que la efectividad del tratamiento con NPS-ITZ-F4/80 observado en los ensayos de UFC, puede deberse a un aumento en la concentración de ITZ a nivel intracelular. Adicionalmente, los análisis de PCR en tiempo real evidenciaron que el tratamiento con las nanoformulaciones de ITZ (NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80) redujeron significativamente la expresión de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en comparación con el ITZ libre. Sin embargo, esta expresión se redujo aún más cuando las nanocápsulas se funcionalizaron con anticuerpos anti F4/80, indicando que los anticuerpos podrían ejercer un efecto inmunomodulador adicional.

Palabras claves: histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, macrófago, itraconazol, PLGA, nanopartículas funcionalizadas, receptor F4/80.

2.3. Abstract

Histoplasmosis (HPM) is an important mycosis in Latin America that can affect both immunosuppressed and immunocompetent individuals. Its treatment represents a challenge due (among other reasons) to the difficulty in reaching adequate doses at the intracellular level and to the pharmacological interactions that can occur in some polymedicated patients requiring repeated doses over a long period of time and causing side effects such as hepatotoxicity. Nanomedicine allows drug encapsulation, selectively target them to specific cell populations and provide sustained release at the target site reaching intracellular therapeutic levels that help minimize side effects as well as unwanted interactions and other problems of conventional therapy. In the current study ITZ encapsulated in PLGA NPs functionalized with anti-F4/80 antibodies was evaluated for its targeted and controlled release in macrophages infected with *H. capsulatum*. The microdilution method for *H. capsulatum* yeast (M27-A3) and the MTT assay showed that

the MIC is 0.015 µg/mL for NPs-ITZ and NPs-ITZ-F4/80. The cytotoxicity technique proved that none of the concentrations used of free ITZ, encapsulated in NPs and/or functionalized with the anti-F4/80 antibody was toxic to J774A.1 macrophages which maintained > 80% viability. The quantification of Colony Forming Units (CFU) showed that treatment with encapsulated and functionalized ITZ (NPs-ITZ-F4/80) provides a greater antifungal effect against *H. capsulatum* in co-culture with J774A.1 macrophages. This nanoformulation significantly reduced the number of CFUs compared to the non-functionalized encapsulated ITZ (NPs-ITZ). Fluorescence microscopy confirmed that there is a higher cellular uptake of NPs when functionalized are compared to non-functionalized NPs, suggesting that the effectiveness of NPS-ITZ-F4/80 treatment observed in the CFU trials may be due to an increase in the concentration of ITZ at the intracellular level. Additionally, real-time PCR analysis showed that treatment with ITZ nanoformulations (NPs-ITZ and NPs-ITZ-F4/80) significantly reduced the expression of IL-1 β , IL-6 and IL-10 compared to free ITZ. However, this expression was further reduced when nanocapsules were functionalized with anti-F4/80 antibodies, indicating that the antibodies could exert an additional immunomodulatory effect.

2.4. Introducción

La histoplasmosis (HPM) es una micosis sistémica de origen pulmonar primario, que puede afectar tanto individuos inmunosuprimidos como inmunocompetentes [1]. Es causada por la inhalación de aerosoles que contienen las partículas infectantes (microconidias y pequeños fragmentos miceliares) del hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Esta micosis ha sido reportada en más de 60 países en todos los continentes, pero es altamente endémica en las Américas [2]. La presentación clínica de la HPM abarca la forma pulmonar aguda (HPA) (también conocida como epidémica), la pulmonar crónica (HPC) y la forma diseminada progresiva (HDP). Esta última ocurre especialmente en los pacientes infectados por el VIH, cuyos recuentos de CD4 son inferiores a 150 células/ μ L [3,4]. Desde 1987 ha sido considerada como una infección definitoria del SIDA [5], y una de las principales causas de muerte entre los pacientes coinfectados, alcanzando tasas de mortalidad superiores al 30% en el continente Americano [6–8].

Si bien, la HPM puede tratarse con diferentes antifúngicos, el ITZ es considerada la primera elección para el tratamiento de las formas leves y moderadas, sin embargo, la duración de este puede ser de al menos 12 meses para las formas pulmonares (aguda y crónica), y tiempos aún mayores para la forma diseminada progresiva [9]. Esto ocasiona efectos adversos como la hepatotoxicidad, la cual ha sido el evento de mayor frecuencia y relevancia para todos los agentes antifúngicos, y puede variar desde anomalías leves en pruebas funcionales del hígado hasta falla hepática fatal [10,11]. Algunas de las diferentes formulaciones comerciales de ITZ de uso oral (cápsulas y solución) e intravenoso (infusión) contienen hidroxipropil- β -ciclodextrina [12,13], un coadyuvante que mejora su solubilidad y biodistribución. Sin embargo, este compuesto está contraindicado en pacientes con insuficiencia renal por problemas en la eliminación eficiente de este excipiente [14]. Su compuesto activo presenta otras limitaciones como alta lipofilia, baja capacidad de absorción y biodisponibilidad sistémica, alta susceptibilidad del compuesto activo a hidrólisis gastrointestinal e interacciones medicamentosas mediadas a través del sistema de la enzima 3A4 del citocromo P450, lo que sugiere sumo cuidado cuando se usa ITZ como parte de un tratamiento con múltiples medicamentos [13–17]. Además, por tratarse de una infección intracelular, los tratamientos en general ofrecen una eficacia limitada debido a que los fármacos no pueden alcanzar niveles terapéuticos [18,19], ya que muchos de ellos se degradan antes de llegar a los tejidos o células diana [20].

Por lo tanto, ha surgido la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes que acorten el tiempo del tratamiento y disminuyan la presentación de efectos secundarios adversos de los fármacos empleados en este tipo de infección. La nanotecnología ha permitido la administración selectiva de fármacos en nanopartículas y su posterior liberación en el sitio objetivo mediante la funcionalización activa con moléculas como proteínas, anticuerpos, carbohidratos, péptidos, etc. [21]. Las NPs funcionalizadas permiten una mayor internalización celular y tienen el potencial de aumentar considerablemente la estabilidad y biodisponibilidad sistémica del fármaco ya que protegen las características fisicoquímicas y evitan una posible degradación antes que alcance su blanco terapéutico, logrando así concentraciones adecuadas a nivel intracelular, que posibilitan la eliminación del patógeno y previenen la generación de resistencia, al tiempo que evita la acumulación inespecífica de fármaco en otros tejidos y

disminuye la toxicidad y aparición de efectos secundarios adversos [22,23]. Adicionalmente, el uso de nanobioconjugados puede favorecer la modulación de la respuesta inmune, potenciando el efecto del tratamiento [24].

Pese a lo anterior, en este campo se han desarrollado una gran cantidad de estudios sobre el uso de NPs poliméricas funcionalizadas como sistemas para administrar selectivamente fármacos (antimicrobianos, antivirales, antimicóticos y antiparasitarios), empleando diferentes modelos experimentales [25–27]. Sin embargo, a la fecha son pocas las investigaciones que evalúan el efecto de dichos sistemas en el tratamiento de la HPM [28].

En este contexto, dado que dichos efectos adversos se deben sobre todo a la acción del fármaco fuera de los macrófagos, las principales células efectoras en la resistencia del hospedero sobre la HPM; el uso de ITZ encapsulado en nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), un polímero altamente biodegradable y biocompatible [29] y su funcionalización con anticuerpos anti F4/80, una proteína expresada en varias poblaciones de macrófagos tisulares murinos [30], cuyo homólogo en humanos es el receptor 1 de la hormona similar a la mucina (EMR1), específico de eosinófilos [31], se plantea como una solución terapéutica para esta infección intracelular.

Con base en lo anteriormente expuesto, en este estudio, nos propusimos evaluar el efecto antimicótico de un nanobioconjugado de ITZ frente al tratamiento convencional en un modelo *in vitro* de HPM (Figura 1).

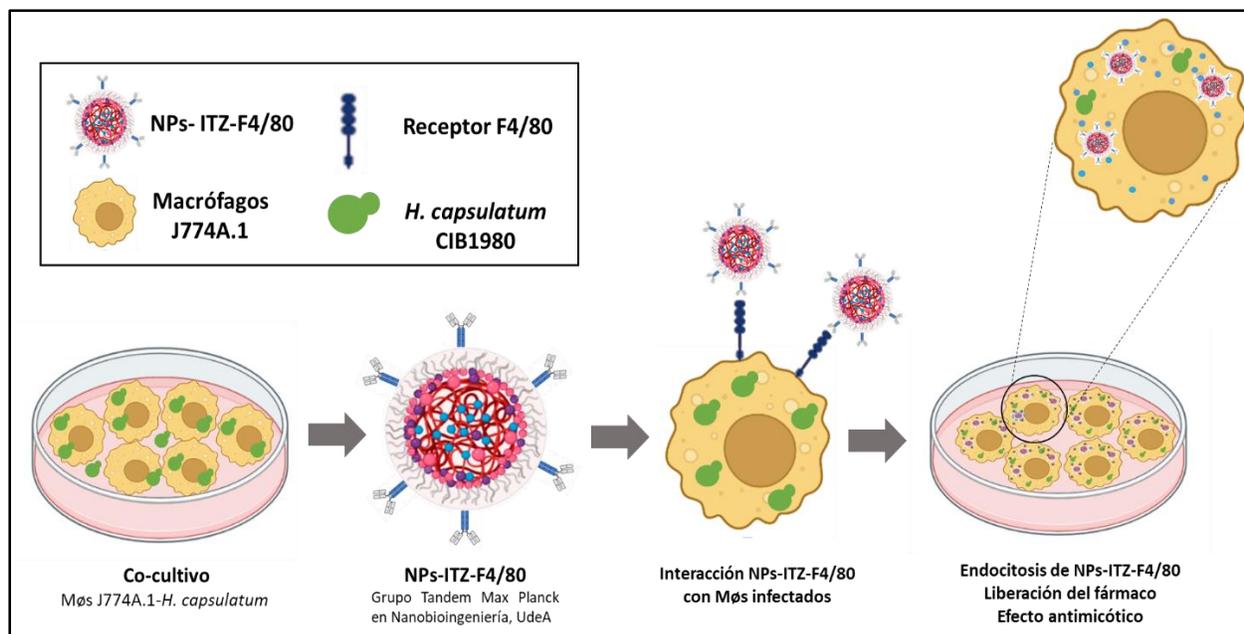


Figura 1. Modelo experimental. Se implementó un modelo *in vitro* de HPM y se trató con un nanobioconjugado de ITZ (NPs-ITZ-F4/80) desarrollado por el grupo Tandem Max Planck en Nanobioingeniería de la Universidad de Antioquia. Los anticuerpos anti F4/80 empleados para la funcionalización de las NPs, favorecen las interacciones con la membrana celular de los macrófagos J774A.1 que expresan el receptor F4/80, permitiendo una mayor endocitosis del nanobioconjugado, y un aumento en la concentración del fármaco a nivel intracelular donde se localiza *H. capsulatum* y, por ende, se genera un mayor efecto antimicótico.

2.5. Materiales y métodos

2.5.1. Procedimientos de laboratorio y condiciones de cultivo

Reactivos

Itraconazol (ITZ, CAS 84625-61-6), solución salina tamponada con fosfato (PBS D8573). Kit MTT TOX-1, caldo HMM (medio nutritivo Ham's F-12, N6760), Janus Green B (CAS 2869-83-2), aminoácidos no esenciales (CAS M7145), calcofluor White (CAS 18909), TRIZOL® (Ref. 15596026) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos). El suero fetal bovino (FBS) (Ref. 16000044), el medio Dulbecco's Modified Eagle

(DMEM, Ref. 10569010), el buffer verseno y el antibiótico penicilina-estreptomicina (Ref. 15140122) se adquirieron de Gibco (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) y el dimetilsulfóxido (DMSO, CAS 67-68-5) se compraron a Merck. El anticuerpo F4/80 (ab100790), el isotipo IgG (ab171870), y el Alexa flour 488 (ab150077) se obtuvieron de Abcam (Abcam, Cambridge, Reino Unido). El agar infusión cerebro-corazón (BHI, por su sigla en inglés Brain Heart Infusion) se adquirió de Difco Laboratories (Difco Laboratories, Ref. 211065, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6) se adquirió de Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos). DNasa I (Ref. 4368814) y el kit RT-qPCR (Ref. 08-24-00020) se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, Estados Unidos). El kit HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) se compró a Solis BioDyne (Tartu, Estonia). Se prepararon tampón de citrato 0,1 M (pH 4,5-5,5), tampón MES 50 mM (pH 6,0-6,5), buffer HEPES 50 mM (pH 7,0) y buffer PBS 0,1 M (pH 6,5) disolviendo los reactivos recibidos en agua Milli-Q filtrada por membrana de 0,2 µm.

Condiciones de crecimiento fúngico

H. capsulatum var. *capsulatum* aislado *H. capsulatum* CIB1980, fue obtenido de la colección de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia. Las levaduras se cultivaron en agar BHI, suplementado con glóbulos rojos de carnero al 5%, L-cistina al 0,1% y glucosa al 1% a 37 °C, 5% CO₂, y se realizaron repiques cada 5 días. Del cultivo en BHI se tomaron colonias y se cultivaron en 10 mL de Ham's F-12 suplementado con glucosa (18,2 g/L), ácido glutámico (1 g/L), HEPES (6 g/L) y L-cistina (8,4 mg/L) a 37 °C con agitación (150 rpm, Innova® 44, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos), durante 48 horas para alcanzar su fase de crecimiento exponencial. Para separar las células fúngicas agregadas, se pasó 30 veces la suspensión de levaduras a través de una jeringa de tuberculina de 1 mL con aguja de 27 G ½ y para aislar las levaduras individuales, se dejó dicha suspensión en posición vertical durante 1 minuto, luego se tomó 5 mL de la parte superior. La viabilidad se determinó con el colorante vital Janus Green B y las suspensiones celulares se ajustaron al valor necesario de levaduras/mL según el recuento en hemocitómetro.

Línea celular y condiciones de cultivo

La línea celular de macrófagos peritoneales murinos J774A.1, se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos), se cultivó en medio DMEM que contenía glucosa y L-glutamina, suplementado con suero bovino fetal 10%, aminoácidos no esenciales 1% y penicilina/estreptomicina al 1% para evitar la contaminación con bacterias. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5% para asegurar una atmósfera húmeda saturada. Los medios de cultivo se cambiaron cada 2-3 días y las células se subcultivaron cada que alcanzaran un 90% de confluencia.

Ensamblaje de nanopartículas y funcionalización

Las NPs fueron ensambladas y funcionalizadas con el anticuerpo anti F4/80 por el grupo Tandem Max Planck en Nanobioingeniería [28], usando para su diseño materiales como PLGA, TPGS, Kolliphor® P188, Rojo de Nilo o ITZ.

2.5.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para evaluar la actividad antifúngica del ITZ encapsulado en NPs funcionalizadas y de los diferentes materiales por los que están compuestas las NPs frente al ITZ libre contra *H. capsulatum* CIB1980, se utilizó el método de microdilución para levadura (M27-A3) descrito por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). La suspensión de levadura se preparó en medio Ham's F-12 que es la composición base del medio HMM (Histoplasma- macrophage medium) y en una placa de 96 pocillos fondo en u, se añadió en 100 µL un total de $1,5 \times 10^5$ levaduras/ pozo, de acuerdo a los resultados de estudios previos (datos no mostrados). Las diluciones de cada tratamiento: ITZ libre (ITZ), ITZ encapsulado (NPs-ITZ) e ITZ encapsulado y funcionalizado (NPs-ITZ-F4/80) y NPs-vacías, se prepararon en el mismo medio que se preparó la levadura más dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%. Se adicionó a cada pocillo 100 µL de los diferentes tratamientos a concentraciones desde 0,125 a 0,0018 µg/mL. Se utilizaron NPs-vacías, medio con DMSO al 0,5% y levaduras sin tratar como control. Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días con aireación en un agitador mecánico (150 rpm, Innova® 44, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). Una vez se determinó el crecimiento del hongo mediante turbidez visible con ayuda de un espejo invertido, se

evaluó su viabilidad usando el método bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT). Brevemente, se adicionó 20 μL de MTT y se incubó durante 3 horas a 37 °C en 5% de CO_2 . Después, se añadió 130 μL de solución solubilizadora para disolver los cristales de formazán formados a partir de la ruptura del anillo tetrazolio por parte de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. Luego, se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. La densidad óptica (DO) de los cristales de formazán se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placas ELISA BioTek ELx808 (BioTek, Winooski, VT). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja de tratamiento que puede inhibir el crecimiento fúngico. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.5.3. Evaluación de la citotoxicidad del nanobioconjugado en macrófagos

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos (Falcon®), se adhirieron 3×10^4 macrófagos J774A.1 por pocillo en 200 μL de DMEM con 10% suero bovino fetal durante 17 h a 37°C y 5% CO_2 , de acuerdo a resultados de experimentos previos (datos no mostrados). Luego se adicionó 0,031, 0,015 y 0,007 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ITZ, NPs-ITZ, NPs-ITZ-F4/80 y NPs-vacías y se incubaron durante 3 y 24 h a 37 °C, 5% CO_2 . El grupo control se mantuvo en medio DMEM- GlutaMax suplementado con 3% SBF y 0,5% DMSO. Pasado el respectivo tiempo de incubación se realizó el ensayo MTT, como se describió anteriormente. La densidad óptica (DO) de los cristales de formazán se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placas ELISA BioTek ELx808 (BioTek, Winooski, VT). El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando la siguiente ecuación: $\text{viabilidad (\%)} = \text{DO grupo tratamiento} / \text{DO grupo control} \times 100$. Los experimentos se realizaron por triplicado en dos ensayos independientes.

2.5.4. Estudio de la actividad antimicótica del nanobioconjugado en un modelo celular in vitro

Antes de la infección con *H. capsulatum*, se añadió a la placa de 96 pozos (Falcon®) 3×10^4 macrófagos J774A.1 por pocillo en 200 μL de DMEM con 10% suero bovino fetal

durante 17 h a 37 °C, 5% CO₂. Cada monocapa de macrófagos se infectó con 100 µL de inóculo de levadura (1,5 ×10⁵ levaduras) preparado en medio DMEM sin suplementar (relación macrófago: levadura de 1:5. La placa se incubó a 37 °C, 5% CO₂ durante 3 h para permitir el proceso de fagocitosis). Para los ensayos de infección, el tiempo de 3 h posterior a la infección se seleccionó en función de un estudio cinético previo que mostró en ese momento de la infección, un mayor número de levaduras internalizadas por los macrófagos J774A.1 (datos no mostrados). Posteriormente, para evaluar el crecimiento del hongo, se tomó la suspensión de levaduras solas usadas como control. Por su parte, los co-cultivos se lavaron 2 veces con PBS estéril atemperado para eliminar las levaduras que no fueron fagocitadas por los macrófagos. Luego, se agregó 100 µL de los diferentes tratamientos: ITZ libre (ITZ), ITZ encapsulado (NPs-ITZ) e ITZ encapsulado y funcionalizado (NPs-ITZ-F4/80) y NPs-vacías a concentraciones de 0,031 y 0,015 µg/mL, y 0,007 µg/mL (teniendo en cuenta el resultado de la CMI) y se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h. Como control se tuvo monocapas de macrófagos J774A.1 infectadas no tratadas y tratadas con DMSO al 0,5%. Los co-cultivos tratados con 0,007 µg/mL, fueron lavados a las 6 h de incubación para eliminar las NPs no endocitadas y se agregó medio nuevo. La placa se incubó nuevamente durante 18 h bajo las mismas condiciones. Posteriormente, a los co-cultivos tratados por 6 h o 24 h se les retiró el sobrenadante, se diluyó cinco veces (1/5) en PBS y se sembró en agar BHI suplementado. Por otro lado, a cada pozo se le adicionó 200 µL de agua estéril fría para lisar las células y recuperar las levaduras que habían sido fagocitadas por los macrófagos. La suspensión del lisado se diluyó 5 veces (1/5) con PBS, se sembró en agar BHI suplementado. Los medios BHI con los sobrenadantes y lisados de los co-cultivos, se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ durante 7 días. Pasado el tiempo de incubación se realizó recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Los experimentos se realizaron por triplicado en dos ensayos independientes.

2.5.5. Especificidad del nanobioconjugado

Para este ensayo, 3 × 10⁵ macrófagos J774A.1 se adhirieron a una placa de 96 pocillos durante 17 h en DMEM 10% SBF. Se tiñeron 1,5 × 10⁵ levaduras de *H. capsulatum* con 100 µg/mL de calcofluor White durante 15 min a 37 °C y se añadieron a sus respectivas

monocapas de macrófagos y la placa se incubó durante 3 h a 37 °C, 5% CO₂. Después del tiempo de incubación, las monocapas se lavaron dos veces con PBS previamente atemperado. Posteriormente, se adicionaron 100 µg/mL de NPs con Rojo de Nilo encapsulado, funcionalizadas (o no) con anticuerpos anti F4/80 y se incubaron a 37°C durante 6 horas con 5% de CO₂. Los co-cultivos se lavaron dos veces con PBS previamente atemperado para eliminar las NPs que no fueron endocitadas y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Los co-cultivos con los respectivos tratamientos, se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. La determinación del Rojo de Nilo dentro de las células se midió indirectamente para determinar las diferencias en la especificidad del ligando F4/80, a una longitud de onda de emisión de 473 nm. Para corroborar la captación de las NPs y co-localizarlas, se tiñó el citoplasma de las células con yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6) el cual se utilizó en la región espectral verde, excitándose a una longitud de onda de 484 nm y emitiendo a 501 nm.

2.5.6. Análisis de PCR en tiempo real (qPCR)

Los macrófagos J774A.1 se sembraron a una concentración de 1×10^5 células / pocillo en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Las respectivas monocapas de macrófagos, se infectaron con 150 µL de inóculo de levadura (5×10^5 levaduras) y se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 3 h. Posteriormente, se trataron durante 6 h con los diferentes tratamientos (ITZ, NPs-ITZ, NPs-ITZ-F4/80 y NPs-vacías) a una concentración de 0,007 µg/mL, se lavaron para eliminar las NPs que no fueron fagocitadas y se incubaron nuevamente durante 18 h. Después del tiempo de incubación, se retiraron los sobrenadantes y para desprender las células, se adicionó a cada pocillo 100 µL de buffer verseno frío durante 5 min y se obtuvo el RNA total utilizando TRIzol®. El ARN aislado se trató con DNasa I. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) utilizando 500 ng de ARN tratado con el kit de síntesis de ADNc Maxima First Strand para RT-qPCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se realizó usando HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para medir los niveles de expresión génica se empleó el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, California, USA). El análisis de la

curva de fusión se realizó después del último ciclo de amplificación de los ensayos de PCR en tiempo real para verificar la veracidad de los amplicones obtenidos y descartar aquellos resultados relacionados con amplificación inespecífica o formación de dímeros de primer. La validación de los genes control para la normalización de la expresión del ARN mensajero (ARNm) se realizó antes del análisis de expresión génica. Se evaluó la expresión de genes relacionados con una respuesta inflamatoria IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ y antiinflamatoria IL-10. La medición de la expresión del ARNm se obtuvo mediante cuantificación relativa, comparando el nivel de expresión del gen diana con la expresión del gen que codifica GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, gen de control de expresión). El experimento se repitió dos veces y el nivel de expresión génica medido se realizó por triplicado. Las secuencias de los primers se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de primers

Gen	Primer forward (5' - 3')	Primer reverse (5' - 3')
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA	GCGGCACGTCAGATCCA
IL-1 β	CTTCAAATCTCGCAGCAGCACATC	TCCACGGGAAAGACACAGGTAGC
IL-6	CAACCACGGCCTTCCCTACTTC	TCTCATTTCCACGATTTCCCAGAG
IL-10	TGGGTTGCCAAGCCTTATCGG	CTCACCCAGGGAATTCAAATGCTC
IFN- γ	GACATGAAAATCCTGCAGAGCCAG	TCGCCTTGCTGTTGCTGAAGAAG
TNF- α	GACAAGGCTGCCCGACTACG	CTTGGGGCAGGGGCTCTTGAC

GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IL, interleuquina; IFN- γ , interferón gamma; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa.

2.5.7. Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos se usó el software GraphPad Prism (versión 8.0). Para todos los valores, la normalidad se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizaron medianas y rango intercuartílico para analizar los niveles de expresión de citoquinas. El análisis de varianza entre múltiples grupos experimentales se realizó mediante la prueba ANOVA y las diferencias entre los grupos se analizó mediante la prueba de Tukey. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

2.6. Resultados

2.6.1. Actividad antimicótica del nanobioconjugado

Empleando el método de turbidez macroscópica (datos no mostrados) y el ensayo MTT se observó una disminución significativa entre la concentración de 0,007 $\mu\text{g/mL}$ y 0,0035 $\mu\text{g/mL}$ de ITZ ($p < 0,0001$) y entre las concentraciones de 0,015 $\mu\text{g/mL}$ y 0,007 $\mu\text{g/mL}$ de NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80 ($p < 0,0001$) indicando que la CMI para ITZ era de 0,007 $\mu\text{g/mL}$ y 0.015 $\mu\text{g/mL}$ para NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80. Comparado con el grupo control de levadura, todos los grupos tratados con cada uno de los componentes de las NPs, mostraron un efecto similar de inhibición del hongo ($p < 0,0001$). Así mismo, comparado con el control de levadura, se observó una disminución significativa independiente de la concentración en los grupos tratados con NPs-vacías ($p < 0,0001$), señalando que dichas moléculas podrían estar favoreciendo el efecto del fármaco (Figura 2).

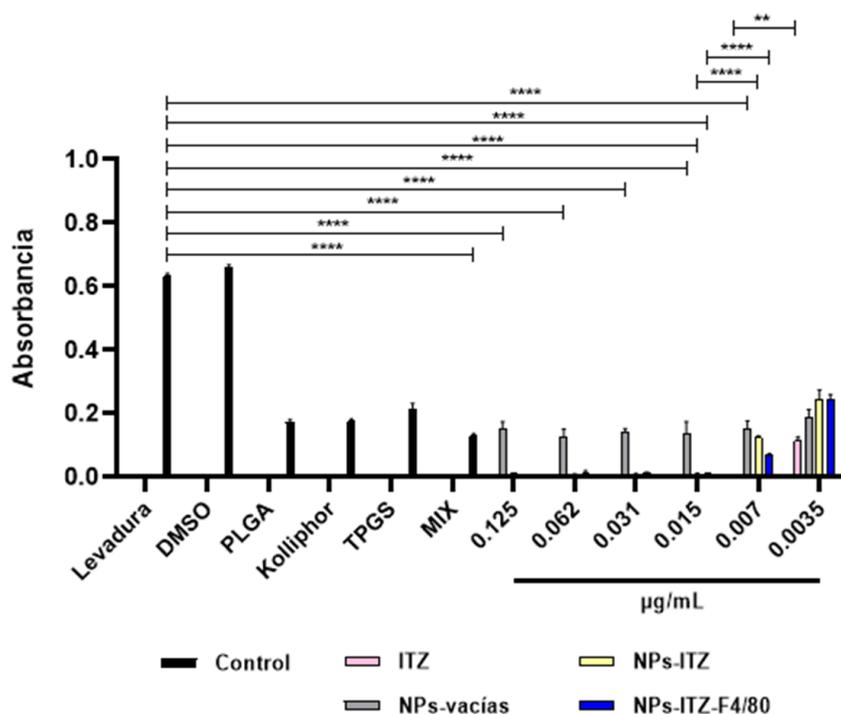


Figura 2. Comparación de la actividad antimicótica de ITZ, NPs-ITZ, NPs-ITZ-F4/80, NPs-vacías y cada uno de los precursores de NPs (a 0,125 $\mu\text{g/mL}$, es decir, la mayor concentración de NPs utilizada) contra *H. capsulatum* CIB1980. **, ***, ** y * indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,00001$, $p < 0,0001$, $p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente. Los datos representan la absorbancia obtenida para cada grupo experimental.**

2.6.2. Biocompatibilidad del nanobioconjugado

Mediante la técnica de MTT, se evaluó la citotoxicidad de las diferentes combinaciones de las nanoformulaciones sobre los macrófagos J774A.1. Como se evidencia en la figura 3, a ninguna de las concentraciones utilizadas de ITZ libre, encapsulado en NPs y/o funcionalizado con el anticuerpo anti F4/80 fue tóxica para las células, las cuales mantuvieron una viabilidad $> 80\%$. No obstante, la concentración más alta de todos los tratamientos ($0,031 \mu\text{g/mL}$) disminuyó significativamente la viabilidad celular comparada con la concentración más baja ($0,007 \mu\text{g/mL}$) en ambos tiempos evaluados (3h y 24h). Además, cuando las células fueron tratadas durante 24 h con los diferentes tratamientos, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular, en comparación con las células tratadas durante 3 h, independiente de la concentración empleada. Estos resultados sugieren que el ITZ libre y/o encapsulado en NPs funcionalizadas con anticuerpos F4/80 no afectan la viabilidad de los macrófagos J774A.1, es decir, que el nanosistema es apto para continuar las demás evaluaciones.

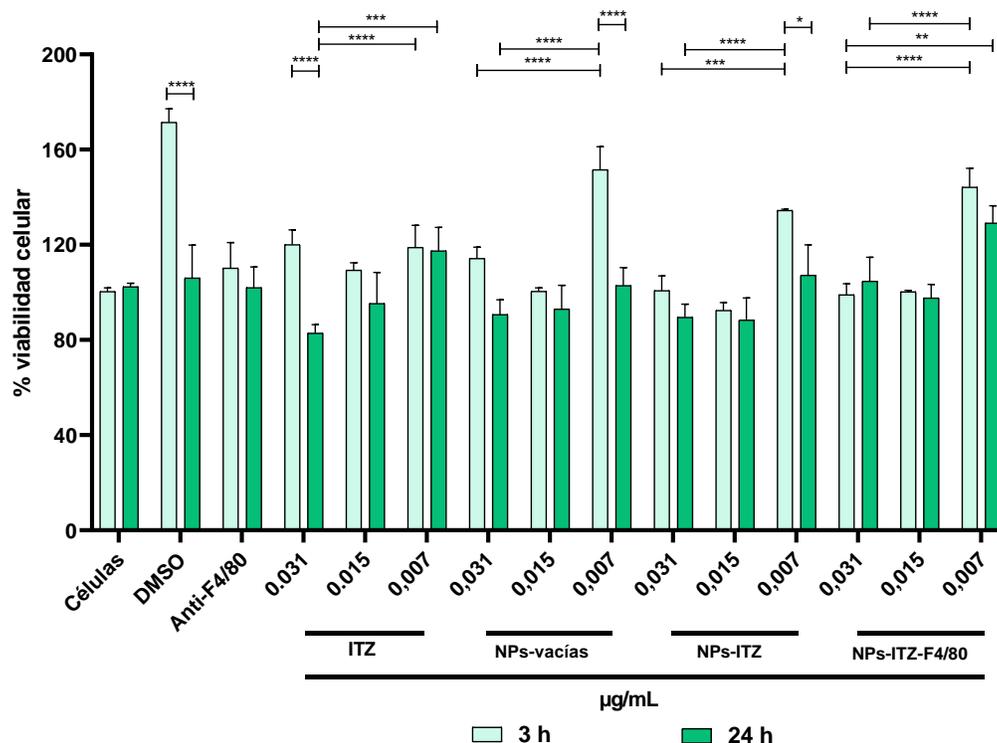


Figura 3. Citotoxicidad de ITZ libre y/o encapsulado en nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos F4/80 sobre macrófagos J774A.1 a diferentes concentraciones ($0,031$, $0,015$ y $0,007 \mu\text{g/mL}$) durante 3 y 24 h. Los datos representan

el porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT. ****, ***, ** y * indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,00001$, $p < 0,0001$, $p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente. Los tratamientos con DMSO, ITZ libre y NPs-vacías se evaluaron como controles.

2.6.3. Efecto de la actividad antimicótica del nanobioconjugado sobre co-cultivos de macrófagos infectados con *H. capsulatum*

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, se evaluó el efecto del nanobioconjugado sobre co-cultivos de macrófagos J774A.1 previamente infectados con levaduras de *H. capsulatum* como se describe en la sección materiales y métodos. La figura 4A, presenta los resultados obtenidos a partir de los co-cultivos lavados a las 6 horas de incubación. Se observó una reducción significativa ($p < 0,0001$) en el número de UFC obtenido del grupo tratado con NPs-ITZ-F4/80 (0,007 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con los grupos control (co-cultivos sin tratamiento y tratados con DMSO) y el grupo tratado con NPs-ITZ. La figura 4B, presenta los resultados obtenidos de los co-cultivos lavados a las 24 h de incubación. Como se observa, el tratamiento con ambas concentraciones de NPs-ITZ-F4/80 (0,031 y 0,015 $\mu\text{g/mL}$), disminuyó significativamente las UFC, comparado con los grupos control de co-cultivos sin tratar y los tratados con DMSO. Interesantemente, este mismo tratamiento, a la concentración de 0,031 $\mu\text{g/mL}$, mostró una reducción significativa en el número de UFC, comparado con los valores obtenidos en el grupo tratado con NPs-ITZ ($p < 0,01$). Sin embargo, es importante mencionar que el grupo tratado con ITZ libre presentó una disminución significativa de las UFC en todas las concentraciones evaluadas (0,031, 0,015 y 0,007 $\mu\text{g/mL}$). Por otro lado, las NPs-vacías en co-cultivo no presentaron efecto antimicótico (Figura 4A y 4B). Cabe señalar que, en ninguno de los casos (co-cultivos lavados a las 6 h o 24 h de incubación), se observó crecimiento de UFC a partir de los sobrenadantes.

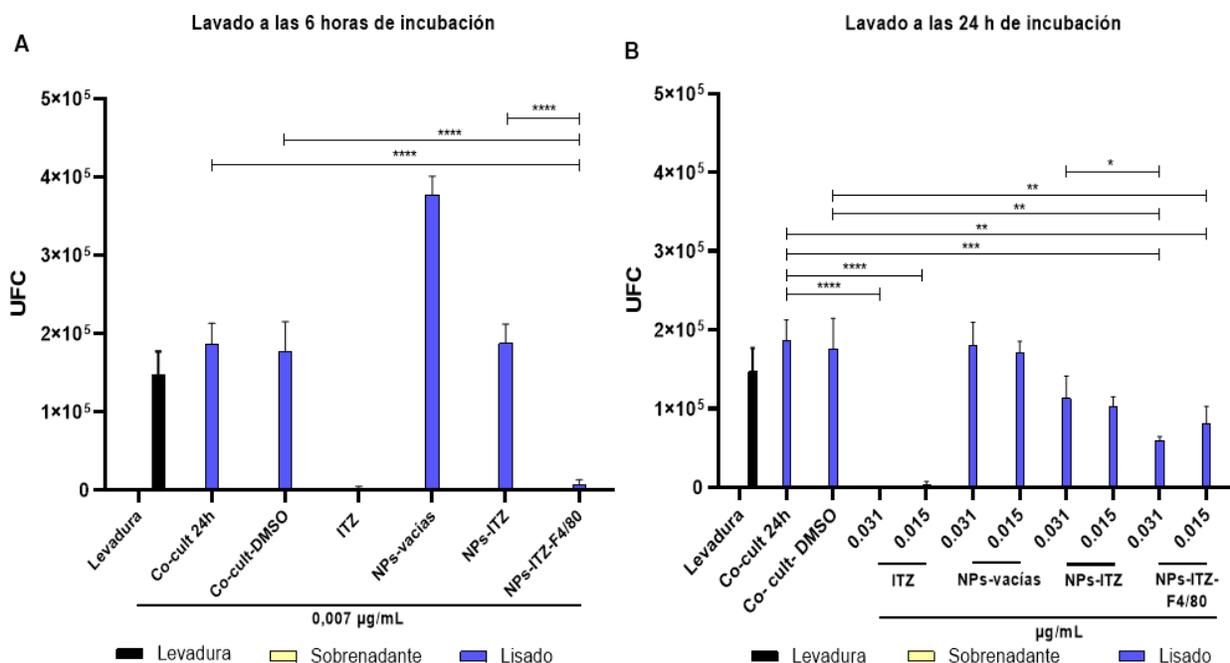


Figura 4. Efecto antifúngico de ITZ encapsulado en NPs y funcionalizadas con el anticuerpo F4/80 (NPs-F4/80) para eliminar levaduras de *H. capsulatum* en co-cultivo con macrófagos J774A.1. Los datos representan el número UFC a partir de sobrenadante y lisado luego del tratamiento con **A)** 0,007 µg/mL de NPs con o sin ITZ e ITZ libre durante 6 h y **B)** 0.031 y 0.015 µg/mL de NPs con o sin ITZ e ITZ libre durante 24 h. ****, ***, ** y * indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,00001$, $p < 0,0001$, $p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente.

2.6.4. Especificidad del nanobioconjugado

Se encapsuló Rojo de Nilo como modelo de compuesto hidrofóbico para evaluar la especificidad de las NPs funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 sobre macrófagos J774A.1 infectados con levaduras de *H. capsulatum* luego de 6 h de incubación. La microscopía de fluorescencia evaluó la co-localización intracelular del hongo y las NPs funcionalizadas en los macrófagos (Figura 5A). B, C y D corresponden a la ampliación de las imágenes de co-cultivos sin tratamiento y co-cultivos tratados con NPs-RN y NPs-RN-F4/80, respectivamente. En las imágenes fusionadas se observa un mayor número de macrófagos con NPs-RN-F4/80 endocitadas como lo indican las flechas blancas (Figura D) con respecto al tratamiento con NPs-RN donde se observa un menor número de macrófagos con NPs endocitadas (Figura 5C).

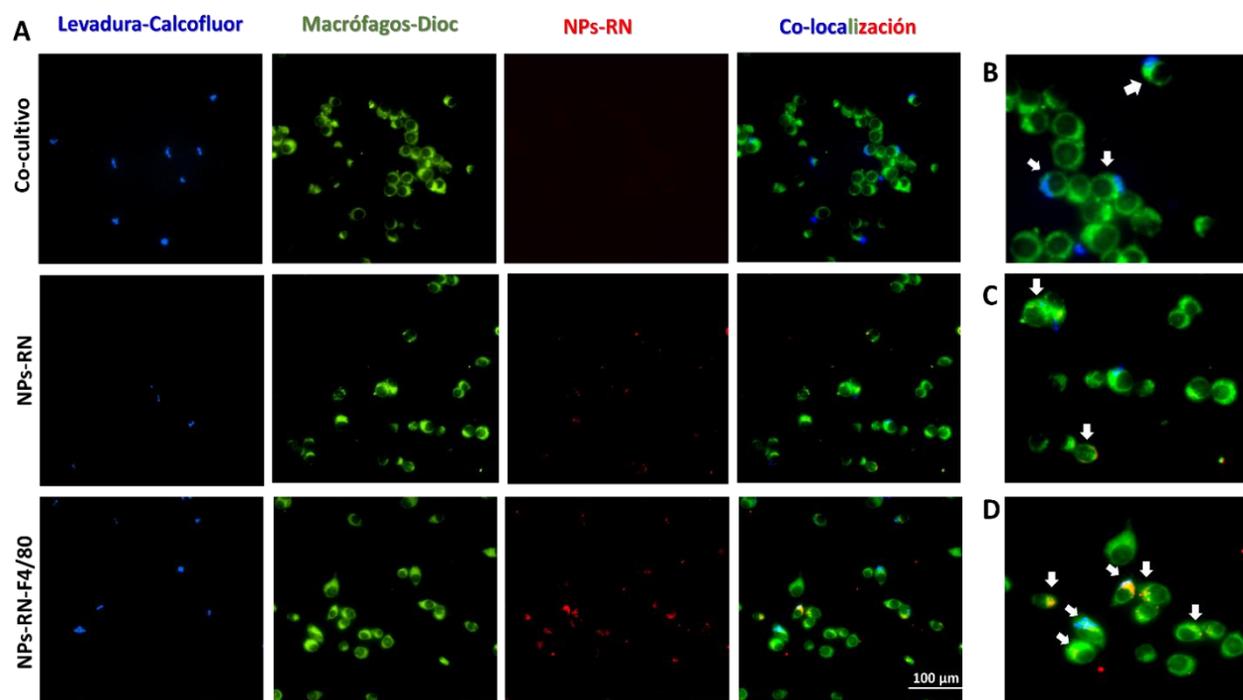


Figura 5. Endocitosis de NPs con Rojo de Nilo encapsulado, funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 en co-cultivo de macrófagos J774A.1 con *H. capsulatum*. **A)** Imágenes de co-cultivo sin tratar y tratados con NPs sin funcionalizar (NPs-RN) y NPs funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 (NPs-RN-F4/80) a las 6 h de incubación. Microscopía de fluorescencia. Las imágenes de izquierda a derecha se tomaron con filtro DAPI (tinción de levadura-calcofluor), filtro DIOC (tinción de macrófagos-DiOC6), filtro TRITC (NPs con Rojo de Nilo encapsulado) y fusionadas (co-localización), respectivamente. **B)** Aumento de la imagen fusionada del co-cultivo, las flechas blancas señalan macrófagos con levaduras de *H. capsulatum* en su interior. **C)** Aumento de la imagen fusionada de NPs-RN, las flechas blancas indican macrófagos con NPs-RN en su interior. **D)** Aumento de la imagen fusionada de NPs- RN-F4/80, las flechas blancas indican macrófagos con NPs-RN-F4/80 en su interior.

2.6.5. Efecto inmunomodulador del nanobioconjugado

Finalmente, se evaluó si la administración de NPs-ITZ-F4/80 modula la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria en macrófagos J774A.1 infectados con levaduras de *H. capsulatum*. Los resultados indicaron que tratamiento con ITZ libre aumentó significativamente la expresión de IL-1 β en comparación con los co-cultivos sin tratar (Figura 6A). Sin embargo, las nanoformulaciones de ITZ (NPs-ITZ, NPs-ITZ-F4/80), redujeron significativamente la expresión de esta citoquina en comparación con el ITZ libre (Figura 6A). Es importante

destacar que dicha reducción en la expresión de IL-1 β fue más significativa en presencia de las NPs-F4/80 con respecto a las NPs-ITZ. Para el caso del INF- γ (Figura 6B), el tratamiento con NPs-vacías aumentó significativamente la expresión de esta citoquina ($p < 0,001$). En contraste, se observó que el tratamiento con NPs-ITZ disminuye los niveles de expresión de INF- γ comparado con las NPs-vacías, pero esta disminución es más significativa en presencia del tratamiento con NPs-ITZ-F4/80 ($p < 0.001$). Se observó que, comparado con los co-cultivos sin tratar, el tratamiento con ITZ libre aumentó significativamente la expresión de IL-6 ($p < 0,01$) (Figura 6C). Por su parte, el tratamiento con las nanoformulaciones de ITZ (NPs-ITZ, NPs-ITZ-F4/80) disminuyó significativamente la expresión de IL-6 en comparación con el ITZ libre (Figura 6C). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y la expresión de TNF- α (datos no mostrados). En el estudio, también se evaluó la expresión de genes que codifican moléculas antiinflamatorias como la IL-10 y se observó que el tratamiento con las nanoformulaciones de ITZ (NPs-ITZ, NPs-ITZ-F4/80) disminuyen significativamente la expresión de IL-10 en comparación con el ITZ libre (Figura 6D).

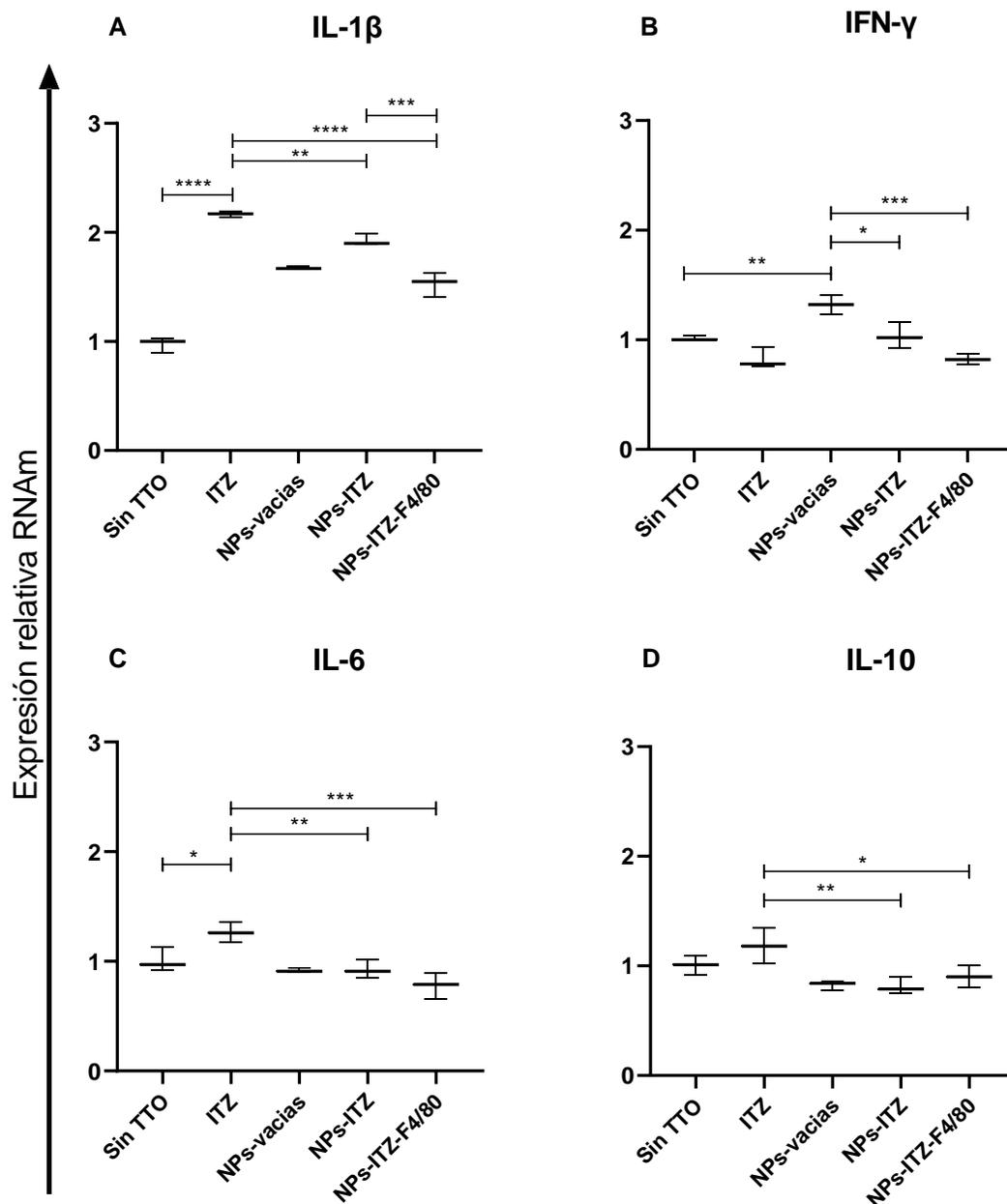


Figura 6. Análisis por PCR de la expresión de ARNm de genes relacionados con citoquinas inflamatorias y anti inflamatorias en macrófagos J774A.1 infectados con levaduras de *H. capsulatum*. A) IL-1 β , B) IFN- γ , C) IL-6 y D) IL-10. Los datos son presentados como mediana e IQR y son representativos de 2 experimentos independientes. ** p < 0,00001; *** p < 0,0001; ** p < 0,001; * p < 0,01.**

2.7. Discusión

La HPM es una micosis endémica y sistémica, de origen pulmonar primario con posibilidad de diseminación a otros órganos y sistemas. Los individuos

inmunocompetentes que habitan en zonas endémicas para *H. capsulatum*, pueden desarrollar la enfermedad luego de inhalar las partículas fúngicas infectantes (microconidias y pequeños fragmentos miceliares), pero en la mayoría de los casos la infección se resuelve espontáneamente [32]. Sin embargo, los individuos inmunosuprimidos como los infectados con el VIH, los trasplantados, los que reciben terapias con inhibidores del TNF- α u otros fármacos inmunosupresores, son más susceptibles a la infección y desarrollan una enfermedad progresiva y grave [33] requiriendo un tratamiento prolongado con dosis altas y frecuentes de antimicóticos que ocasionan efectos adversos y promueven el desarrollo de resistencia. Además, *H. capsulatum* tiene la capacidad de replicarse y vivir intracelularmente dentro de los macrófagos, lo que dificulta el tratamiento de esta infección, ya que los fármacos no logran penetrar las membranas celulares de estos fagocitos, impidiendo que se alcancen niveles terapéuticos óptimos y se presenten toxicidades fuera del objetivo en células o tejidos que no están infectados por el hongo [18,19]. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes que mejoren el tiempo de tratamiento y reduzcan la presentación de efectos secundarios adversos de los fármacos empleados en este tipo de infección.

La nanomedicina permite encapsular fármacos y dirigirlos selectivamente a poblaciones celulares específicas y ofrecer una liberación sostenida en el sitio objetivo, alcanzando así niveles terapéuticos intracelulares que ayudan a minimizar los efectos secundarios, las interacciones no deseadas y demás problemas de las terapias convencionales [22]. Se han utilizado varios tipos de NPs como sistemas de administración de fármacos antimicóticos, logrando reducir la concentración de fármaco necesaria para el tratamiento [34], incluidas las NPs poliméricas biodegradables [15,26,35] con posibilidad de ser funcionalizadas en su superficie con ligandos dirigidos que se unen a receptores específicos en las membranas celulares, promoviendo no solo la asociación y la unión de las NPs a componentes celulares, sino que también puede aumentar la internalización celular por medio de la endocitosis mediada por receptores.

En este trabajo, se evaluó ITZ encapsulado en NPs de PLGA funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80, con el fin de demostrar que al encapsular el fármaco en este tipo

de NPs, se logra una mayor efectividad en el tratamiento de la HPM.

La eficacia antifúngica de ITZ libre y encapsulado con o sin funcionalización, pudo demostrarse mediante CMI. Se encontró que se requiere una concentración de 0,015 $\mu\text{g/mL}$ tanto de NPs-ITZ-F4/80 como NPs-ITZ para observar un efecto antifúngico *in vitro* contra *H. capsulatum*. Sin embargo, el ITZ libre fue más eficaz puesto que solo se necesitó 0,007 $\mu\text{g/mL}$ para inhibir el crecimiento del hongo (Figura 2). La diferencia entre el ITZ libre y el encapsulado está relacionada con el tipo de cinética de liberación que presentan las NPs, donde luego de 72 h de incubación, solo se libera el 43% del ITZ encapsulado [28]. Además, la liberación del ITZ desde el núcleo hidrofóbico de las NPs al medio hidrofílico se va dando a medida que el polímero se degrada y en sistemas *in vitro*, el punto máximo de saturación se alcanza rápidamente. En ese sentido, el ITZ encapsulado no se alcanza a liberar totalmente en el medio, por lo tanto, se requiere concentraciones mayores en comparación con ITZ libre para observar una inhibición del 100% en el crecimiento del hongo. Cunha-Azevedo *et al.* evaluaron la CMI de ITZ-NANO mediante el conteo de UFC y demostraron que la eficacia del tratamiento incrementa con el tiempo, observándose que la degradación del polímero durante el tiempo de prueba, aumenta la liberación del fármaco en los medios, mejorando el efecto del ITZ sobre las células fúngicas [36]. Tanto las NPs-vacías como cada uno de los componentes de las NPs (0,125 $\mu\text{g/mL}$), mostraron una inhibición similar del hongo, lo cual puede indicar que la alta concentración de componentes en el medio permite una mayor interacción y unión con moléculas del hongo lo que afecta su crecimiento [28] .

Ciertas características de las NPs entre ellas el tamaño, la morfología, la química de superficie y los nanomateriales son factores que pueden afectar su toxicidad [37] provocando efectos biológicos, como la alteración de la membrana celular, el estrés oxidativo, la apoptosis, la inflamación y la autofagia [38]. Las NPs evaluadas en este estudio se componen principalmente del polímero PLGA y tienen un tamaño de 200 nm [28], lo cual sugiere una baja toxicidad. Ensayos *in vitro* con diferentes líneas celulares, muestran una toxicidad reducida de las nanopartículas de PLGA [27,39,40], ya que se trata de un material que fisiológicamente sufre hidrólisis de los enlaces éster, produciendo ácido láctico y ácido glicólico que en el ciclo de Krebs se metabolizan para formar energía,

dióxido de carbono y agua; razón por la cual actualmente es aprobado por la FDA para aplicaciones terapéuticas [41]. En este estudio, la citotoxicidad de las diferentes formulaciones de ITZ se probó frente a la línea celular de macrófagos J774A.1 y se observó que la viabilidad celular no se afecta con en presencia de los tratamientos (Figura 3), tal y como fue previamente descrito por Silva *et al.* quienes demostraron que el ITZ tiene una baja citotoxicidad sobre macrófagos murinos obtenidos de la cavidad peritoneal [42]. Similar a lo reportado por Chiu *et al.* [43], la citotoxicidad de las NPs fue dependiente del tiempo y de la concentración. Además, en nuestro caso, la funcionalización de las NPs con el anticuerpo anti F4/80 no influyó sobre este parámetro (Figura 3).

Con respecto a los ensayos de UFC, este mostró un mayor efecto antifúngico de las NPs funcionalizadas (NPs-ITZ-F4/80) en macrófagos infectados con *H. capsulatum* (Figura 4A y 4B). Las NPs funcionalizadas redujeron significativamente la cantidad de UFC con respecto a las NPs-ITZ al emplear diferentes concentraciones y tiempos de tratamientos. Esto se puede atribuir principalmente a la unión del ligando (anticuerpos anti F4/80) en la superficie de las NPs que permitió dirigirlas hacia receptores específicos expresados en los macrófagos J774A.1. Se sabe que el reconocimiento celular y la interacción de las NPs con la membrana celular se mejoran mediante el uso de ligandos dirigidos que se unen a receptores específicos en las membranas celulares [27,28]. Este mecanismo promueve no solo la unión de los nanotransportadores a esta estructura celular, sino que también puede aumentar la internalización celular por medio de la endocitosis mediada por receptores como probablemente ocurrió en este estudio, donde la presencia del ligando de F4/80 en la superficie de las NPs promovió la unión a los receptores en el macrófago y, por lo tanto, mejoró la eficacia de la nanoformulación (NPs-ITZ-F4/80). Por otro lado, investigaciones previas han reportado que las NPs de PLGA se asocian fácilmente con la membrana celular y se internalizan principalmente en las células fagocíticas por medio de endocitosis inespecífica [44,45]. Este evento también es facilitado por el tamaño de las NPs, para este estudio 200nm [28]. Se ha informado que las NPs de menor tamaño (100-500 nm) pueden acumularse en las membranas celulares y posiblemente trasladarse a través de ellas, lo que aumenta la eficacia del fármaco [46]. Los resultados obtenidos en este estudio permiten asegurar que además de la funcionalización, la concentración y el tiempo de incubación determinan la captación

celular de las NPs-F4/80 y por ende su efecto antifúngico, como lo demuestra la disminución significativa en el número de UFC luego del tratamiento por 6 h a una concentración de 0,007 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con los tratamientos durante 24 h a concentraciones de 0,031 $\mu\text{g/mL}$ y 0,015 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4A y 4B). Este hallazgo es consistente con trabajos previos los cuales demostraron que la captación celular de NPs poliméricas es saturable [44,47,48]. En el presente estudio, no se observó crecimiento de UFC a partir de los sobrenadantes de co-cultivos, lo cual demuestra la capacidad fagocítica de los macrófagos J774A.1. Varios estudios han demostrado que los macrófagos J774A.1 expresan una amplia gama de PRR que le permiten reconocer y captar patógenos o materiales extraños como por ejemplo, NPs [49–52]. Por esta razón, la línea celular de macrófagos peritoneales murinos J774A.1, es comúnmente empleada en biología celular e inmunología para modelo de infección.

Usando microscopía de fluorescencia, se comprobó que existe una mayor captación celular de las NPs cuando están funcionalizadas en comparación con las NPs sin funcionalizar (Figura 5C y 5D) lo cual sustenta los resultados obtenidos en los ensayos de UFC. Además, demuestra su co-localización con *H. capsulatum* (Figura 5B), lo que sugiere que las NPs-ITZ-F4/80 tienen la capacidad de internalizarse en los macrófagos y de esta manera, el fármaco puede alcanzar el hongo, mejorando así, la eficacia y la eficiencia del tratamiento. Se sabe que existen diferentes tipos de macrófagos, los cuales se caracterizan por su heterogeneidad, plasticidad, el tipo y la cantidad de receptores que expresan en su membrana plasmática [53]. Por ejemplo, los macrófagos peritoneales de ratón, expresan niveles altos del receptor F4/80 [54]. En este sentido, la funcionalización de las NPs con anticuerpos anti F4/80, probablemente permitió que las NPs se internalizaran en los macrófagos J774A.1 mediante endocitosis mediada por el receptor F4/80, sin embargo, se requieren ensayos adicionales en los cuales se determine este proceso.

Se ha informado, que la capacidad de las NPs para modular la respuesta inmune es producto de sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, carga, estructura, composición, etc.). Otros factores que también influyen son modificaciones en su superficie y la carga terapéutica que encapsulan [55,56]. Las células del sistema inmune reconocen muchos

de los componentes de las NPs como extraños desencadenando distintas respuestas inmunes a través de un proceso complejo. Por lo tanto, los experimentos posteriores tenían como objetivo determinar mediante análisis por PCR si la administración de NPs-ITZ-F4/80 altera la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria en macrófagos J774A.1 infectados con levaduras de *H. capsulatum* y explorar si este efecto podría ser empleado como un mecanismo que actúe de forma sinérgica con el fármaco y potencie el efecto del tratamiento.

Recientemente se informó que el ITZ además del efecto antimicótico, presenta propiedades que modulan directamente la respuesta inmune [57–59]. El presente estudio demostró que el ITZ libre aumenta significativamente la expresión de IL-1 β en los co-cultivos de macrófagos J774A.1 infectados con levaduras de *H. capsulatum* (Figura 6A). En concordancia con estos hallazgos, otros estudios han reportado resultados similares en otros modelos; Muenster *et al.* en un modelo de sepsis *in vitro*, observaron que en presencia de lipopolisacárido (LPS), el ITZ aumenta los niveles de expresión génica de IL-1 β [60]. El LPS es un componente importante de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y actúa como un potente inductor de respuestas pro-inflamatorias en monocitos y macrófagos [61]. Los resultados de este estudio sugieren que el aumento en la expresión de IL-1 β en co-cultivos, está relacionado con la forma libre del ITZ, dado que, al compararlo con NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80, se observa que la expresión de IL-1 β disminuye (Figura 6A).

En la HPM, el IFN- γ juega un papel central en el control de la infección y es la citoquina crucial para iniciar la fase efectora de la inmunidad mediada por células mediante la activación de los macrófagos para mejorar la actividad microbicida [62]. De acuerdo con Barros *et al.* la modulación de una respuesta inmune pro-inflamatoria puede ser muy beneficiosa cuando se quiere controlar patógenos intracelulares [63]. Acorde con lo anterior, en nuestro caso, se observó que el tratamiento con NPs-vacías induce un aumento en la expresión de IFN- γ (Figura 6B), lo que demuestra el papel inmunomodulador que puede ejercer la nanocápsula de PLGA sobre macrófagos J774A.1 infectados con *H. capsulatum*. Sin embargo, este aumento en la expresión de IFN- γ , se redujo significativamente en presencia del ITZ encapsulado, principalmente con

NPs-ITZ-F4/80, indicando que los anticuerpos anti F4/80 podrían, adicionalmente, ofrecer propiedades inmunomoduladoras (Figura 6B). En coherencia con nuestros resultados, Warschkau *et al.* demostraron que el uso de anticuerpos dirigidos contra el receptor F4/80 reduce los niveles de expresión génica de IFN- γ [64]. El antígeno F4/80 se usa ampliamente como marcador específico para macrófagos murinos. Los macrófagos del bazo (pulpa roja), pulmón, hígado, cavidad peritoneal y sistema nervioso expresan el receptor F4/80. La secuencia de aminoácidos interpretada indica una molécula de siete transmembranas con homologías con EMR1 y CD97 humanos. Como *in vivo* F4/80 se regula a la baja luego de la infección con el bacilo Calmette-Guerin, su expresión parece depender del estado de activación de los macrófagos [65]. Sin embargo, a la fecha no han descrito ligandos específicos ni funciones biológicas del antígeno F4/80.

La respuesta Th17 es importante para controlar muchas infecciones fúngicas [66]. Sin embargo, durante la HPM, es benéfica, pero no esencial para controlar el hongo [62]. Estudios previos han descrito que la generación de la respuesta Th17 inducida por *H. capsulatum* depende de IL-6 [67]. Zheng *et al.* en un modelo *in vitro* de candidiasis demostraron que el ITZ no solo inhibe el crecimiento del hongo, sino que también aumenta la expresión de IL-6 y otras citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos RAW264.7 [58]. En el presente estudio se observó que el tratamiento con ITZ libre aumenta significativamente la expresión de IL-6 (Figura 6C). Interesantemente, el tratamiento con las nanoformulaciones de ITZ (NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80) redujo significativamente la expresión de IL-6 en comparación con el ITZ libre (Figura 6C). Lo anterior indica que la encapsulación del ITZ en NPs permite una liberación sostenida y controlada del fármaco, de modo que las propiedades inmunomoduladoras que el ITZ libre presenta, con la encapsulación se logran mitigar.

El TNF- α es una citoquina protectora, que durante la infección por *H. capsulatum* ejerce múltiples efectos, incluyendo activación de células fagocíticas, inducción de apoptosis y control del fenotipo CD4+ [62]. Se ha demostrado que, durante la infección primaria, el bloqueo del TNF- α reduce la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos. La neutralización de TNF- α suprime la capacidad de las células T murinas para mediar en la protección contra *H. capsulatum* [68,69]. No se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre los diferentes tratamientos y la expresión de TNF- α (datos no mostrados). Estos resultados indican que los tratamientos evaluados no estarían ejerciendo un efecto sobre la respuesta inmune del macrófago con respecto a la expresión de esta citoquina.

También se evaluó la expresión de genes que codifican moléculas antiinflamatorias como la IL-10. Si bien es una citoquina importante para limitar la activación inmune excesiva, la IL-10 exacerba la infección impidiendo la eliminación de *H. capsulatum*. Además, afecta negativamente el desarrollo de la respuesta Th1 protectora [70]. En este estudio se observó que el tratamiento con las nanoformulaciones de ITZ (NPs-ITZ y NPs-ITZ-F4/80) redujo significativamente la expresión de IL-10 en comparación con el ITZ libre, siendo comparable con la expresión en co-cultivos sin tratamientos (Figura 6D). Con los resultados descritos anteriormente, es posible asegurar que las NPs de PLGA permiten que el ITZ se libere dentro de los macrófagos infectados de forma controlada, por lo tanto, se regula el efecto inmunomodulador que se le atribuye al ITZ libre.

En general, este trabajo abre la puerta a la implementación de nuevas estrategias terapéuticas utilizando antimicóticos encapsulados en NPs funcionalizadas capaces de dirigir el fármaco hacia células u órganos infectados por *H. capsulatum*. Los hallazgos sugieren que el efecto del tratamiento se debe principalmente al aumento de la concentración intracelular del ITZ y a la inmunomodulación que se genera al encapsular este fármaco, la cual es potenciada por los anticuerpos anti F4/80 empleados en la funcionalización de las NPs, permitiendo que se desarrolle una respuesta antimicótica natural y adecuada por parte de los macrófagos. Todo lo anterior en conjunto, ejerce un efecto sinérgico que evita el crecimiento del hongo a nivel intracelular.

2.8. Financiación

Este trabajo fue financiado por Minciencias (Proyecto 2213-777-57106), Universidad de Antioquia, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia y el grupo Grupo Tandem Max Planck en Nanobioingeniería.

2.9. Conflictos de interés

Los autores declaran que la investigación se llevó a cabo en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como posibles conflictos de intereses.

2.10. Referencias

1. Adenis AA, Aznar C, Couppié P. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. *Curr Trop Med Reports*. 2014 Mar 28;1(2):119-128.
2. Gomez BL y Tobón AM. Histoplasmosis. En: Vesga O, Vélez L, Leiderman E, Restrepo ÁM. *Enfermedades infecciosas de Homo sapiens Tomo III*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2015:304–336
3. Azar MM, Hage CA. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. *Clin Chest Med*. 2017 Sep;38(3):403–415.
4. Myint T, Leedy N, Villacorta Cari E, Wheat LJ. HIV-Associated Histoplasmosis: Current Perspectives. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2020 Mar 19;12:113–125.
5. Bongomin F, Kwizera R, Denning DW. Getting Histoplasmosis on the Map of International Recommendations for Patients with Advanced HIV Disease. *J Fungi*. 2019 Sep 2;5(3):80.
6. Cherabie J, Mazi P, Rauseo A, Ayres C, Larson L, Rutjanawech S, et al. Long-Term Mortality after Histoplasma Infection in People with HIV. *J Fungi*. 2021 May 8;7(5):369.
7. Medina N, Chiller T, Lau-Bonilla D, Samayoa B, Cleveland AA, Gomez BL, et al. High Mortality and Coinfection in a Prospective Cohort of Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients with Histoplasmosis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Jul 12;97(1):42–8.
8. Almeida M de A, Almeida-Silva F, Guimarães AJ, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. *Int J*

- Infect Dis. 2019 Sep;86:147–156.
9. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):807–25.
 10. Girmenia C, Lori AP. An update on the safety and interactions of antifungal drugs in stem cell transplant recipients. *Expert Opin Drug Saf*. 2017 Mar 4;16(3):329–39.
 11. Kyriakidis I, Tragiannidis A, Munchen S, Groll AH. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opin Drug Saf*. 2016 Dec 16;1–17.
 12. Piérard G, Arrese J, Piérard-Franchimont C. Itraconazole. *Expert Opin Pharmacother*. 2000 Jan 24;1(2):287–304.
 13. Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015 Jun 3;13(6):787–98.
 14. Tragiannidis A, Gkampeta A, Vousvouki M, Vasileiou E, Groll AH. Antifungal agents and the kidney: pharmacokinetics, clinical nephrotoxicity, and interactions. *Expert Opin Drug Saf*. 2021 Sep 2;20(9):1061–74.
 15. Ling X, Huang Z, Wang J, Xie J, Feng M, Chen Y, et al. Development of an itraconazole encapsulated polymeric nanoparticle platform for effective antifungal therapy. *J Mater Chem B*. 2016;4(10):1787–96.
 16. Kaewpoowat Q, Chaiwarith R, Yasri S, Worasilchai N, Chindamporn A, Sirisanthana T, et al. Drug–drug interaction between itraconazole capsule and efavirenz in adults with HIV for talaromycosis treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Mar 12;76(4):1041–1045.
 17. Prieto Garcia L, Janzén D, Kanebratt KP, Ericsson H, Lennernäs H, Lundahl A. Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Itraconazole and Two of Its Metabolites to Improve the Predictions and the Mechanistic Understanding of CYP3A4 Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Dispos*. 2018 Oct;46(10):1420–33.

18. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016 Feb 28;224:86–102.
19. Sánchez A, Mejía SP, Orozco J. Recent Advances in Polymeric Nanoparticle-Encapsulated Drugs against Intracellular Infections. *Molecules*. 2020 Aug 18;25(16):3760.
20. Ashley ESD, Lewis R, Lewis JS, Martin C, Andes D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clin Infect Dis*. 2006 Aug 1;43(Supplement_1):S28–39.
21. Tarudji AW, Kievit FM. Active targeting and transport. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020. p. 19–36.
22. Fernando S, Gunasekara T, Holton J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. *Sri Lankan J Infect Dis*. 2018 May 6;8(1):2.
23. Binnemars-Postma K, Storm G, Prakash J. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2017 May 4;18(5):979.
24. Kubackova J, Zbytovska J, Holas O. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications. *Eur J Pharm Sci*. 2020 Jan;142:105139.
25. Dube A, Reynolds JL, Law W-C, Maponga CC, Prasad PN, Morse GD. Multimodal nanoparticles that provide immunomodulation and intracellular drug delivery for infectious diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2014 May;10(4):831–8.
26. Cunha-Azevedo EP, Py-Daniel KR, Siqueira-Moura MP, Bocca AL, Felipe MSS, Tedesco AC, et al. In vivo evaluation of the efficacy, toxicity and biodistribution of PLGA-DMSA nanoparticles loaded with itraconazole for treatment of paracoccidioidomycosis. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018 Jun;45:135–141.
27. Biswaro LS, Garcia MP, da Silva JR, Neira Fuentes LF, Vera A, Escobar P, et al. Itraconazole encapsulated PLGA-nanoparticles covered with mannose as potential candidates against leishmaniasis. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2019 Apr;107(3):680–687.

28. Mejía SP, Sánchez A, Vásquez V, Orozco J. Functional Nanocarriers for Delivering Itraconazole Against Fungal Intracellular Infections. *Front Pharmacol.* 2021 Jun 28;12: 685391.
29. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv.* 2015 Jan;6(1):41–58.
30. Dos Anjos Cassado A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ.* 2017;62:161-179.
31. Hamann J, Koning N, Pouwels W, Ulfman LH, van Eijk M, Stacey M, et al. EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol.* 2007 Oct;37(10):2797–802.
32. González A. Histoplasmosis. En: Tobón AM, López LF, Gómez BL. *Fundamentos de las micosis humanas.* 1st ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2018:285–302.
33. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin Respir Crit Care Med.* 2020 Feb;41(1):13–30.
34. Souza ACO, Amaral AC. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity. *Front Microbiol.* 2017 Mar 7;8:336.
35. Khan AA, Alanazi AM, Jabeen M, Khan S, Malik A. Additive potential of combination therapy against cryptococcosis employing a novel amphotericin B and fluconazole loaded dual delivery system. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Jul;119:171–178.
36. Cunha-Azevedo EP, Silva JR, Martins OP, Siqueira-Moura MP, Bocca AL, Felipe MSS, et al. In Vitro Antifungal Activity and Toxicity of Itraconazole in DMSA-PLGA Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Mar 1;11(3):2308–14.
37. Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, et al. Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets.* 2015;16(14):1671–81.

38. Sun H, Jiang C, Wu L, Bai X, Zhai S. Cytotoxicity-Related Bioeffects Induced by Nanoparticles: The Role of Surface Chemistry. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Dec 12;7:414.
39. Pan X, Liu S, Ju L, Xi J, He R, Zhao Y, et al. Preparation, evaluation, and in vitro cytotoxicity studies of artesunate-loaded glycyrrhetic acid decorated PEG-PLGA nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020 Nov 1;46(11):1889–97.
40. Noori Koopaei M, Khoshayand MR, Mostafavi SH, Amini M, Khorramizadeh MR, Jeddi Tehrani M, et al. Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2014;13(3):819–33.
41. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res.* 2016 Oct 14;33(10):2373–87.
42. De Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JCF. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. Schallig HDFH, editor. *PLoS One.* 2013 Dec 23;8(12):e83247.
43. Chiu HI, Samad NA, Fang L, Lim V. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. *RSC Adv.* 2021;11(16):9433–49.
44. Cartiera MS, Johnson KM, Rajendran V, Caplan MJ, Saltzman WM. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials.* 2009 May;30(14):2790–8.
45. Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DLG, Simioni AR, et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidiodomycosis. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jan 15;63(3):526–33.
46. Patel NR, Damann K, Leonardi C, Sabliov CM. Itraconazole-loaded poly(lactic- co -glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity. *Nanomedicine.* 2010 Sep;5(7):1037–50.

47. Yin Win K, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2713–22.
48. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*. 1997 Nov;14(11):1568–73.
49. Garcia-Gonzalez N, Nuñez-Sanchez MA, Villoria Recio M, Battista N, Gahan CGM, Corsetti A. Immunomodulation of J774A.1 Murine Macrophages by *Lactiplantibacillus plantarum* Strains Isolated From the Human Gastrointestinal Tract and Fermented Foods. *Front Microbiol*. 2021 Jan 12;11.
50. Andreu N, Phelan J, de Sessions PF, Cliff JM, Clark TG, Hibberd ML. Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017 Sep 8;7(1):42225.
51. Mazaleuskaya L, Veltrop R, Ikpeze N, Martin-Garcia J, Navas-Martin S. Protective Role of Toll-like Receptor 3-Induced Type I Interferon in Murine Coronavirus Infection of Macrophages. *Viruses*. 2012 May 24;4(5):901–23.
52. Wang H, Wu L, Reinhard BM. Scavenger Receptor Mediated Endocytosis of Silver Nanoparticles into J774A.1 Macrophages Is Heterogeneous. *ACS Nano*. 2012 Aug 28;6(8):7122–32.
53. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*. 2017 Dec 29;15(1):53.
54. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005 Apr 1;23(1):901–44.
55. Elsabahy M, Wooley KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem Soc Rev*. 2013;42(12):5552.
56. Muhammad Q, Jang Y, Kang SH, Moon J, Kim WJ, Park H. Modulation of immune responses with nanoparticles and reduction of their immunotoxicity. *Biomater Sci*.

2020;8(6):1490–501.

57. Puerta-Arias JD, Pino-Tamayo PA, Arango JC, Salazar-Peláez LM, González A. Itraconazole in combination with neutrophil depletion reduces the expression of genes related to pulmonary fibrosis in an experimental model of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2018 Jul 1;56(5):579–90.
58. Zheng X-L, Liang G-Z, Shi D-M, Yao H-P, Zhang L, Liu W-D, et al. Itraconazole Promotes Macrophage M1 Polarization and Phagocytic Capacity of Macrophage to *Candida Albicans*. *Int J Dermatology Venereol.* 2019 Dec;2(4):193–201.
59. Naranjo TW, Lopera D, Zuluaga AF, Cano LE. Immunomodulatory activity of itraconazole in lung. *Trop J Pharm Res.* 2017 Jan 12;15(12):2603.
60. Muenster S, Bode C, Diedrich B, Jahnert S, Weisheit C, Steinhagen F, et al. Antifungal antibiotics modulate the pro-inflammatory cytokine production and phagocytic activity of human monocytes in an in vitro sepsis model. *Life Sci.* 2015 Nov;141:128–36.
61. Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Kuwahara-Arai K, Iba T, et al. Antimicrobial Cathelicidin Peptide LL-37 Inhibits the LPS/ATP-Induced Pyroptosis of Macrophages by Dual Mechanism. *Ojcius DM, editor. PLoS One.* 2014 Jan 16;9(1):e85765.
62. Horwath MC, Fecher RA, Deepe GS. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. *Future Microbiol.* 2015 Jun;10(6):967–75.
63. Barros D, Costa Lima SA, Cordeiro-da-Silva A. Surface functionalization of polymeric nanospheres modulates macrophage activation: relevance in Leishmaniasis therapy. *Nanomedicine.* 2015 Feb;10(3):387–403.
64. Warschkau H, Kiderlen AF. A monoclonal antibody directed against the murine macrophage surface molecule F4/80 modulates natural immune response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 1999 Sep 15;163(6):3409–16.
65. Ezekowitz RA, Austyn J, Stahl PD, Gordon S. Surface properties of bacillus Calmette-Guérin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-

specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. J Exp Med. 1981 Jul 1;154(1):60–76.

66. Sparber F, LeibundGut-Landmann S. Interleukin-17 in Antifungal Immunity. Pathogens. 2019 Apr 22;8(2):54.
67. Deepe, Jr. GS, Gibbons RS. Interleukins 17 and 23 Influence the Host Response to *Histoplasma capsulatum*. J Infect Dis [Internet]. 2009 Jul;200(1):142–51.
68. Allendoerfer R, Deepe GS. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. J Immunol. 1998 Jun 15;160(12):6072–82.
69. Deepe GS Jr, Gibbons RS. T cells require tumor necrosis factor-alpha to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. J Infect Dis. 2006 Jan 15;193(2):322-30.
70. Deepe GS, Gibbons RS. Protective and Memory Immunity to *Histoplasma capsulatum* in the Absence of IL-10. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):5353–62.

3. Conclusiones

La encapsulación de ITZ en NPs funcionalizadas ha demostrado ser una alternativa prometedora para mejorar la entrega de este agente antimicótico. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el efecto antimicótico mejorado del ITZ encapsulado en NPs de PLGA funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 para eliminar levaduras de *H. capsulatum* en co-cultivo con macrófagos J774A.1, el cual estaría relacionado principalmente con la funcionalización de las NPs, que además de favorecer una mayor captación celular de las NPs, y por ende, un aumento en la concentración intracelular del ITZ; genera un efecto inmunomodulador en los macrófagos infectados, permitiendo que estos actúen frente a *H. capsulatum* de forma natural, evitando su crecimiento intracelular.

4. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son un valioso aporte, dado que demuestran como el tratamiento con ITZ encapsulado en NPs funcionalizadas con anticuerpos anti F4/80 favorece el control de la infección por el hongo *H. capsulatum*, actuando en sinergia con respuesta inmune del macrófago. No obstante, es necesario desarrollar nuevos estudios que permitan una comprensión más a fondo sobre cómo este tipo de NPs interactúan con los macrófagos infectados. De igual manera, sería valioso evaluar *in vivo* el efecto antimicótico de las NPs utilizando el modelo experimental de HPM en ratón.

5. Artículos en preparación

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, hacen parte de un proyecto de investigación macro, del cual saldrá un manuscrito, el cual se encuentra en preparación para ser sometido a una revista internacional indexada.

Antifungal encapsulated into ligand-functionalized nanoparticles with high specificity for macrophages

Susana P. Mejía^{1, 2 +}, Daniela López^{2 +}, Luz Elena Cano², Tonny Naranjo^{2, 3}, Jahir Orozco

¹ Max Planck Tandem Group in Nanobioengineering, Institute of Chemistry, Faculty of Natural and Exact Sciences, University of Antioquia, Complejo Ruta N, Calle 67 N° 52-20, Medellín 050010, Colombia.

² Experimental and Medical Micology Group, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), UdeA, UPB, UdeS, Medellín 050010, Colombia.

³ School of Health Sciences, Universidad Ponticia Bolivariana, Cl. 78b #72A – 109, Medellín 050010, Colombia.

6. Presentación en eventos

Daniela López, Susana P. Mejía, Luz Elena Cano. 2019. Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol para el tratamiento de la histoplasmosis (Fase

preliminar). **Jornada de actualización académica**. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín- Colombia. (Póster).

Daniela López, Susana P. Mejía, Luz Elena Cano. 2019. Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol para el tratamiento de la histoplasmosis (Fase preliminar). **XI Jornadas de Investigación y Extensión de la Escuela de Microbiología “Conociendo la Investigación y la Extensión hecha en casa”**. Medellín – Colombia. (Presentación Oral).

Daniela López, Susana P. Mejía, Tonny Naranjo, Luz Elena Cano, Jahir Orozco. 2021. Efecto antimicótico de un nanobioconjugado de itraconazol para el tratamiento de la histoplasmosis. **Infocus. 19 Reunión de Expertos en Micología Clínica**. Córdoba-Argentina. (Póster).