



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la actividad de nanoencapsulados de Anfotericina B en aislamientos ambientales de Mucorales con impacto clínico

Yinneth Marcela Gutierrez Pardo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2023

Evaluación de la actividad de nanoencapsulados de Anfotericina B en aislamientos ambientales de Mucorales con impacto clínico

Yinneth Marcela Gutierrez Pardo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

Andrés Ceballos Garzón Ph.D

Codirector:

León Darío Pérez Pérez Ph.D

Asesor:

Claudia Marcela Parra PhD

Grupos de Investigación:

Enfermedades Infecciosas: Unidad de Investigación en Proteómica y Miosis

Humana Pontificia Universidad Javeriana PUJ

Macromoléculas, Departamento de Química
Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2023

A mi mamá y a mis hermanas, a quienes amo profundamente y agradezco su apoyo incondicional en este proceso de formación.

"El peor enemigo del conocimiento no es la ignorancia, es la ilusión del conocimiento"

Stephen Hawking

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Yinneth Marcela Gutierrez Pardo

Fecha 26/07/2023

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Andres Ceballos y al Dr. León Dario Perez quienes me acompañaron y asesoraron durante este proceso, personas que con su conocimiento y profesionalismo me enseñaron y permitieron que todo esto fuera posible.

A la doctora Claudia Parra y su laboratorio de Enfermedades Infecciosas: Unidad de Investigación en Proteómica y Miosis Humana (MiCoHp) por permitirme usar sus instalaciones y especialmente a Andrea Barragan, Silvia Carvajal, Valentina Díaz y Maria Jose Jimenez por su apoyo constante, su paciencia y sin duda por su amabilidad.

También quiero agradecer por su constante apoyo en el proceso de maestría al profesor Daniel Uribe y Jeisson García secretario del departamento por su disponibilidad total y acompañamiento continuo. Finalmente quiero agradecer a mis amigos y familia, quienes con su apoyo me animaron a continuar durante todo este proceso.

Resumen

Evaluación de la actividad de nanoencapsulados de Anfotericina B en aislamientos ambientales de Mucorales con impacto clínico

La mucormicosis es una infección fúngica causada por hongos del orden Mucorales, estos hongos se caracterizan por ser ubicuos. Sin embargo, algunas especies tienen factores de virulencia que les han permitido colonizar hospederos humanos, en su mayoría con un sistema inmune debilitado. Las tasas de mortalidad asociadas pueden alcanzar hasta el 90% en los casos de infección diseminada. Estas elevadas tasas de mortalidad se deben en gran medida a la resistencia innata a los fármacos antifúngicos observada en estas especies, lo que deja a los clínicos pocas opciones terapéuticas.

La dificultad para identificar el agente causal de esta micosis, la resistencia innata de estos hongos y la toxicidad que genera la anfotericina B (AMB), el cual es el antifúngico de mayor eficiencia contra estos hongos. Es una problemática que merece mayor atención por los entes gubernamentales. Entre las nuevas estrategias terapéuticas, las nanopartículas parecen ser prometedoras, debido a que estas permiten aumentar el tiempo de vida media de los fármacos y mejoran la liberación de estos disminuyendo así la toxicidad.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar nanoencapsulados de AMB contra especies de Mucorales ambientales que tienen impacto clínico, con el fin de establecer su efectividad *In vitro* e *In vivo*. Para ello se utilizó la metodología de microdilución en caldo siguiendo los lineamientos del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), lo cual permitió obtener y comparar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) entre la formulación tradicional vs los encapsulados de AMB (Pol I, Pol II, Pol III, Pol IV y Pol V). Se evidenció que el nanoencapsulado AMB Pol III permitió reducir los

valores de CMI en comparación con la AMB convencional para los aislamientos de *Mucor circinelloides* aquí evaluados. Además, en el modelo *In vivo* (*Galleria mellonella*), se observó una reducción en la mortalidad de las larvas infectadas con *Mucor circinelloides* en comparación con las larvas que no recibieron tratamiento y que fueron tratadas con AMB convencional.

Palabras clave: Mucorales, Anfotericina B, nanoencapsulación, susceptibilidad antifúngica, *Galleria mellonella*.

Abstract

Evaluation of the activity of amphotericin B nanoencapsulated on environmental isolates of Mucorales with clinical impact

Mucormycosis is a fungal infection caused by fungi of the order Mucorales, these fungi are characterized by being ubiquitous. However, some species have virulence factors that have allowed them to colonize human hosts, mostly with a weakened immune system. Associated mortality rates can reach up to 90% in cases of disseminated infection. These high mortality rates are largely due to the innate resistance to antifungal drugs observed in these species, leaving clinicians with few therapeutic options.

The difficulty in identifying the causal agent of this mycosis, the innate resistance of these fungi and the toxicity generated by amphotericin B (AMB), which is the most efficient antifungal drug against these fungi. This is a problem that deserves greater attention from governmental agencies. Among the new therapeutic strategies, nanoparticles seem to be promising, since they increase the half-life of drugs and improve drug release, thus reducing toxicity.

The objective of this study was to evaluate nanoencapsulated AMB against environmental Mucorales species with clinical impact, in order to establish their effectiveness *In vitro* and *In vivo*. For this purpose, the broth microdilution methodology was used following the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), which allowed obtaining and comparing the minimum inhibitory concentrations (MICs) between the traditional formulation vs. the AMB encapsulates (Pol I, Pol II, Pol III, Pol IV and Pol V). It was evidenced that the AMB Pol III nanoencapsulated allowed to reduce MIC values compared to conventional AMB for the *Mucor circinelloides* isolates evaluated here. Furthermore, in the *In vivo* model (*Galleria mellonella*), a reduction in the mortality of larvae infected with *Mucor circinelloides* was observed compared to untreated larvae treated with conventional AMB.

Keywords: Mucorales, Amphotericin B, nanoencapsulation, antifungal susceptibility, *Galleria mellonella*.

Contenido

	Pág.
Resumen	1
Lista de figuras	7
Lista de tablas	8
Lista de símbolos y abreviaturas	9
1. Introducción	10
2. Marco teórico	19
2.1 Mucormicosis	19
2.2 Taxonomía	20
2.2.1 Especies clínicas relevantes	21
2.3 Factores de riesgo	22
2.4 Factores de virulencia y patogenicidad	22
2.4.1 Captación de hierro (Fe)	23
2.4.2 Proteína de la cubierta de esporas (CoH)	25
2.4.3 Proteína calcineurina	27
2.5 Manifestaciones clínica	27
2.6 Diagnóstico	24
2.6.1 Examen microscópico y cultivo	28
2.6.2 Histopatología	29
2.6.3 Métodos moleculares	29
2.6.4 Proteómica	29
2.7 Tratamiento	30
2.7.1 Anfotericina B (AMB)	31
2.7.2 Problemas asociados al uso de AMB	33
2.7.3 Formulaciones sobre AMB	33
2.7.4 Resistencia a AMB	36
2.8 Resistencia de los Mucorales	36
2.9 Nanopartículas	37

	12
2.10 <i>Galleria mellonella</i> como modelo <i>In vivo</i>	39
3. Objetivos	41
3.1 General	41
3.2 Específicos	41
4. Materiales y métodos	42
4.1 Aislamientos fúngicos	42
4.2 Identificación mediante MALDI-TOF	42
4.3 Nanoencapsulados de AMB	43
4.4 Susceptibilidad antifúngica	43
4.5 Actividad hemolítica	44
4.6 Citotoxicidad	44
4.7 Modelo <i>In vivo Galleria mellonella</i>	45
4.8 Análisis estadísticos	46
5. Resultados	47
5.1 Identificación aislamientos fúngicos	47
5.2 Actividad antifúngica <i>In vitro</i>	48
5.3 Actividad hemolítica	50
5.4 Citotoxicidad	51
5.5 Modelo <i>In vivo Galleria mellonella</i>	52
6. Discusión	55
7. Conclusiones y perspectivas	60
7.1 Conclusiones	60
7.2 Perspectivas	60
Bibliografía	61

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Árbol filogenético Mucorales	19
Figura 2: Mecanismos propuestos de captación de hierro para Mucorales	21
Figura 3: Características morfológicas de especies del orden Mucorales a nivel macroscópico y microscópico.	26
Figura 4: Imagen resumen mucormicosis	28
Figura 5: Composición molecular AMB	29
Figura 6: Estructura química AMB	30
Figura 7: Mecanismos de acción AMB	31
Figura 8: Especies identificadas de los aislamientos trabajados	37
Figura 9: Macroscopía y microscopía de los aislamientos evaluados	39
Figura 10: Susceptibilidad antifúngica de los aislamientos evaluados	42

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Principales formulaciones de Anfotericina B	28
Tabla 2: Nanopartículas de AMB evaluadas	34

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μL	Microlitro
mL	Mililitro

Abreviaturas

Abreviatura	Término
EFIs	Enfermedades fúngicas invasivas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
AMB	Anfotericina B
POS	Posaconazol
VCZ	Voriconazol
Fe	Hierro
CH	Colesterol
PBS	Buffer fosfato salino
DMSO	Dimetilsulfóxido
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>

1. Introducción

Las Enfermedades fúngicas invasivas (EFIs) son causadas principalmente por hongos oportunistas, que a su vez son colectivamente responsables de la muerte de alrededor 1,5 millones de personas cada año en el mundo (Hagan, 2018). La mayoría de los factores que facilitan una EFI son inevitables, porque están directamente relacionados con enfermedades/condiciones predisponentes como: diabetes, neutropenia, trasplantes, cáncer, así como con su tratamiento (de Pauw, 2011). La pandemia del COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2, ha aumentado los casos de algunas de estas infecciones en el mundo, dado que la infección viral altera las respuestas inmunitarias y metabólicas de los pacientes, sumado al uso de medicamentos como los corticoides, lo que en conjunto produce un ambiente propicio para que hongos como *Aspergillus* spp, Mucorales y *Candida* spp, causen EFIs (Hoenigl et.al, 2022). A saber, la mucormicosis prendió las alarmas en los sistemas de salud durante la más reciente pandemia, dado su oportunismo para causar infecciones de evolución aguda alta mortalidad en pacientes con la COVID-19 entre otros (Martin Gomez & Salavert Lletib, 2021).

Los Mucorales representan el orden más amplio dentro de los hongos zigospóricos (forman zigosporas, de origen sexual y esporangiósporas, de origen asexual), cuyos órdenes más relevantes relacionados con infecciones humanas y animales son los *Entomophthorales*, los *Mucorales* y los *Mortierellales*. Siendo los dos primeros los agentes causales más relevantes de infecciones en humanos conocidas como entomofotoromicosis y mucormicosis, respectivamente (Zamudio et al., 2021). Entre los géneros pertenecientes a los Mucorales, *Rhizopus* spp, *Mucor* spp y *Lichtheimia* spp son los agentes etiológicos de la mucormicosis aislados con mayor frecuencia en pacientes, representando cerca del 75% de los casos (Prakash & Chakrabarti, 2019)

(Skiada et.al, 2020).

El curso de la enfermedad es rápido en comparación con las infecciones causadas por otros hongos, puesto que este se establece entre las 24-48 horas siguientes al ingreso del patógeno en el hospedero. Además, el diagnóstico de la mucormicosis es desafiante dada la falta de sospecha clínica y la dificultad para aislar e identificar los hongos causantes (Garg et al., 2021).

Estos hongos presentan resistencia a la mayoría de los antifúngicos disponibles, disminuyendo las posibilidades de tratamiento. El incremento de la resistencia está asociada principalmente a mecanismos innatos del microorganismo (resistencia intrínseca), presión de selección asociados al uso indebido de tratamientos y mutaciones (Macedo et al., 2019). El número de opciones terapéuticas para el tratamiento de la mucormicosis es bastante limitado en comparación con las disponibles para tratar infecciones bacterianas u otras infecciones fúngicas (Sipsas et al., 2018). De hecho, solo dos clases de moléculas, polienos y azoles, se utilizan actualmente en la terapia clínica: anfotericina B (AMB) y posaconazol (POS), respectivamente.

La AMB se suministra bajo varias formulaciones como: AMB liposomal, AMB coloidal y AMB desoxicolato, ya que por sí sola la AMB es insoluble en agua (Cavassin et al., 2021). Estudios han mostrado que la mayor limitación de este fármaco es la toxicidad para el paciente dada la afinidad de AMB por el colesterol (CH) de las células del hospedero, lo que explica por qué órganos como el riñón, corazón y células se ven afectados cuando se administra una terapia prolongada con este antifúngico (Cavassin et al., 2021). Esto ha llevado a buscar nuevas estrategias terapéuticas para disminuir la toxicidad de los fármacos y la mortalidad causada por este grupo de hongos (Palmis et al., 2018).

Existen mecanismos que permiten una liberación controlada de AMB para evitar que se formen agregados solubles de este antifúngico y disminuya así su toxicidad. En 2019 Villamil-Poveda y colaboradores diseñaron y caracterizaron nanopartículas poliméricas con base de Polietilenglicol (PEG), Policaprolactona (PCL) y CH cargadas con AMB contra aislamientos clínicos de *Candida albicans* con el fin de determinar la citotoxicidad y la efectividad de las nanopartículas frente a la infección por *Candida* en *Galleria*

mellonella (Villamil-Poveda, 2019). Logrando la liberación lenta de la AMB en presencia del CH que favorece la encapsulación y disolución del fármaco. Además, se evidenció disminución de hemólisis y citotoxicidad de AMB al estar encapsulada en las micelas poliméricas. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de diferentes nanoencapsulados de AMB a nivel *In vitro* e *In vivo* en aislamientos ambientales de Mucorales con impacto clínico.

● 2. Marco teórico

2.1 Mucormicosis

Es una infección causada por un grupo de hongos pertenecientes al orden de los Mucorales, los cuales pueden causar varios tipos de infección dependiendo de la vía de entrada del patógeno. Este grupo de hongos en su mayoría son ubicuos, crecen sobre materia orgánica y en descomposición como compostaje, excremento de animales y suelo (Richardson & Rautemaa, 2020). Sin embargo, para algunas especies no existen datos suficientes que permitan evaluar su distribución o nicho ecológico por lo que ha dificultado la comprensión de la ruta de adquisición y por ende la prevención de esta enfermedad (Walther et al., 2019).

Las lesiones causadas por la infección se caracterizan por presentar necrosis como resultado de la angioinvasión de las hifas que interactúan de forma específica con las células endoteliales del hospedero (Skiada , 2020). En la mayoría de los casos, los pacientes presentan alteración o deficiencias en el sistema inmune (Borman et al., 2021). Sin embargo, las infecciones en pacientes inmunocompetentes también han sido descritas, principalmente en pacientes que presentan quemaduras o traumatismos (Garre, 2022). También se han reportado brotes de mucormicosis en centros de salud debido a la contaminación de cinta adhesiva, bajalenguas de madera, dispositivos médicos no estériles, filtración deficiente del aire y contaminación de la construcción de edificios. (Castrejón-Pérez et al., 2017)(CDC, 2020)

La tasa de mortalidad de esta micosis varía en función del estado subyacente del paciente, el tipo de hongo y la zona del cuerpo afectada. La tasa de mortalidad fue del 46% entre las personas con infecciones sinusales, del 76% para las infecciones pulmonares y del 96% para la mucormicosis diseminada (CDC, 2020). Para infecciones

cutáneas y gastrointestinales la tasa de mortalidad reportada es del 13-23% y 57%, respectivamente (Serris et al., 2019).

En países como Colombia, la mucormicosis no es una infección de reporte obligatorio, por lo que no hay datos de prevalencia de esta enfermedad. Morales-Lopez y colaboradores en 2018 realizaron una revisión de los casos informados hasta la fecha para brindar información de la distribución geográfica en el territorio y las especies asociadas a esta enfermedad. Entre los resultados obtenidos, los casos de mucormicosis están distribuidos a lo largo del país y los géneros asociados a 26 casos fueron: *Rhizopus spp*, (12), *Conidiobolus spp*, (7), *Mucor spp*.(2), *Apophysomyces spp*.(2), *Saksenaea spp*.(2) y *Lichtheimia spp*.(1) (Morales-López et al., 2018).

2.2 Taxonomía

Respecto a la comprensión de la biología de los Mucorales, esta se ha visto afectada por una taxonomía no resuelta, ya que incluso en el ámbito médico, estos hongos a menudo no se identifican a nivel de especie. Sin embargo, se ha dado un progreso significativo en la comprensión de la taxonomía de Mucorales en los últimos años debido al incremento de técnicas moleculares que permiten un mejor abordaje. En el 2016, Spatafora *et al*, analizaron los genomas de 46 taxones y 192 proteínas concluyendo que los zigomicetos estaban compuestos por dos filos: Mucoromycota y Zoopagomycota. Estos análisis revelaron que el filo Mucoromycotina se asocia principalmente con plantas y se componen de tres subfilos: 1) Glomeromycotina formadores de micorrizas arbusculares, 2) Mortierellomycotina, que frecuentemente son endófitos de las raíces y 3) Mucoromycotina, que consta de los órdenes Mucorales, Umbelopsidales y Endogonales. Por otra parte, los Zoopagomycota son saprobios o parásitos de animales conformada por los subfilos: Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina y Zoopagomycotina, donde resaltan los géneros oportunistas *Basidiobolus* y *Conidiobolus* (Walther et al., 2019).

La **Figura 1**, muestra el árbol filogenético obtenido en el estudio de Spatafora *et.al*, 2016. que sustenta la división de los dos grandes filos basados en la alineación de 192 proteínas ortólogas conservadas y donde se resaltan los géneros asociados con patógenos.

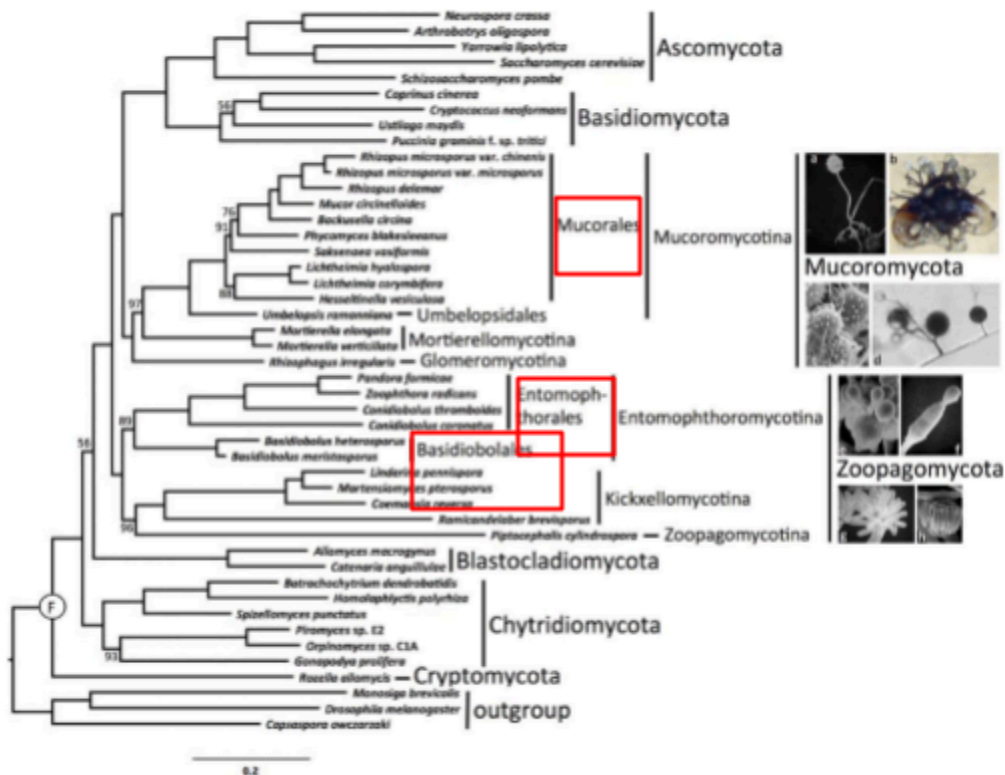


Figura 1. Árbol filogenético de Mucorales-adaptado de Spatafora et.al,2016.

2.2.1 Especies clínicamente relevantes

Las especies de los géneros *Rhizopus*, *Lichtheimia* y *Mucor* son los agentes causales de mucormicosis más comunes, siendo *Rhizopus arrhizus* la especie más frecuente (Prakash & Chakrabarti, 2019). Sin embargo, la geografía y la manifestación clínica de la mucormicosis involucra diferentes especies asociadas a esta. A menudo, en los casos de mucormicosis rinocerebral el género asociado es *Rhizopus spp*, en enfermedades pulmonares o diseminadas las especies de *Cunninghamella spp*. Con el uso de corticosteroides se predispone a especies de *Lichtheimia*, las cuales son comunes en Europa y relativamente raras en otras regiones. Otro ejemplo de la asociación de especie encontrada y la geografía es *Apophysomyces variabilis*, segunda causa más común de mucormicosis en la India (Prakash & Chakrabarti, 2019).

Para el año 2021, Badali y colaboradores evaluaron 854 aislamientos clínicos de casos de mucormicosis por un periodo de 52 meses en Estados Unidos. En este estudio el género predominante fue *Rhizopus*, especie *Rhizopus arrhizus* (40.8%), seguido de *Rhizopus*

microsporus (35.2%). Otro género común fue *Mucor*, donde *Mucor circinelloides* fue el más prevalente (57.5%). Otros géneros como *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces* y *Syncephalastrum* representaron aproximadamente un 20% de los aislamientos obtenidos (Badali et al.,2021).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos en la revisión de 143 casos en Sudamérica donde los géneros con mayor frecuencia identificadas fueron: *Rhizopus*, *Mucor* y *Lichtheimia* a pesar de la escasa información disponible para su análisis (Nucci et al.,2019).

2.3 Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo para que se desarrolle esta micosis se encuentran: diabetes mellitus no controlada, cetoacidosis diabética y otras formas de acidosis metabólica que contribuyen a cambios en el pH de la sangre y la disponibilidad de hierro en el hospedero (García-Carnero & Mora-Montes, 2022).

Otros factores se relacionan con el tratamiento con corticosteroides, trasplante de órganos, neutropenia y uso prolongado de voriconazol (VCZ). Los pacientes inmunocompetentes tienen como factor de riesgo la ruptura de la barrera cutánea por traumatismos y quemaduras. Se ha reportado que algunos casos en los que los pacientes sufrieron mucormicosis cutánea sobrevivieron a desastres naturales como tornados, huracanes y tsunamis (Brinder et al.,2014).

2.4 Factores de virulencia y patogenicidad

Los Mucorales capaces de establecer una infección comparten características con otros hongos filamentosos como las vías de ingreso al hospedero, termotolerancia y la evasión de las líneas de defensas del sistema innato: fagocitos, patrones moleculares (PAMP) y células inmunitarias (Katragkou et al., 2014). Además, existen varias características de virulencia específica en los Mucorales que contribuyen con su naturaleza agresiva (infección aguda) y anginoinvasión de tejidos, por ejemplo, su capacidad de unirse a las superficies endoteliales y obtener hierro del hospedero (Petrikos & Tsioutis, 2018).

2.4.1 Captación de hierro (Fe).

Entre los principales factores de virulencia se encuentra la capacidad de adquirir hierro del hospedero. El hierro cumple un papel vital en el crecimiento y desarrollo de la célula, además es básico para la síntesis de ergosterol, los procesos de resistencia a los azoles, la adaptación a la hipoxia y la interacción directa con el sistema inmune (García-Vidal, Salavert, 2014).

La **Figura 2** muestra los diversos mecanismos desarrollados por los hongos para captar y almacenar el hierro en el hospedero (Álvarez et al., 2013). El mecanismo A, se basa en la reducción extracelular del hierro de férrico a ferroso mediante el uso de permeasas de hierro de alta afinidad (FTR1), que reducen el hierro férrico a la forma ferrosa más soluble. El hierro ferroso reducido generado por la reductasa de superficie es, a su vez, capturado por un complejo proteico que consta de una oxidasa multicobre y una permeasa ferrosa (Ibrahim et al., 2012). En general, la captación de hierro se basa en tres componentes: reducción, oxidación e incorporación de hierro; estos procesos son llevados a cabo por la enzima hierro reductasa (Fre), la ferroxidasa (Fet3) y la permeasa (Ftr1) respectivamente (Tahiri et al., 2023).

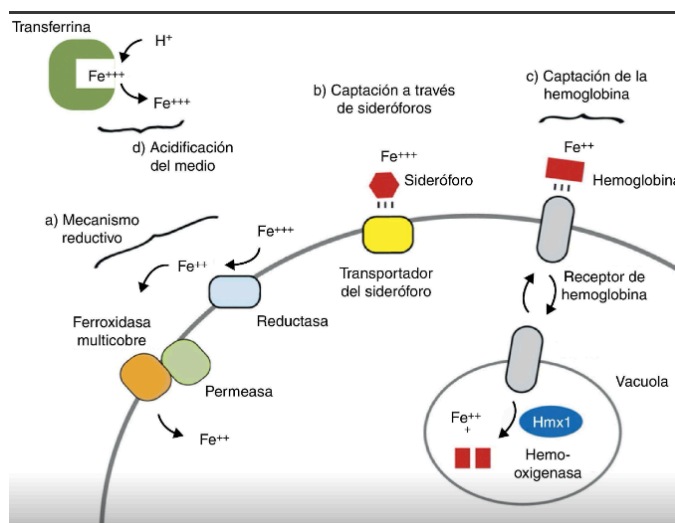


Figura 2. Mecanismos propuestos de captación de hierro para Mucorales. Adaptada y modificada de Chen et al. 2011.

El mecanismo B ocurre mediante quelantes de bajo peso conocidos como sideróforos. Una vez unidos al hierro, los sideróforos introducen este elemento en el interior de la célula a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos. Los sideróforos pueden clasificarse en intrínsecos y extrínsecos los cuales son sintetizados por los hongos o por otros microorganismos respectivamente (Lugito & Cucunawangsih, 2021)

Respecto al mecanismo C, la captación de hierro a través de la hemoglobina está relacionado con una hemo oxigenasa fúngica, una enzima que cataliza la degradación del grupo hemo (H), para producir hierro ferroso el cual es absorbido por estos (Singh et al., 2021). Además, Álvarez y colaboradores en 2013 sugieren que algunos hongos pueden obtener el hierro mediante la acidificación del medio en condiciones anaeróbicas. Este mecanismo puede ser clínicamente relevante, para el caso de la mucormicosis rinocerebral de la cetoacidosis diabética debido a que el pH ácido induce la liberación del hierro desde las proteínas transportadoras, favoreciendo el crecimiento fúngico (Álvarez et al., 2013).

2.4.2 Proteína de la cubierta de esporas (CoH).

En los Mucorales, la angiainvasión es un factor clave de virulencia. Este proceso consiste en la adhesión por parte del hongo a las células endoteliales mediante la expresión de proteínas homólogas de la cubierta de esporas (CoH) (Challa, 2019). Estas proteínas actúan como ligando fúngico de la proteína Grp78p reguladora de glucosa (García-Vidal & Salavert, 2014).

Challa, en 2019 encontró que la expresión de Grp78p aumento en hospederos con niveles elevados de hierro sérico disponible y concentraciones altas de glucosa, expresión que a su vez resultó en una mayor endocitosis de *R. oryzae* por parte de las células endoteliales humanas y daño celular (Liu et al., 2012). La presencia de CoH en los mucorales explicaría así la susceptibilidad específica de los pacientes con cetoacidosis diabética a la mucormicosis, los cuales comúnmente tienen niveles de Grp78p incrementados.

La **Figura 3** representa las interacciones de Mucorales con las células endoteliales durante la diseminación de la infección y el efecto de los factores del huésped en estas

interacciones en la respuesta inmunitaria (Baldin & Ibrahim, 2017). Condiciones como hiperglucemia y cetoacidosis dan como resultado la liberación de hierro de las proteínas mediante glicosilación y protonación, respectivamente. La hiperglucemia aumenta la expresión superficial de la proteína reguladora de la glucosa 78 (GRP78) en las células endoteliales. En conjunto, la glucosa y el hierro libre mejoran la expresión de Coth en la superficie de las células fúngicas, lo que resulta en la invasión del endotelio y el aumento del crecimiento fúngico (Baldin & Ibrahim, 2017).

El fármaco interactúa con los receptores tipo Toll (TLR2) que inducen la liberación de citocinas proinflamatorias, incluidas la interleucina-6 (IL-6), la IL-8, el factor de necrosis tumoral (TNF α) y los monocitos. Además, la interacción con TLR4 produce la liberación de IL-10, citocina antiinflamatoria (Bellocchio et al., 2005).

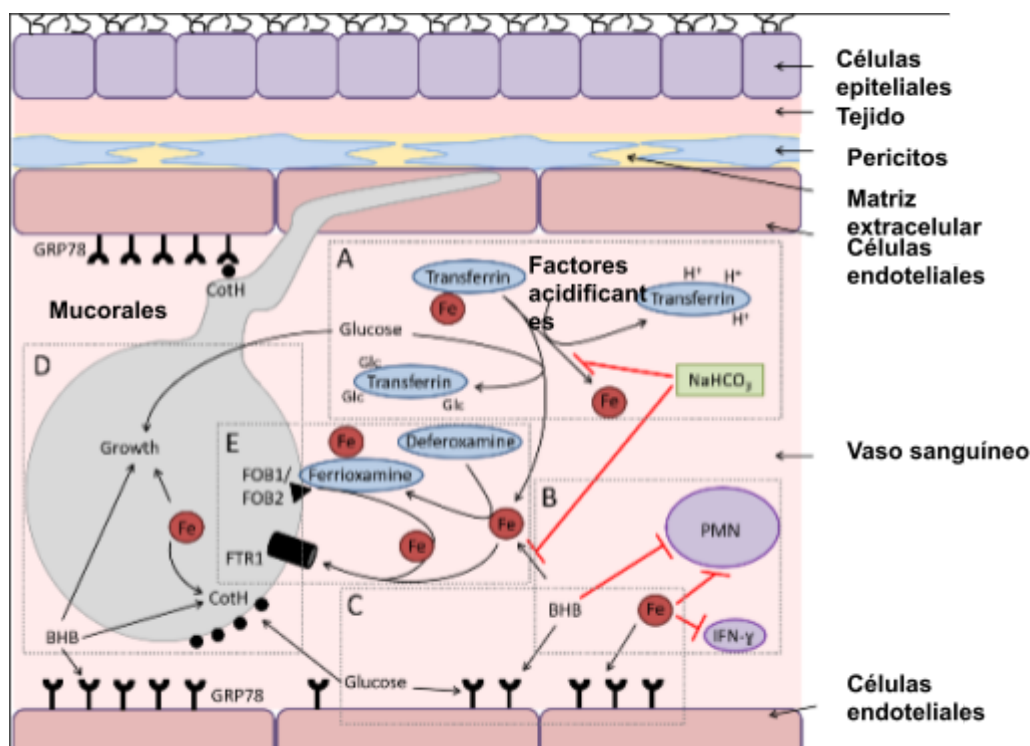


Figura 3. Mecanismos propuestos de interacción entre células endoteliales y Mucorales.

Adaptada de Baldin & Ibrahim, 2017.

2.4.3 Proteína calcineurina

La calcineurina (CaL) es una proteína serina/treonina dependiente de calcio y calmodulina clave en la virulencia de los Mucorales, esta regula la expresión de genes que tienen un papel en la transición de levadura a hifa. La calcineurina está estrechamente relacionada con la actividad de la proteína quinasa A (PKA). Ambas son necesarias para la patogenia de algunos Mucorales. Abdelwahab y colaboradores observaron que la alteración del gen que codifica la proteína Calcineurina dio como resultado la producción de esporas más grandes en comparación con las producidas por la cepa de tipo salvaje, además, de un aumento en la virulencia de este hongo (Abdelwahab & Voigt, 2019).

En *Mucor* spp., la anaerobiosis y la presencia de nutrientes inducen el crecimiento en forma de la levadura, mientras que la aerobiosis y las condiciones de limitación de nutrientes conducen al crecimiento de las hifas. *M. circinelloides* es una de las especies de *Mucor* spp. que ha mostrado dimorfismo (Lax et al., 2020). El análisis de la vía de la calcineurina en *M. circinelloides* reveló que esta vía regula la transición levadura-micelio y la virulencia. La calcineurina realiza su función mediante la desfosforilación de los factores de transcripción que se transportan al núcleo, lo que resulta en la expresión de una subunidad reguladora B (CnbR) y tres subunidades catalíticas A (CnaA, CnaB y CnaC) donde la interrupción del gen CnbR o la adición de inhibidores de calcineurina conlleva a la inhibición de la transición dimórfica y a su vez una menor virulencia (Lax et al., 2020).

2.5 Manifestaciones clínicas

Como se había mencionado anteriormente, la vía de entrada del patógeno al hospedero y las condiciones predisponentes del paciente determinan las diferentes manifestaciones clínicas que se presentan en la mucormicosis.

- Mucormicosis rinocerebral: Se caracteriza por la infección de las fosas nasales, senos paranasales y estructuras intracraneales. El tejido necrótico es el resultado de una trombosis vascular local que genera infarto tisular al infiltrarse en la pared del vaso después de la inhalación de esporas en los senos paranasales. La

infección angioinvasiva se establece una vez las esporas germinan en múltiples hifas en el tejido (Kumar & Gupta, 2022).

- Mucormicosis pulmonar: Esta manifestación clínica se asocia con neoplasias malignas hematológicas. Las lesiones suelen afectar al parénquima, pared torácica, la arteria pulmonar, la aorta, el mediastino o el pericardio (Serris et al., 2019).
- Mucormicosis gastrointestinal: Es la enfermedad más difícil de diagnosticar ante mortem y se observa comúnmente en bebés de bajo peso al nacer, en pacientes con desnutrición o sometidos a diálisis peritoneal (Prakash & Chakrabarti, 2019). El sitio más común de infección es el intestino, el estómago y el esófago. Los pacientes suelen presentar dolor abdominal, sangrado gastrointestinal y diarrea.
- Mucormicosis cutánea/ diseminada: Resulta de la inoculación directa de esporas fúngicas en la piel, lo que puede conducir a una infección diseminada. La presentación típica de la mucormicosis cutánea es la rigidez de la piel con eritema que progresa rápidamente a necrosis (Serris et al., 2019).
- Mucormicosis diseminada: Puede propagarse por vía hematológica a otros órganos, comúnmente los órganos asociados a este tipo de mucormicosis son: el pulmón, el hígado, el bazo y el corazón. Sin el tratamiento adecuado, la mucormicosis diseminada siempre es mortal (Petrikos,2012)

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico oportuno en la mucormicosis es fundamental para tratarla dado su rápida progresión. La sospecha e identificación del agente etiológico siguen siendo un desafío en la clínica y esto se ve reflejado en la alta tasa de mortalidad las cuales oscilan entre 40 % y 80 %, con tasas variables según las condiciones predisponentes y los sitios de infección (Cornely et al.,2019). La capacidad de diagnóstico depende además de la disponibilidad de técnicas, personal capacitado y de investigaciones previas. Entre las técnicas de diagnóstico para la mucormicosis se encuentran: Examen microscópico y cultivo, histopatología, métodos moleculares y proteómicos (Mohanty et al.,2021).

2.6.1 Examen microscópico y cultivo

La microscopía de los mucorales se caracteriza por hifas de ancho variable (6-25 μm) no septadas (cenocíticas) (Skiada et al., 2018). Para un diagnóstico presuntivo se utilizan preparaciones húmedas con hidróxido de potasio (KOH) que mejoran la visualización de las hifas para estos hongos cuando provienen de muestras clínicas (Skiada et al., 2020). Los Mucorales crecen rápidamente, presencia de crecimiento entre 24-48 horas en la mayoría de los medios de cultivo de hongos, como el agar Sabouraud o agar papa dextrosa incubados a una temperatura de 25 °C a 30 °C, aunque existen especies termotolerantes capaces de crecer a $\geq 37^\circ\text{C}$ (Skiada et al., 2018). La **Figura 4**, muestra las principales características morfológicas a nivel macro y micro de especies pertenecientes a este orden.

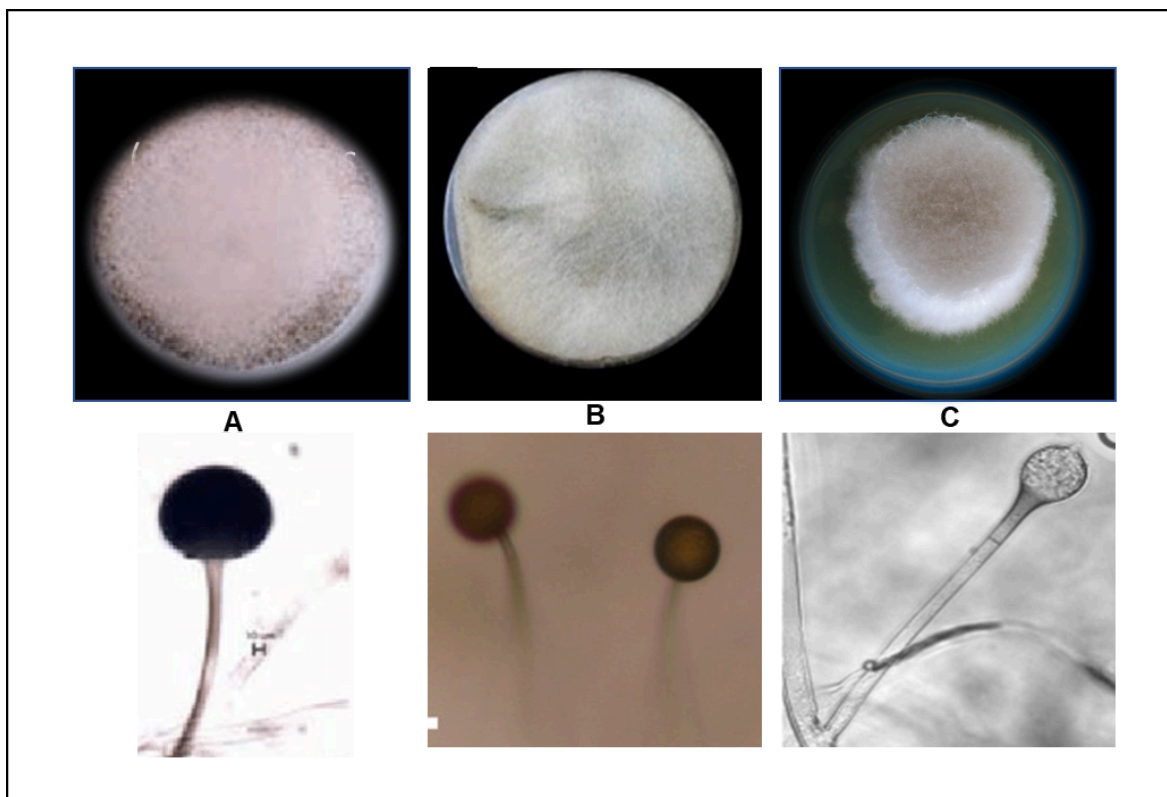


Figura 4. Características morfológicas de algunas especies del orden Mucorales a nivel macroscópico y microscópico. (A). *Rhizopus* spp. (B) *Mucor* sp. (C) *Absidia* spp. Adaptada de Hoffman et al., 2013. Cruz-Lachica et al., 2017.

2.6.2 Histopatología

Un diagnóstico presuntivo/definitivo se basa en la demostración de hifas fúngicas típicas de los mucorales en biopsias de los tejidos afectados. Las tinciones de rutina con hematoxilina y eosina (H & E) pueden evidenciar las características morfológicas típicas de estos hongos, otras tinciones que pueden ayudar a resaltar la pared fúngica incluyen las tinciones de metenamina-plata (GMS) de Grocott y PAS de ácido peryódico de Schiff (Skiada et al.,2020)

2.6.3 Métodos moleculares

El diagnóstico molecular se basa en el análisis de secuencias de ADN amplificadas mediante PCR (Reacción en cadena de polimerasa). o mediante el análisis de todo el material genético presente en la muestra (e.g., metagenómica). En la mayoría de los casos, los cebadores se dirigen al gen del ARN ribosomal ARNr 18S y el ARNr 28S (incluido D1/D2), las secuencias intergénicas (IGS1 e IGS 2) y los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). El CLSI recomienda el uso de la región ITS para la identificación de especies de Mucorales porque demuestra una buena diferenciación entre los géneros (Lackner et al., 2021).

2.6.4 Proteómica

La identificación basada en las proteínas citoplasmáticas de los microorganismos se lleva a cabo mediante MALDI-TOF MS (Espectrometría de masas de desorción láser asistida por matriz en tiempo de vuelo por sus siglas en inglés). Esta tecnología genera huellas dactilares espectrales de masas características de cada microorganismo y, por lo tanto, son ideales para una identificación microbiana precisa a nivel de género y especie (Croxatto, 2012). El uso de MALDI-TOF en la identificación de hongos filamentosos ha facilitado la identificación de estos en los laboratorios de microbiología clínica (Robert et al., 2021).

2.7 Tratamiento

El tratamiento para la mucormicosis según los lineamientos establecidos en la Conferencia Europea de Micología Médica (ECMM) es la anfotericina B liposomal (L-AmB) (tratamiento de primera línea en adultos) (Brunet & Rammaert, 2020). Wagner y colaboradores en 2019 evaluaron el perfil de susceptibilidad de 18 especies oportunistas frente a seis antifúngicos, con el fin de describir la eficacia terapéutica *in vitro* del arsenal terapéutico frente a los aislamientos clínicos. En dicho estudio, se pudo observar que el fármaco con mayor actividad fue AMB con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 0.03 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y la CMI para isavuconazol (ISA), itraconazol (ITC) y/o POS fueron de 2 - >8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.016 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.016 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Wagner et al., 2019).

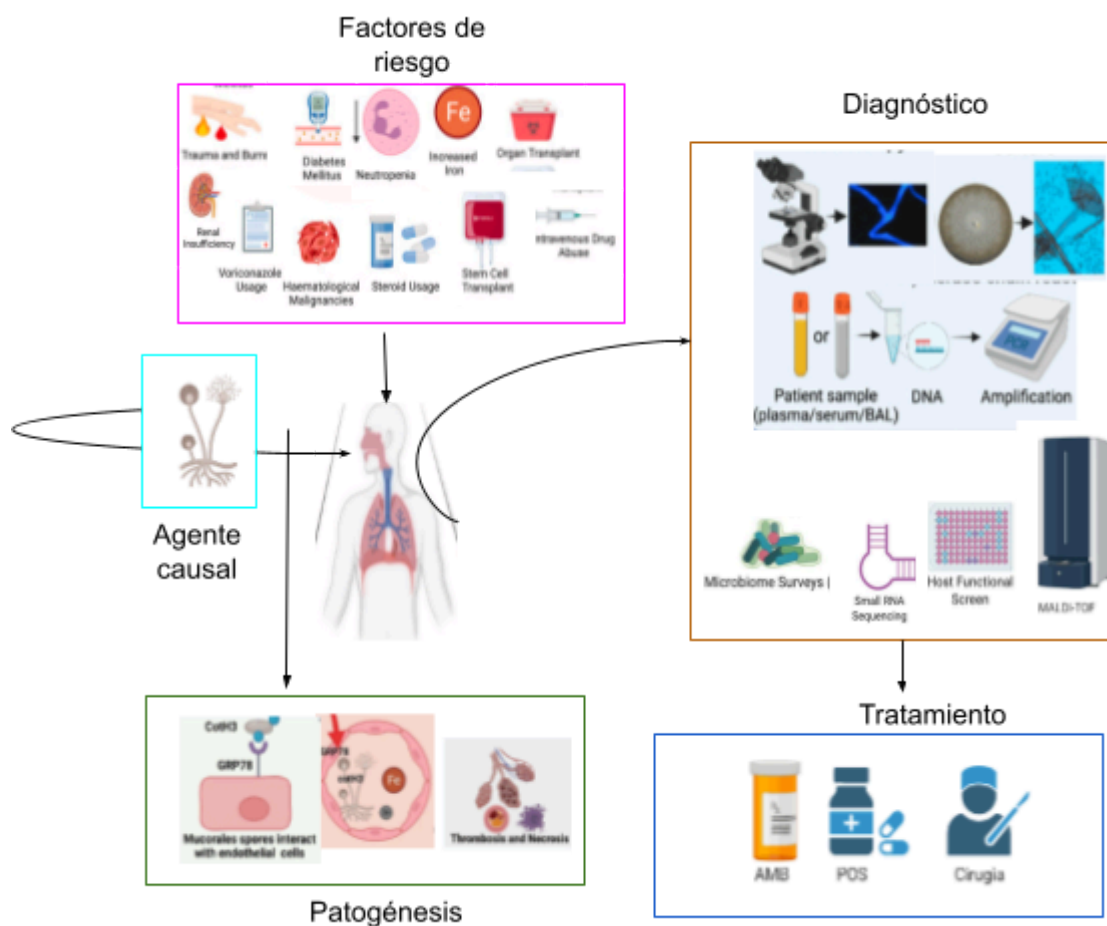


Figura 5. Imagen resumen mucormicosis. Adaptada de Danion et al., 2023. Muthu et al., 2021, Mahalaxmi et al., 2021. Chandley et al., 2022. Soare et al., 2020.

2.7.1 Anfotericina B (AMB)

En el año 1949, Elizabeth Hazen y Rachel F. Brown aislaron el primer polieno con propiedades antifúngicas; la Nistatina. Esta fue purificada de una muestra de suelo como producto de la fermentación de *Streptomyces noursei* convirtiéndose en uno de los primeros antimicóticos del mercado. Sin embargo, la nistatina tenía una absorción gastrointestinal deficiente y solo podía usarse para tratar micosis tópicas. Para el año 1953 se continuó la búsqueda de productos en suelo, y en un cultivo de *Streptomyces nodosus*, cultivado a partir de una muestra de suelo de la cuenca del Orinoco en Venezuela, se encontró actividad antifúngica aislando allí dos compuestos activos: anfotericina A y AMB, polienos químicamente similares a la nistatina (Carolus et al., 2020). Se observó que la anfotericina A presentaba un espectro antifúngico similar al de la nistatina, mientras que la AMB tuvo una actividad antifúngica significativamente mayor en comparación con los otros dos polímeros. Después de 60 años, este antifúngico sigue siendo una opción terapéutica eficaz para tratar enfermedades fúngicas progresivas y mortales (Cavassin et al., 2021).

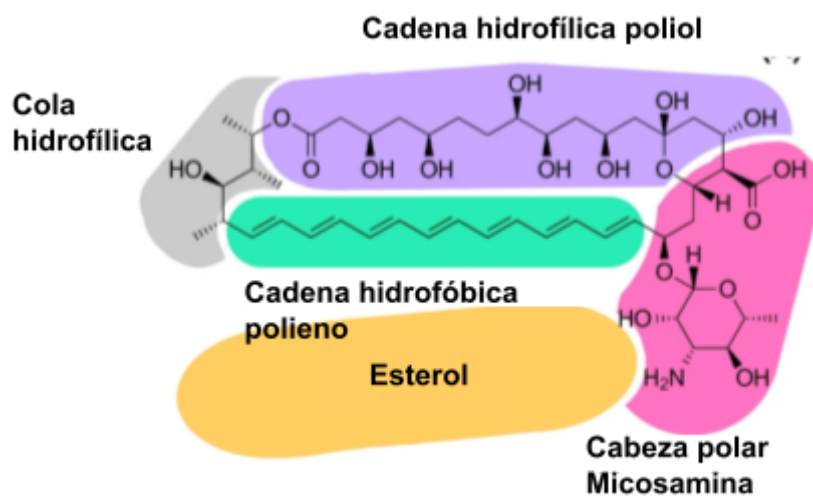


Figura 6. Composición molecular AMB. Adapta de Cavassin et al., 2021.

La estructura de la molécula de AMB se compone de una lactona macrocíclica (anillo) y una cadena doble de enlaces conjugados (grupo hepteno no polar). El anillo contiene un grupo micosamina glicosilado en el C19, un grupo amino en la cabeza de micosamina y

un grupo carboxilo en el C16 que determina la naturaleza anfotérica de AMB y dificulta su solubilidad en agua (**Figura 6**) (Liu et al., 2016). El carácter anfílico de la AMB se explica por que posee siete enlaces dobles conjugados en conformación trans, responsables de su carácter hidrofóbico y cinco grupos hidroxilo del carbono 3 al 11 que le confieren hidrofiliidad (Arias-Patrón, 2020).

La AMB tiene efectos sobre la célula fúngica uniéndose al ergosterol de la membrana lo que puede generar: formación de poros-secuestro del ergosterol e inducción al daño oxidativo (Mesa-Arango, 2012). La formación de poros se da por que las moléculas de AMB se agregan en forma de barril a través de la bicapa con los grupos de cadenas polihidroxiladas apuntando hacia adentro y los segmentos de heptano apuntando hacia afuera (Arias-Patrón, 2020), esto hace que la célula pierda iones y moléculas polares indispensables para su funcionamiento. Además, las células detectan la unión del antifúngico a la membrana y desencadenan una señal que produce un fenotipo similar a la apoptosis induciendo un estallido oxidativo que aumenta ROS produciendo efectos nocivos sobre: la membrana, mitocondrias, proteínas y ADN que dan como resultado la muerte celular (Wang et al., 2021). La **Figura 7** presenta una síntesis de los principales mecanismos de acción para el polieno AMB que se mencionaron anteriormente.

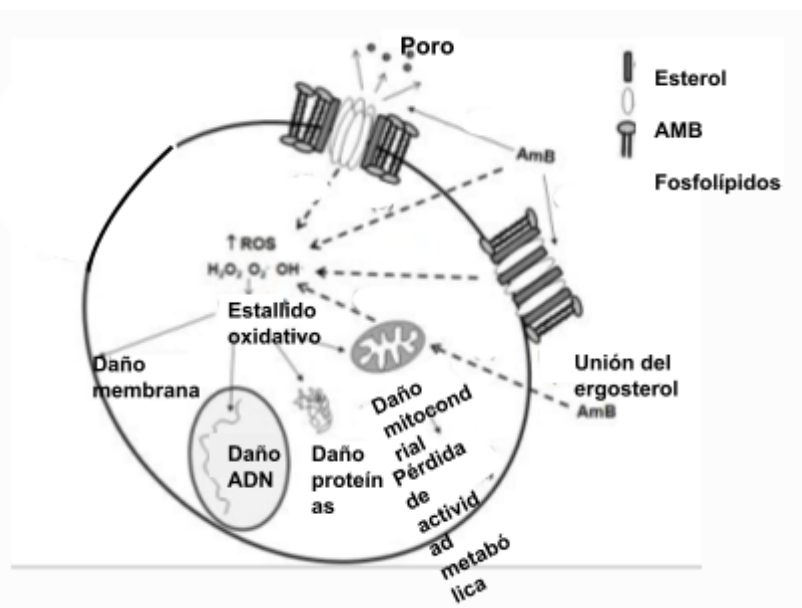


Figura 7. Mecanismos de acción AMB. Adaptada de Mesa-Arango et al., 2012.

2.7.1.1 Problemas asociados al uso de AMB

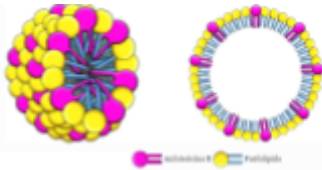
Uno de los principales problemas asociados al uso de AMB se debe a los efectos secundarios más comunes que incluyen: pérdida de potasio y magnesio, anafilaxia, fiebres, a largo plazo anemia normocítica normocrómica debido a las bajas concentraciones de eritropoyetina y nefrotoxicidad (Noor & Preuss , 2023).


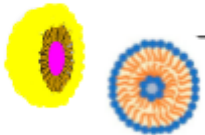
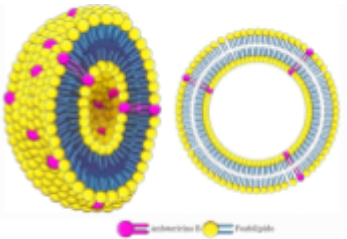
La AMB además, presenta toxicidad frente a células humanas tales como los glóbulos rojos. Esto se atribuye a la habilidad de AMB de complejar los esteroides presentes en las membranas celulares y por tanto el mecanismo de toxicidad es similar al que explica su actividad antifúngica, debido a las similitudes estructurales entre las moléculas de colesterol y ergosterol (Arias-Patron,2020). Esto conduce a un efecto secundario importante: la nefrotoxicidad. Después de la infusión de AMB, se produce un efecto vasoconstrictor rápido en las arteriolas renales lo que provoca una disminución de la tasa de filtración glomerular aumentando el tiempo de vida media de eliminación y la acumulación en riñón (Hamill, 2013).

2.7.1.2 Formulaciones sobre AMB

Con el fin de atenuar el problema de nefrotoxicidad, a lo largo de los años se han buscado alternativas que permitan movilizar este fármaco. La **Tabla 1** muestra las principales formulaciones de AMB utilizadas como tratamiento que mostraron un mejor perfil de seguridad, con efectos adversos reducidos (Tonin et al., 2017).

Tabla 1. Principales formulaciones de la Anfotericina B (Wang et al., 2021) (Cavasin et al.,2021)

Nombre	Característica	Estructura
AMB deoxicolato de sodio (AmBd)	El desoxicolato de sodio se utiliza como solubilizante para aumentar la escasa solubilidad de AmB. La nefrotoxicidad es el efecto adverso más grave que puede llevar a los pacientes a diálisis.	

<p>Complejo lipídico AMB (ABLC)</p>	<p>Complejo lipídico de AmB que contiene AmB conjugada con dos fosfolípidos DMPC y DMPG, utilizado como tratamiento de segunda línea para la micosis sistémica severa, particularmente para pacientes resistentes.</p>	
<p>Dispersión coloidal AMB (ABCD)</p>	<p>Una de las dispersiones coloidales preparadas con base a la afinidad entre AmB y esterol. Se compone de AmB y sulfato de colesterol sódico. Se utiliza cuando los pacientes no pueden recibir AmBd convencional debido al daño renal grave.</p>	
<p>Liposomal (L-AmB)</p>	<p>La AmB se intercala en liposomas que consisten en fosfatidilcolina de soja hidrogenada y colesterol. Se suele utilizar en pacientes febriles o neutropénicos. Aunque induce comparativamente menos efectos adversos, la función hepática debe controlarse de cerca durante la medicación.</p>	

Dependiendo de la formulación existen problemas asociados a la estabilidad de la AMB cuando se somete a condiciones desfavorables como la exposición al calor, la luz y un pH ácido. Las soluciones acuosas de AMB suelen ser más estables durante períodos prolongados de exposición al aire y la luz si el pH se mantiene entre 4 y 10 (Cifani et al., 2012). La estabilidad de los liposomas por otra parte se debe al hecho de que el CH y el diestearoil fosfatidilglicerol (DMPG) presentan una temperatura de transición elevada (55°C) cerca de la cual la formulación tiende naturalmente a colapsar, liberando su contenido. En la dispersión coloidal, los fosfolípidos tienen una temperatura de transición de 23 °C, que es inferior a la temperatura corporal; implicando que el complejo lipídico puede desintegrarse antes de alcanzar el lugar de la acción y dificultando así la entrega del fármaco (Cifani et al., 2012).

La **Figura 8**, muestra los principales eventos relacionados con el descubrimiento y evolución de los mecanismos de entrega de AMB hasta la fecha, utilizados como tratamiento antifúngico contra EFIs.

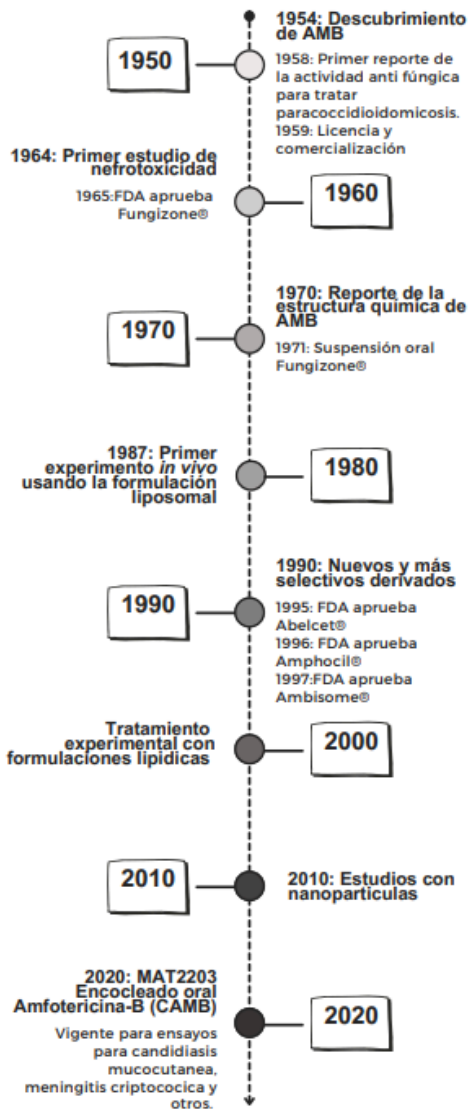


Figura 8. Línea del tiempo, principales eventos del descubrimiento y evolución de formulaciones para AMB. Adaptada de Cavassin et al., 2021.

2.8 Resistencia antifúngica en los Mucorales

En Mucorales, existe resistencia innata a los azoles de cola corta como fluconazol (FLC) y el VCZ. Estos hongos presentan dos parálogos de CYP51 (esterol 14-desmetilasa): CYP51 F1 y CYP51 F5. La secuencia de aminoácidos en diferentes especies de Mucorales mostró que mutaciones en el sitio activo LDM F5 crean un cambio estructural importante que podría explicar porque no se puede inhibir a CYP51, asociando este cambio estructural como la principal responsable de la resistencia innata a los azoles de cola corta observada en Mucorales (Tahiri et al., 2023). Por otra parte, la resistencia adquirida a los azoles involucra mutaciones puntuales de un solo nucleótido no sinónimas (nsSNPs) que modifican el LDM y reducen su afinidad por uno o más tipos de triazol (Caramalho et al., 2017).

Los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol al dirigirse activamente contra la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa codificada por el gen *CYP51/ERG11*, esta enzima pertenece a una superfamilia de monooxigenasas denominada citocromo P450, cuyos miembros participan en diversas funciones biosintéticas (Gollapudy, Ajmani & Kulkarni, 2004). La inhibición de la biosíntesis de ergosterol conduce a la acumulación intracelular de intermediarios tóxicos que perturban la estabilidad de la membrana y detienen el crecimiento de hongos (Ganesan et al., 2022).

La resistencia a los agentes antimicóticos también es conferida por la sobreexpresión de transportadores de múltiples fármacos, la alteración del objetivo del fármaco y el inicio de respuestas de estrés. La resistencia a los azoles se ha relacionado con dos formas de transportadores de membrana que se encuentran en los hongos: los ABC-T conocidos como transportadores de cassette de unión de trifosfato de adenosina dependientes de ATP y los MFS-T transportadores facilitadores principales que requieren un gradiente de protones en el citoplasma como fuente de energía (Ganesan et al., 2022).

Además, en hongos como *M. circinelloides* se puede desarrollar resistencia a los fármacos antifúngicos a través de una vía basada en ARNi. Un mecanismo altamente conservado entre los eucariotas basado en la producción de pequeños RNA no codificantes (sRNA), donde la modificación del núcleo central mediante la adición o eliminación de componentes genera diferentes tipos de vías (Lax et al., 2020). Un ejemplo

específico de este silenciamiento por ARNi en *Mucor circinelloides* confiere resistencia a la rapamicina y a moléculas que presentan actividad antifúngica como el tacrolimus FK506 (inhibidor de Calcineurina) por epi mutación donde estos epimutantes albergan pequeños ARN antisentido (ARNs) específicos del gen *fkbA* que desencadenan la degradación del ARNm previniendo la producción del objetivo del fármaco FK506, FKBP12 (Chang et al., 2019 -Lax et al., 2020). El silenciamiento de los genes a los que se dirige el fármaco durante un período corto y la expresión después de la exposición pueden desencadenar resistencia Lax et al., 2020).

En polienos como AMB, la resistencia presentada por estos hongos es baja. Sin embargo, está relacionada con mutaciones en *ERG3* y *ERG6* lo que provoca una disminución de las concentraciones de ergosterol y de la sensibilidad a la anfotericina B *in vitro* (Ganesan et al., 2022). En un reporte de caso de mucormicosis rinocerebral (ROCM), se encontró que el paciente presentaba una infección por *Apophysomyces elegans* y al administrar AMB liposomal intravenosa el estado del paciente empeoró, las pruebas de susceptibilidad con AMB mostraron que la CIM para Anfotericina B fue de 16 µg/mL (Biswas, 2015).

2.9 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas son agregados coloidales de polímeros que permiten la liberación de fármacos de forma dirigida y tienen un tamaño de 1 a 1000 nm (Sur et al., 2019). Los polímeros utilizados para formar las nanopartículas (nanoencapsulados) deben cumplir con varias características tales como: no ser tóxico, biodegradable, biocompatible, proteger la carga útil del fármaco de la degradación y proporcionar la administración del fármaco de manera estable (Zhang et.al, 2017). Las características de estos agregados coloidales son importantes en términos de su aplicabilidad, pero también para determinar su nanotoxicidad, riesgos para la salud y la seguridad, así como para controlar los procesos de fabricación (Zielinska et al., 2020) . La **Tabla 2** muestra las principales características de las nanopartículas a tener en cuenta para el desarrollo y uso de estas fuera de su morfología y distribución del tamaño.

Tabla 2. Características de las nanopartículas. Tomado de Zielinska et al, 2020.

Característica	Descripción
Composición química	Los elementos atómicos de los que se compone una nanopartícula, así como a los grupos funcionales nativos o formados de los compuestos.
Superficie	Influencia sobre la reactividad y las interacciones superficiales con los ligandos.
Distribución de masa molar	Influencia de los componentes de la formulación en el proceso de polimerización, la ocurrencia de reacciones químicas entre el fármaco y el polímero, y también sobre la degradación del polímero.
Potencial Z	Muestra la carga superficial de las partículas, la cual está influenciada por cambios en la interfaz con el medio dispersante, debido a la disociación de grupos funcionales en la superficie de la partícula.
pH suspensiones	El cambio de pH puede indicar la degradación del polímero, ya que implica cambios en la protonación en la superficie de las partículas.
Cinética de liberación	La liberación de fármacos de las NP poliméricas depende de los siguientes factores: difusión y erosión.

Estas nanopartículas poliméricas tienen ventajas asociadas como: liberación controlada y sostenida del fármaco durante el transporte y en el lugar de localización, no desperdicio de fármaco y por lo tanto mejor biodisponibilidad del fármaco en el lugar específico en la proporción adecuada durante un período prolongado reduciendo la frecuencia de administración, además de mejorar la solubilidad de los fármacos poco solubles en agua (Singh et.al, 2011). Las desventajas de estas nanopartículas se basan principalmente en la necesidad de instrumentos sofisticados, altos costos y difícil producción a escala (Sur et al., 2019).

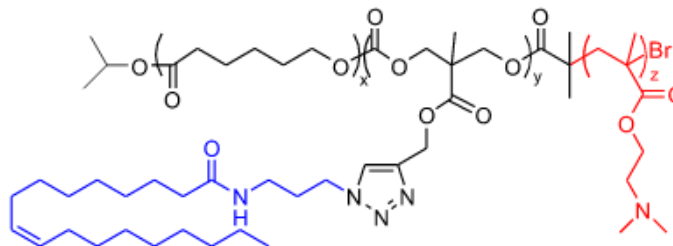


Figura 9. Estructura general de los copolímeros. Tomado de Díaz-Ariza, 2014.

Díaz-Ariza en 2021 sintetizó y caracterizó cuatro formulaciones de AMB nanoencapsulada cuya estructura general se muestra en la **Figura 9**. Estos copolímeros poseen un segmento hidrófobo de policaprolactona (PCL) modificada con ácido oleico (OI) y un segmento hidrófilo y policationico de poli (2-(dimetilamino) etil metacrilato) (PDMAEMA) que disminuye la capacidad para interactuar con el CH en las células de los mamíferos.

2.10 *Galleria mellonella* como modelo *In-vivo*

Los modelos animales permiten tener un acercamiento mayor a lo que sucede en la interacción entre el patógeno y el hospedero. Entre los modelos animales más utilizados en los últimos años tenemos a la larva de la polilla de cera *Galleria mellonella*, el cual es un organismo invertebrado que presenta un alto grado de similaridad estructural y funcional con el sistema inmune innato de los vertebrados, formado por una respuesta celular y humoral (Pereira at.al, 2020). Entre las ventajas de este modelo se tiene: fácil manipulación dado su tamaño, bajo costo de mantenimiento, ninguna restricción legal o ética. Además, pueden ser utilizadas para evaluar toxicidad y eficacia de fármacos (Kavanagh & Sheehan,2018).

El uso de este modelo para evaluar agentes antifúngicos ha sido ampliamente estudiado en hongos. En 2015 Mauer y colaboradores demostraron que para 5 aislamientos de *Aspergillus terreus* la AMB presentaba un rango de CIM de 2 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para dos aislamientos que eran resistentes (ATR) y un rango de CIM de 0,25 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las tres cepas susceptibles a AMB (ATS). Resultados concordantes con lo obtenido en el modelo *Galleria mellonella* que a su vez fueron similares a los obtenidos con estas mismas cepas en un modelo murino (Mauer et al., 2015).

Otro estudio en 2019 evaluó la combinación de antifúngicos con VCZ contra Mucorales *In vitro* e *In vivo* obteniendo como resultado que estas combinaciones (VCZ, AMB, POS y Caspofungina (CAS)) demostraron ser sinérgicas contra hongos resistentes a los azoles y alterando la conformación de las hifas, lo que conlleva a un aumento de la supervivencia en las larvas infectadas (Macedo et al., 2019).

3. Objetivos

3.1 General.

Evaluar la actividad *In vitro* e *In vivo* de nanoencapsulados de Anfotericina B en aislamientos de Mucorales.

3.2 Específicos.

- Caracterizar fenotípicamente (identificación y perfiles de susceptibilidad) los aislamientos ambientales de Mucorales.
- Determinar el efecto antifúngico de los nanoencapsulados de Anfotericina B en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.
- Establecer las características de citotoxicidad y capacidad hemolítica de los nanoencapsulados de Anfotericina B.
- Evaluar la efectividad de las formulaciones de Anfotericina B en un modelo de mucormicosis invasiva en larvas de *Galleria mellonella*.

4. Materiales y métodos

4.1 Aislamientos fúngicos

En total, siete aislamientos ambientales fueron suministrados por el Laboratorio de Micosis Humanas y Proteómica (MICO-HP) de la Pontificia Universidad Javeriana, provenientes del cepario de la Universidad. Para la reactivación de estos hongos, los mismos se sembraron en agar Sabouraud (Sigma-Aldrich) a 30°C durante 7 días.

4.2 Identificación mediante MALDI-TOF

Los aislamientos se identificaron mediante MALDI-TOF MS siguiendo el protocolo descrito por el fabricante Bruker Daltonik con ligeras modificaciones de Prieto-Nuñez, 2018. Se recogió una mezcla de esporas y micelio del cultivo con la ayuda de un hisopo de algodón estéril. El material fúngico se transfirió a un microtubo de 1,5 mL que contenía 300 μ L de agua destilada estéril, se agitó y se añadieron 900 μ L de etanol al 70 %. Después de centrifugar durante 2 min a 13.000 rpm, el sedimento se resuspendió en una mezcla que contenía 50 μ L de ácido fórmico al 70 % y 50 μ L de acetonitrilo. Después de centrifugar durante otros 5 min a 13.000 rpm, se depositaron 0,9 μ L del sobrenadante en una placa de acero MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, cada muestra se cubrió con 0,8 μ L de HCCA matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Los espectros de masas de proteínas se analizaron utilizando el software Flex Control y los espectros de referencia MALDI Biotyper versión 3.1 7311 (espectros principales) (Bruker Daltonics)).

Se consideró correcta identificación a nivel de especie, si el valor de rango obtenido a partir de los espectros obtuvo puntuaciones de ≥ 2.0 . Los aislamientos identificados con incertidumbre a nivel de especie presentaron puntuaciones de $< 1,9$).

4.3 Nanoencapsulados de AMB

Las formulaciones que se evaluaron se describen en la **Tabla 3** cuyos valores de concentración de AMB encapsulada oscilan entre 3.2% y 5.1 %. El porcentaje de AMB encapsulada corresponde al peso de AMB presente respecto al peso total de la micela. Para términos del experimento las concentraciones evaluadas se normalizaron teniendo en cuenta este parámetro.

Tabla 3. Nanopartículas de AMB evaluadas

Convención	Formulación	Composición promedio	Concentración AMB (ppm)	Potencial ζ (mV)	Tamaño de partícula (nm)
Pol I	AMB PP5	P(CL ₂₆ -co-(MPC-g-OI) ₅ -b-PDMAEMA ₃₄)	4.6	43.4 ± 5.7	134 ± 4
Pol II	AMB PP10	P(CL ₂₆ -co-(MPC-g-OI) ₅ -b-PDMAEMA ₆₉)	4.25	47.3 ± 1.1	206 ± 3
Pol III	AMB PP20	P(CL ₂₆ -co-(MPC-g-OI) ₅ -b-PDMAEMA ₁₄₀)	5.1	48.4 ± 1.1	231 ± 2
Pol IV	AMB PPOI	mPEG ₄₅ -b-PCL ₂₅ -co-(MPC-g-Oleico) ₅	3.2	3.0 ± 0.7	127 ± 1

- OI: Es un ácido graso monoinsaturado caracterizado por ser el más abundante de los aceites en la naturaleza. Usado para mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles mejorando la entrega de AMB en formulaciones orales (Arias-Patrón, 2020).

4.4 Susceptibilidad antifúngica.

La evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de AMB y AMB nanoencapsulada se realizó bajo la metodología descrita por EUCAST 9.3 de 2015. Las cepas evaluadas se cultivaron en agar Sabouraud por 3 días a 35°C, luego se realizó un inóculo de 1x10⁵ UFC/ml (Escala 0.5 McFarland) en medio RPMI suplementado con 2% glucosa, se agregaron 100 µL de este inóculo en placas de microdilución fondo plano y 100 µL de las concentraciones a evaluar de antifúngicos (0.03-16 mg/L) para las formulaciones de AMB y para AMB. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas, la lectura se realizó

visualmente. El control de calidad de la prueba se llevó a cabo con las cepas de referencia *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258, cepas recomendadas por EUCAST (EUCAST, 2015).

Para llevar a cabo la determinación de CMI bajo condiciones de anaerobiosis en las formulaciones de AMB, se realizó el protocolo anteriormente descrito, incubando las placas en condiciones de anaerobiosis (sistema de anaerobiosis GenBag BioMerieux) por 24 horas a 35°C. La determinación de CMI se realizó visualmente.

4.5 Actividad hemolítica

Los análisis se realizaron siguiendo el protocolo publicado por Evans et al.,2013, sangre de un donante sano con Rh O positivo se colectó en un tubo que contiene solución anticoagulante (1 mM de EDTA), a continuación se centrifugó a 500× g durante 5 min para separar los glóbulos rojos. Se realizaron dos lavados con Buffer fosfato salino (PBS). Se preparó un stock de 2x de las concentraciones de antifúngicos a evaluar: 0.03 - 16 mg/L para las formulaciones de AMB nanoencapsulada y AMB convencional.

En placas de 96 pozos fondo U, se transfirieron 190 µL de la suspensión globular, y se agregaron 10 µL de las soluciones stock a evaluar. Las placas se incubaron a 37°C en agitación por 1 hora, pasado el tiempo se transfirieron 100 µL del sobrenadante a un placa fondo plano para medir su absorbancia a una longitud de onda de 490-514 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado. Para calcular el porcentaje de hemólisis se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO control negativo}}{\text{DO control positivo} - \text{DO control negativo}} \times 100$$

Los controles negativos corresponden a la absorbancia de los glóbulos rojos añadiendo solución salina y el control positivo a la absorbancia al añadir etanol absoluto.

4.6 Citotoxicidad

La citotoxicidad de las formulaciones de AMB se evaluó en Fibroblastos L929 empleando el ensayo colorimétrico MTT descrito por Usman et al., 2018. En placas de 96 pozos se sembraron Fibroblastos L929 (21.000 células/Pozo), se dejaron adherir y proliferar durante 24 horas en medio DMEM. Se lavaron las células con PBS y se agregaron 30 µL de MTT (sal de tetrazolio, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1mg/ml en PBS. Las placas se incubaron nuevamente a 37°C por 4 horas, pasado este tiempo se retiró el MTT y se agregaron 100 µL de DMSO (MERCK) para solubilizar los cristales de Formazan. Por último, se midió la densidad óptica (DO) a 490 y 530 nm con un lector de microplacas, cada ensayo se realizó por triplicado y porcentaje de viabilidad celular se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\%viabilidad = \frac{DO \text{ células tratadas con micelas poliméricas con y sin AMB}}{DO \text{ células no tratadas}} \times 100$$

4.7 Modelo *In vivo Galleria mellonella*

Los ensayos de mortalidad se realizaron en *G. mellonella* según lo descrito por Fallon et al. Brevemente, se utilizaron larvas del último (sexto) estadio con un peso aproximado de 300 mg provenientes de Perkins LTDA (Palmira, Colombia). Las larvas, en grupos de 10, se inyectaron a través de la última pro pata en la hemocela con 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 esporas en un volumen de 10 µl utilizando una jeringa BD de 0,5 mL. Para el ensayo de mortalidad utilizando AMB como tratamiento, las larvas recibieron un inóculo de 10 µL y 10 µL de AMB (300 µg/larva), AMB PolII (150-300µg/larva), o su combinación. Tras la inoculación, las larvas se colocaron en placas de Petri y se incubaron en la oscuridad a 37°C. El seguimiento de supervivencia se realizó cada 24 h durante un periodo de 10 días, se retiró la seda de las larvas y se registró la muerte y melanización de los insectos. Se consideraron a las larvas muertas cuando no se observó movimiento ni respuesta a un estímulo físico aplicado (Amorim-Vaz et al., 2015). Para comparar la mortalidad, se realizaron tres réplicas biológicas. Se utilizó un grupo de 10 larvas para cada uno de los controles: absoluto (sin limpiar, sin inocular), desinfección (limpiadas con etanol al 60%),

vehículo (recibieron 10 μ L de DMSO 5%), otro grupo (recibieron 10 μ L de Micela vacía) e inoculación (recibieron 10 μ L de PBS estéril).

4.8 Análisis estadístico

Las gráficas y análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prisma 8.1. Los ensayos de citotoxicidad, actividad hemolítica y concentración mínima inhibitoria (CMI) de AMB y sus formulaciones, se analizaron mediante un análisis de varianza de dos factores. Las curvas de supervivencia se construyeron mediante el método de Kaplan y Meier y, posteriormente, se compararon mediante la prueba de Log-Rank (Mantel-Cox). Las diferencias estadísticas se consideraron significativas cuando se obtuvieron valores de $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Identificación aislamientos fúngicos

Los resultados de identificación mediante MALDI-TOF MS para los siete aislamientos utilizados en este estudio fueron: *Mucor circinelloides* 4/7 (57,1%), *Rhizopus stolonifer* 2/7 (28,6%) y *Absidia caerulea* 1/7 (14,3%). En la **Figura 10** se observan las características micro- macroscópicas de los siete aislamientos anteriormente identificados i.e., *Mucor circinelloides* (M.C,1-4), *Rhizopus stolonifer* (R.S, 1,2) y *Absidia caerulea* (A.C 1).

Los aislamientos R.S 1,2 (**Figura 10A-B**) exhibieron un crecimiento en caja de tipo algodonoso, blanco con terminaciones de color negro. La microscopía de estos permitió observar hifas hialinas cenocíticas con un esporangio grueso. Para los aislamientos M.C 1-4 (**Figura 10 C-F**) se evidencio un crecimiento algodonoso de color cafe/verdoso con blanco y respecto a su microscopia los cuatro aislamientos presentaron hifas hialinas delgadas con un esporangioforo redondo y una columnela notoria. Por último, el aislamiento A.C 1 (**Figura 10 G**) presento un crecimiento en caja de color blanco algodonoso y un esporangio hialino cenocitico con terminación de una espora globosa.

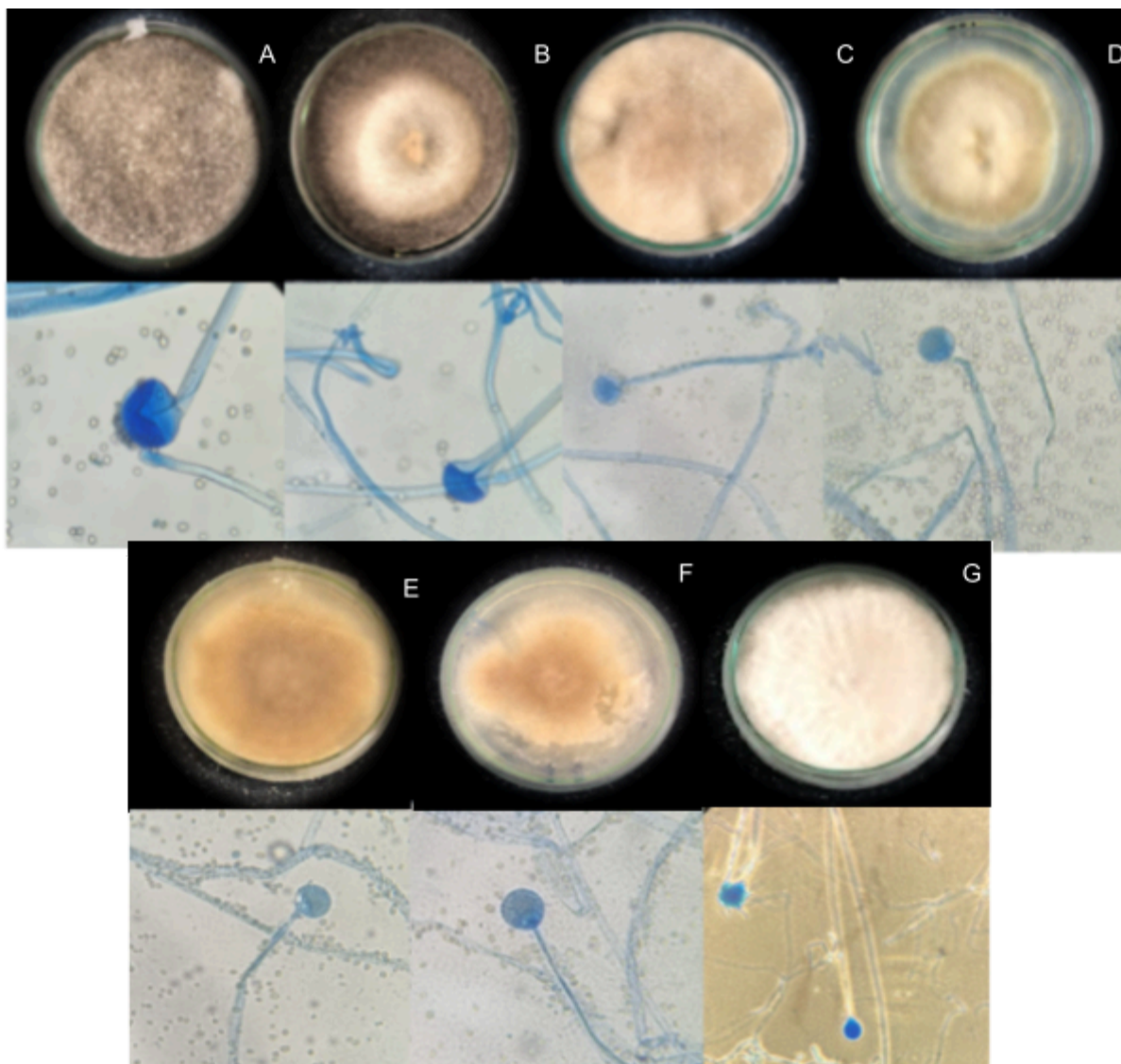


Figura 10. Macroscopía y microscopía de los aislamientos evaluados. **A.** *Rhizopus stolonifer* (R.S 1). **B.** *Rhizopus stolonifer* (R.S 2). **C.** *Mucor circinelloides* (M.C 1). **D.** *Mucor circinelloides* (M.C 2). **E.** *Mucor circinelloides* (M.C 3). **F.** *Mucor circinelloides* (M.C 4). **G.** *Absidia caerulea* (A.C 1).

Imágenes tomadas mediante un microscopio óptico en el objetivo de 40x.

5.2 Actividad antifúngica *In vitro*

Para determinar los perfiles de susceptibilidad de las cepas frente a la formulación convencional de AMB y nanoencapsulados de AMB, se llevó a cabo el método de microdilución en caldo bajo los lineamientos de EUCAST (**Figura 11**). Las cepas de *R. stolonifer* (R.S 1,2) presentaron una CMI de 0,5 mg/L para AMB convencional mientras

que para las formulaciones de AMB Pol I, Pol II, Pol III y Pol IV las CMI obtenidas fueron de 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L y 0,25 mg/L, respectivamente.

Los aislamientos de *M. circinelloides* (M.C 1-4) presentaron diferentes valores de CMI para AMB convencional; con CMIs de > 8 mg/L, 1 mg/L, 0.5 mg/L y 1 mg/L, respectivamente. Interesantemente, en los nanoencapsulados de AMB (Pol I, Pol II, Pol III y Pol IV) se observó reducción en los valores de CMI para las cuatro cepas y con todas las moléculas. El Pol III causó la mayor reducción de crecimiento, con valores de CMI de 0.125-0.031 mg/L.

Para el aislamiento de *A. caerulea* (A.C1), se obtuvo una CMI frente a AMB de 0.5 mg/L, mientras que para los nano-encapsulados se observaron CMIs de 1-2 mg/L. En general, los nano-encapsulados Pol III y Pol IV presentaron igual o mejor capacidad inhibitoria frente a los Mucorales evaluados. Excepto en el caso de *A. caerulea* A.C 1, en donde las CMIs de los nano-encapsulados fueron superiores a la CMI observada frente a AMB. Las cepas de referencia *Candida krusei* 6258 y *Candida parapsilosis* 22019 fueron utilizadas como control, las CMIs obtenidas cumplieron los rangos establecidos (datos no mostrados).

Los aislamientos de los hongos tratados en este estudio fueron expuestos a condiciones de anaerobiosis bajo las mismas condiciones de tiempo (24 horas) para su lectura como la prueba anterior. Sin embargo, la prueba de susceptibilidad evaluada en estas condiciones no arrojó datos de crecimiento para ninguno de los aislamientos evaluados en este tiempo.

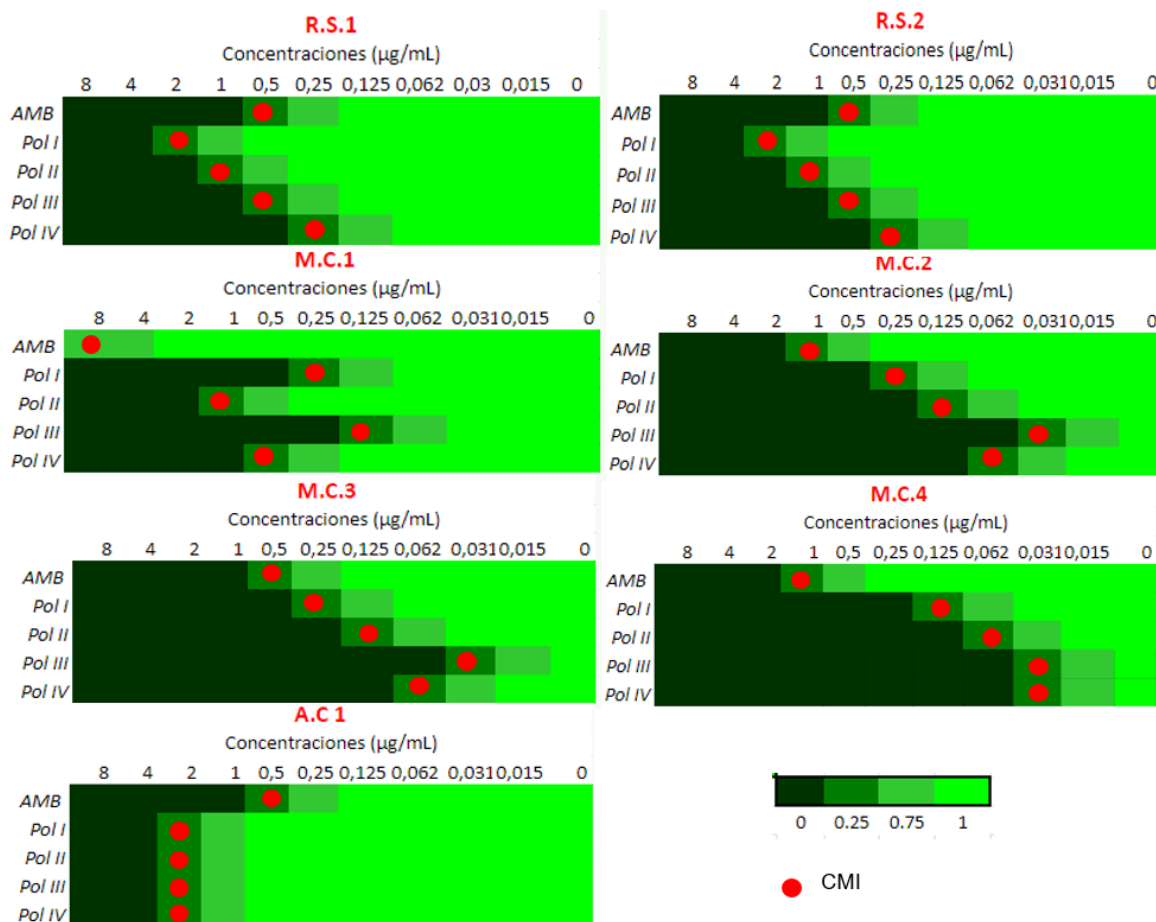


Figura 11. Susceptibilidad antifúngica de los siete aislamientos frente a la formulación convencional de AMB y los nanoencapsulados (Pol I, Pol II, Pol III y Pol IV). Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) indicadas con puntos rojos. La barra de color verde indica crecimiento relativo (1 mayor crecimiento – 0 no crecimiento). Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3 Actividad hemolítica

La determinación del porcentaje de hemólisis se llevó a cabo cuantificando la hemoglobina libre a una densidad óptica de 490 nm para un ensayo de lisis de glóbulos rojos expuestos a un rango de concentraciones de 0.03-16 mg/L para cada uno de los polímeros (Pol I-Pol IV) y AMB convencional.

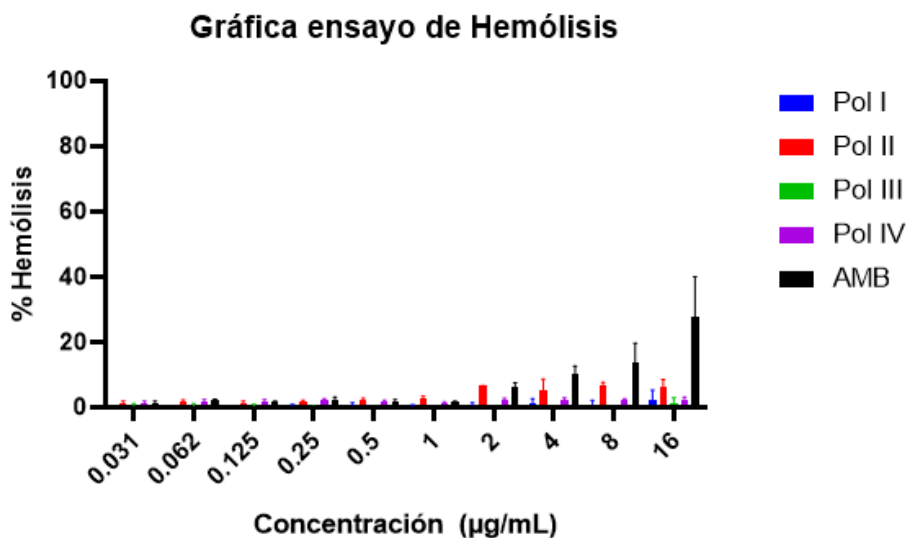


Figura 12. Porcentaje de hemólisis de glóbulos rojos en presencia de formulaciones de AMB (DO490nm) a concentraciones de 0.03 -16 mg/L.

La **Figura 12** evidencia que los polímeros evaluados presentan menor actividad hemolítica respecto a la AMB convencional ($P < 0.05$). Los porcentajes más altos observados fueron de 42% para AMB a la concentración de 16 mg/L, seguido de un 26% de hemólisis con el Pol II en la misma concentración. Para Pol I, Pol III y Pol IV a dicha concentración se obtuvieron porcentajes de hemólisis de 2%, 1.4% y 2.5% respectivamente.

Pol IV, mostró porcentajes de hemólisis inferiores a 0.5 % siendo los más bajos en comparación con todas los nanoencapsulados evaluados. Seguido a estos valores se encuentra Pol III con rangos de hemólisis de 0.5 %-1.4%. Pol I, muestra porcentaje de hemólisis con rangos de 0.9%- 2%, siendo el tercer nanoencapsulado con el menor daño a los glóbulos rojos evaluados.

5.4 Citotoxicidad

Mediante el método MTT se evaluó el efecto citotóxico de las formulaciones de encapsulados para AMB y AMB convencional sobre una primera línea celular de Fibroblastos extraídos de un paciente humano .

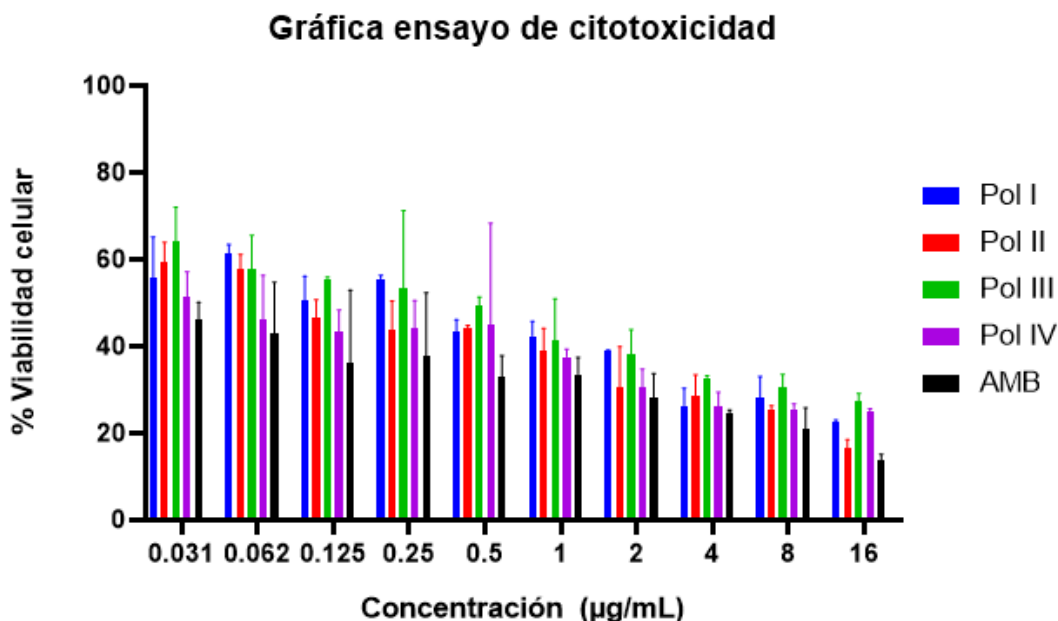


Figura 13. Viabilidad de las células Fibroblastos humanos en presencia de los nanoencapsulados de AMB.

La **Figura 13** muestra los porcentajes de viabilidad celular obtenidos a un rango de concentraciones de 0.03-16 mg/L para los polímeros Pol I, Pol II, Pol III y Pol IV respecto al control con AMB convencional. Para concentraciones bajas (0.03-0.25 mg/L) de las formulaciones evaluadas fue posible observar una viabilidad celular alta. Sin embargo, los valores de AMB presentaron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con estas formulaciones. Pol III, presentó el mayor porcentaje de viabilidad celular en este ensayo para la concentración de 16 mg/L con un porcentaje de 40%:

Con Pol II se observó la segunda mayor actividad citotóxica a una concentración de 16 mg/L cuyo porcentaje de viabilidad fue de 20% al igual que la formulación convencional de AMB. Pol IV presentó una viabilidad celular del 30% para la concentración más alta y entre ellas no presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

5.5 Modelo *In vivo Galleria mellonella*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad y la capacidad de crecimiento a 37°C, se eligió la cepa *Mucor circinelloides* 2 (M.C 2) para

evaluar su patogenicidad en el modelo *In vivo* de *Galleria mellonella*. La **Figura 14** muestra los resultados de mortalidad utilizando diferentes concentraciones del hongo. Como se esperaba, el uso de una mayor concentración conlleva a una disminución de la supervivencia de las larvas tras 10 días de estudio. Mientras que con la concentración de 1×10^7 células/mL se observó 100% de mortalidad de las larvas tras 4 días post inoculación, con las concentraciones de 1×10^6 y 1×10^5 células/mL se observó el 70 y 60% de mortalidad al finalizar el experimento, respectivamente. Con las concentraciones de 1×10^5 y 1×10^6 se observó una mortalidad del 50% de las larvas tras 5 y 8 días post infección, respectivamente.

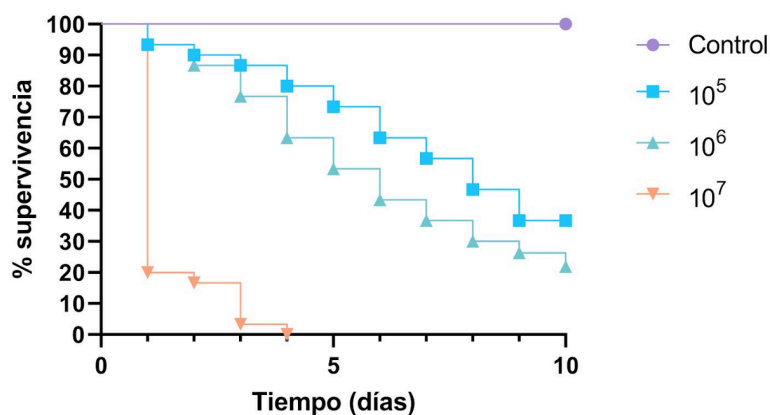


Figura 14. Determinación del mejor inóculo para generar infección en *Galleria mellonella*.

Con el inóculo establecido (i.e., 1×10^6) se procedió a infectar larvas y posteriormente se trataron con el nanoencapsulado Pol III (mejor resultado de CMI *in vitro*) y AMB convencional. La **Figura 15 A** muestra la supervivencia de las larvas comparando los tratamientos con AMB convencional y la formulación Pol III de AMB con una dosis de 1 mg/kg. Utilizando la formulación Pol III (1 mg/kg y 0.5mg/kg) se observó una mortalidad del 100% de las larvas en el día seis y diez post infección/tratamiento, respectivamente. Por el contrario, en el tratamiento con AMB convencional se observó una mortalidad del 50% tras finalizar el experimento .

Al modificar la dosis de la formulación Pol III de AMB a la mitad (0,5 mg/kg) se pudo observar mayor supervivencia de las larvas en comparación al tratamiento inicial (1 mg/kg) (**Figura 15B**). Sin embargo, los resultados obtenidos entre el tratamiento con AMB

convencional y AMB encapsulada muestran que la AMB convencional sigue siendo más efectiva contra la mucormicosis en las larvas ($p < 0,05$).

Con el fin de establecer que la micela vacía por sí sola no ejerce un efecto negativo, la **Figura 15C** muestra la supervivencia de las larvas tratadas con las micelas vacías que encapsulan la AMB y el resultado es igual al obtenido con el control PBS, lo que demuestra que no se están generando efectos adversos sobre *Galleria mellonella*.

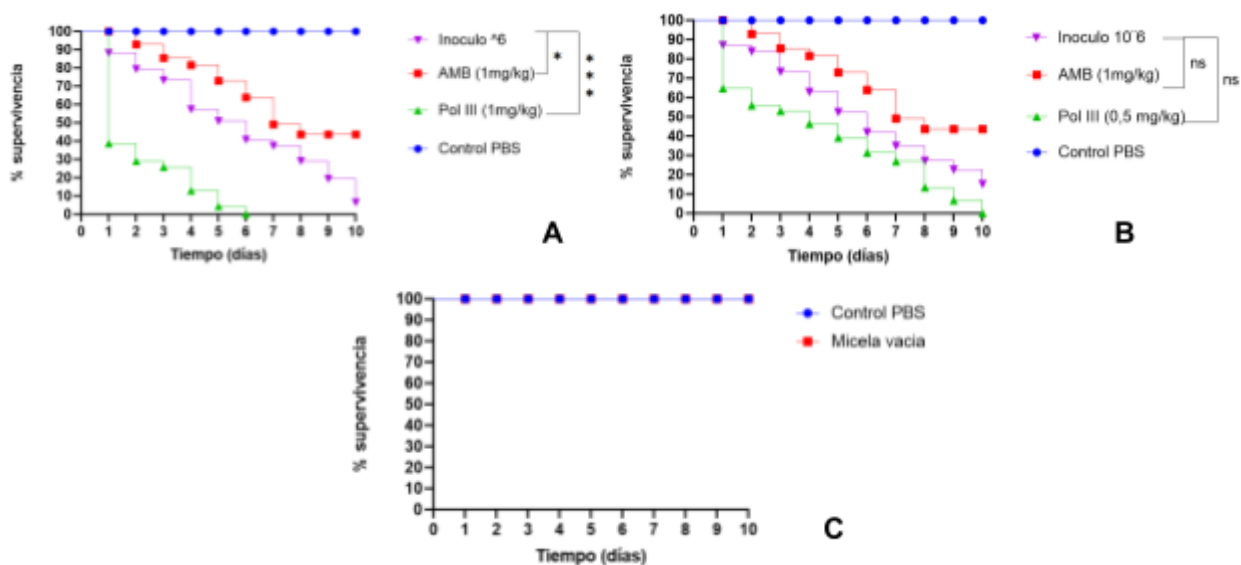


Figura 15. Modelo de mucormicosis en el modelo *In vivo* *Galleria mellonella*. A. Eficiencia del tratamiento con AMB y tratamiento con AMB nanocapsulada Pol III dosis 1mg/kg sobre la infección con *M.circinelloides* en *Galleria mellonella*. B. Eficiencia del tratamiento con AMB y tratamiento con AMB nanocapsulada Pol III dosis 0,5 mg/kg sobre la infección con *M.circinelloides* en *Galleria mellonella*. C. Efecto de las micelas vacías en la supervivencia de las larvas. $P < 0.05^*$.

6. Discusión

La mucormicosis es una infección fúngica invasiva de rápida progresión, que conduce a la necrosis tisular. Esta infección es causada por hongos del orden *Mucorales* (Moorthy et al., 2021). Los mucorales se caracterizan por poseer un micelio generalmente abundante y de rápido crecimiento, así como por estructuras anamórficas que se forman en grandes cantidades. El micelio es típicamente no septado o irregularmente septado (Hoffmann et al., 2013). Esta descripción concuerda con la presentada por Rincon 2008, donde el micelio aéreo de *Rhizopus stolonifer* no presenta septos y presenta esporangiosporas de formas globosas, elipsoidales o angulares con superficie lisa (Rincón, 2008).

En la literatura se ha descrito que *Mucor circinelloides* posee esporangioforos ramificados y alargados, al principio son blancos y gradualmente cambian de color a marrón verdoso, además, de tener esporangios con forma globular y un tamaño aproximado de 40 a 80 μm ; conocido como “cabezas que se mecen” (Fazili et al., 2022). Para especies de *Absidia* spp, su morfología se basa en esporangios piriformes y de crecimiento rápido con hifas que a menudo forman estolones y rizoides. Los esporangióforos suelen ser rectos, simples o ligeramente ramificados e hinchados (Hoffman et al., 2007). En todos los casos, las características micro- macroscópicas de los aislamientos correspondieron con los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS. Estudios han corroborado que esta tecnología es confiable para la identificación de Mucorales y que el éxito de la identificación depende en su mayoría, de la base de datos contra la que se comparan los espectros (Shao et al., 2018). Shao y colaboradores en 2018 validaron la eficacia de MALDI-TOF MS en 11 aislamientos de Mucorales, identificando cerca del 81% a nivel de especie y género, cifra que aumentó a 100% cuando se complementó con la base de datos interna (BMU (Shao et al., 2018)). Los aislamientos evaluados en este trabajo fueron identificados con un score superior a 2.0, valor que corresponde a una identificación a nivel de especie. (Normand et al., 2017).

La mucormicosis además de ser una infección de difícil diagnóstico, presenta complejidad en el tratamiento debido a la resistencia a los diferentes antifúngicos de las diferentes especies de mucorales a los antifúngicos utilizados comúnmente en el tratamiento de EFIs. La AMB es el tratamiento de primera línea que se utiliza a nivel hospitalario y aunque se han establecido puntos de corte clínicos formales (PCC) y/o valores de corte epidemiológicos (ECV) para *Candida* spp. y *Aspergillus* spp, no se dispone de puntos de corte para ninguna especie de Mucorales, debido a la escasez de los datos necesarios para su desarrollo, incluidas las CIMs bajas y altas que podrían predecir estos puntos de corte (Espinel-Ingroff, 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la diversidad de CMI para los *Mucorales* con valores de CMI entre 0,031 mg/L y 2 mg/L. En 2012 Drogari-Apiranthitou y colaboradores analizaron 37 aislamientos clínicos durante el periodo 2005-2009 donde se reportó la CMI para dos aislamientos de *M. circinelloides* y uno para *R. stolonifer*, los valores allí reportados fueron de 0,25-0,5 mg/L y de 0,25 mg/L, respectivamente (Drogari-Apiranthitou, 2012). Otro estudio en el que se comparan los valores de CMI para 124 aislamientos de *Mucorales* entre el método EUCAST Y CLSI mostró que los aislamientos de *R. stolonifer* y *M. circinelloides* presentaron una CMI de 0,125- 0,5 mg/L para AMB por el método EUCAST (Chowdhary et al., 2015).

En condiciones de anaerobiosis no hubo crecimiento en ninguno de los aislamientos evaluados a pesar de esperar que los aislamientos de M.C.1-4 si tuvieran crecimiento en los pozos de control positivo. Homa y colaboradores en 2022 evaluaron la expresión de genes para *Mucor lusitanicus* en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis; en este estudio el hongo fue sometido a un cambio de condiciones de solo 4 horas y aún así fue posible observar que si hay una expresión diferencial de genes de una condición a otra (Homa et al., 2022). Sin embargo, en este estudio el proceso de anaerobiosis estuvo acompañado de una hexosa fermentable, que indujo la transición de micelio a levadura y un cambio de respiración a fermentación en especies de *Mucor* afectando así principalmente las propiedades de la pared celular.

Con base en lo anterior, y sumado a problemas secundarios debido al uso prolongado de fármacos como AMB, se han llevado a cabo estudios que buscan una manera efectiva de entregar el fármaco y disminuir así las consecuencias en la salud del paciente (e.g., nefrotoxicidad). La nanoencapsulación de compuestos antifúngicos convencionales es

ventajosa para controlar la liberación del ingrediente activo mediante la manipulación de la cubierta exterior de las nanocápsulas (León-Buitimea et al., 2021). Los nanoencapsulados de polietilenglicol (PEG) que contienen hexaconazol (N-Hexa) han sido probados en cepas de *A. níger* y de *A. fumigatus*. Después de 48 h, N-Hexa provocó una reducción del crecimiento fúngico de 26 mm a 9 y 4 mm para las especies de *A. níger* y una reducción de 20 a 3 y 1 mm para *A. fumigatus*, confirmando que la incorporación de hexaconazol al PEG aumentó su solubilidad en agua generando un mejor efecto antifúngico que una formulación no encapsulada (León-Buitimea et al., 2021). Otros polímeros como la policaprolactona (PCL) se utilizan para la administración de varios grupos activos. Sin embargo, la liberación de fármacos puede ser incompleta debido a su mayor cristalinidad e hidrofobicidad por lo que el diseño y desarrollo de sistemas de administración de fármacos basados en PCL se mezcla con otros polímeros o sus copolímeros mejorando la liberación controlada de fármacos a varios niveles de pH y ajustar la permeabilidad logrando una entrega deseable (Saqib et al., 2020).

Se ha demostrado también que la longitud de un compuesto nanoencapsulado está relacionada con la actividad antimicrobiana que este posee, entre mayor sea el número de átomos de carbono en la cadena alquílica sustituida, este produce una mayor actividad antibacteriana, debido al aumento en la interacción hidrofóbica con la pared celular (Fernández, 2012). Dicha afirmación podría explicar por qué el polímero Pol III (PDMAEMA-140) presentó los mejores valores (bajas CMIs) para la cepa *M.C 2* en comparación con AMB convencional.

Además, el porcentaje de AMB encapsulado parece tener una importancia relevante ya que el Pol III (5% AMB encapsulada) fue el que mejor actividad antifúngica presentó en varios de los aislamientos evaluados. Arias en el 2020, menciona que existe una relación directamente proporcional entre el porcentaje de encapsulación y la CMI ya que en su estudio evaluó dos copolímeros anfifílicos en bloque B y CAB con un porcentaje de encapsulación de 16,4% y 8,4% respectivamente. El primer polímero condujo a una mayor cantidad de AMB disponible (Arias, 2020).

Estudios previos de nanopartículas han evaluado la capacidad de estos compuestos para generar algún tipo de reacción en el hospedero, ya que es importante mantener determinado el nivel de toxicidad. La membrana del eritrocito está compuesta por proteínas

y lípidos, unidos por interacciones no covalentes, y glicoproteínas que regulan el flujo de iones y el soporte celular que puede tener un gran efecto sobre la sensibilidad celular a los compuestos tóxicos (Greco, 2020).

Como era de esperar, el mayor porcentaje de hemólisis visto durante este estudio correspondió a las concentraciones de AMB convencional, que como menciona Vandermeulen y colaboradores, la AMB convencional causó mayor actividad hemolítica respecto a la formulación de poli(etilenglicol) debido a la manera como se da la agregación de la AMB que parece disminuir su actividad antifúngica y aumentar su toxicidad (Vandermeulen et al., 2006). Dicha agregación ocurre cuando la concentración en plasma de AMB alcanza niveles elevados y persistentes en la sangre llevando así a una menor intervención de las células del sistema fagocítico mononuclear en la eliminación y saturación de velocidad de aclaramiento del fármaco (Azanza, 2021).

La hemólisis se emplea a menudo como un método rápido para la evaluación inicial de la toxicidad celular. Sin embargo, el empleo de estudios adicionales en otros tipos de células permite una evaluación más precisa de la capacidad citotóxica de un compuesto y representa una valiosa adición a la evaluación *In vitro* (Greco et al., 2020). En el ensayo de citotoxicidad en Fibroblastos humanos, fue posible observar que el Pol III a lo largo del ensayo presentó una menor actividad tóxica respecto a la formulación de AMB convencional. Estos resultados se deben a la toxicidad de AMB que se ha asociado con su forma agregada donde la selectividad de AMB entre células de mamíferos puede depender de su estado de agregación y la naturaleza del esteroide de membrana (Abu Ammar et al., 2019).

Haley y colaboradores en 2019, evaluaron la capacidad del vehículo ciclodextrina polimerizada (pCD) cargada con AMB para evaluar la actividad antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* y comparar la toxicidad de los compuestos, obteniendo como resultado que esta molécula de pCD era significativamente menos tóxica que la AMB libre. Dicha disminución de la toxicidad se debe a la liberación del fármaco con el tiempo, probablemente las células están expuestas a menos moléculas activas de AMB logrando una liberación lenta y constante de AMB (Haley et al., 2019).

Finalmente, los resultados obtenidos en el modelo *In vivo* de *Galleria mellonella* permiten tener un acercamiento a la respuesta inmune de un hospedero mamífero, ya que comparte varias similitudes Incluyendo una respuesta celular en la que los hemocitos,

células inmunitarias cercanas a los neutrófilos de los mamíferos, son actores clave responsables de los eventos celulares, y una respuesta humoral con moléculas efectoras solubles (Menard et al., 2021).

Para determinar una dosis infecciosa, se considera que cause una letalidad del 50% dentro de las primeras 48 h, pero no una letalidad del 100% dentro de las 24 h (Ménard et al., 2021) teniendo como resultado que el mejor inóculo para infectar a *G.mellonella* bajo esta primicia fue 1×10^6 , valor considerado por representar la mitad de la supervivencia en la mitad de concentración del inóculo en el tiempo evaluado en este estudio (5 días).

Los datos obtenidos de la supervivencia de los individuos tratados con AMB convencional frente a individuos tratados con Pol III variaron respecto a la dosis administrada. Cuando se suministró una dosis igual para ambos tratamientos la mortalidad de las larvas fue mayor con Pol III respecto a AMB convencional, obteniendo una diferencia estadísticamente muy significativa ($P < 0.001$) entre el tratamiento con Pol III y las larvas sin tratamiento. Mientras que cuando se redujo la dosis de tratamiento Pol III a la mitad, la supervivencia fue similar a la obtenida con AMB convencional. La dosis óptima y los regímenes de dosificación para las formulaciones de AMB siguen siendo inciertos ya que fármaco-dinámicamente se sugiere que la AMB exhibe una destrucción dependiente de la concentración por los sistemas de liberación (Klepser, M. 2011). Estudios relacionados con mucormicosis inducida en *Galleria mellonella* han mostrado que la evaluación de nuevos tratamientos antifúngicos es posible, Bastidas y colaboradores en 2012 mostraron que la rapamicina exhibió una potente actividad inhibidora contra *M. circinelloides* mejorando la supervivencia en un 50 % sugiriendo el potencial para desarrollarse como nuevas terapias antimicóticas para el tratamiento de pacientes con mucormicosis. (Batidas et al., 2012).

7. Conclusiones y perspectivas

7.1 Conclusiones

En conclusión, este estudio permitió observar la eficiencia de formulaciones para AMB que presentaron valores menores de CMI respecto a la formulación convencional. La formulación de AMB Pol III fue la formulación que presentó mayor efectividad contra los aislamientos de *Mucor circinelloides* trabajados, lo cual podría estar relacionado con la longitud de carbonos presentes en la cadena polimérica y el porcentaje de AMB encapsulada. Los efectos de hemólisis y citotoxicidad de las formulaciones respecto a la AMB convencional mostraron que fueron atenuados cuando el fármaco es nanoencapsulado. Además, *Galleria mellonella* es un modelo de aproximación *In vivo* que permitió observar que la formulación de AMB Pol III mejora la supervivencia para las larvas cuando éstas son infectadas con *M. circinelloides* en comparación con las larvas tratadas con AMB a una menor dosis.

7.2 Perspectivas

- Evaluar a nivel molecular la resistencia a AMB en el aislamiento *Mucor circinelloides* (M.C 1).
- Realizar la caracterización *In vivo* de las especies no estudiadas.
- Evaluar medios de cultivo que permitan analizar condiciones de anaerobiosis para determinar la eficacia de los nanoencapsulados.
- Evaluar diferentes dosis del Pol III en *Galleria mellonella*.

Bibliografía

1. Hagan, A. (2018). Invasive Fungal Infections: A Creeping Public Health Threat. American Society for Microbiology.
2. De Pauw B. E. (2011). What are fungal infections?. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 3(1), e2011001. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2011.001>
3. Hoenigl, M., Seidel, D., Sprute, R., Cunha, C., Oliverio, M., Goldman, G., Ibrahim, A., Carvalho, A. (2022) . COVID-19-associated fungal infections. *Nat Microbiol* 7, 1127–1140. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01172-2>
4. Martin Gomez, M.T., Salavert Lletib, M. (2021). Mucormycosis: Current and future management perspective. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38 (2), 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.003>
5. Zamudio, A; Vargas, MC; Camacho, F. (2021). Cutaneous Mucormycosis, life-threatening unsuspected mycosis, case report and review. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. Vol 29(4):282-294
6. Prakash, H., & Chakrabarti, A. (2019). Global Epidemiology of Mucormycosis. *Journal of Fungi*, 5(1), 26. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof5010026>
7. Skiada, A., Pavleas, I., & Drogari-Apiranthitou, M. (2020). Epidemiology and Diagnosis of Mucormycosis: An Update. *Journal of Fungi*, 6(4), 265. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040265>
8. Garg, D., Muthu, V., Sehgal, I. S., Ramachandran, R., Kaur, H., Bhalla, A., Puri, G. D., Chakrabarti, A., & Agarwal, R. (2021). Coronavirus Disease (Covid-19) Associated Mucormycosis (CAM): Case Report and Systematic Review of Literature. *Mycopathologia*, 186(2), 289–298. <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00528-2>
9. Macedo, D., Leonardelli, F., Dudiuk, C., Vitale, R. G., Del Valle, E., Giusiano, G., Gamarra, S., et al. (2019). In Vitro and In Vivo Evaluation of Voriconazole-Containing Antifungal Combinations against Mucorales Using a *Galleria mellonella* Model of Mucormycosis. *Journal of Fungi*, 5(1), 5. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof5010005>

10. Sipsas, N. V., Gamaletsou, M. N., Anastasopoulou, A., & Kontoyiannis, D. P. (2018). Therapy of Mucormycosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 4(3), 90. <https://doi.org/10.3390/jof4030090>
11. Cavassin, F.B., Baú-Carneiro, J.L., Vilas-Boas, R.R. Queiroz-Telles, F. (2021). Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect Dis Ther* 10, 115–147 <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00382-7>
12. Palmis, B., Alanio, A., Lortholary, O., & Lanternier, F. (2018). Recent advances in the understanding and management of mucormycosis. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1429. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15081.1>
13. Villamil-Poveda, J.C. (2019). Evaluación de la eficacia de formulaciones de Anfotericina B encapsulada en micelas poliméricas como opción terapéutica en un modelo de Candidiasis en larvas de *Galleria mellonella*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/75903/1019014737.2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Richardson, M.D.; Rautemaa-Richardson, R. (2020). Biotic Environments Supporting the Persistence of Clinically Relevant Mucormycetes. *J. Fungi*, 6 (1), 4. <https://doi.org/10.3390/jof6010004>
15. Walther, Wagner, & Kurzai. (2019). Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. *Journal of Fungi*, 5(4), 106. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof5040106>
16. Borman, A. M., Fraser, M., Patterson, Z., Palmer, M. D., & Johnson, E. M. (2021). In Vitro Antifungal Drug Resistance Profiles of Clinically Relevant Members of the Mucorales (Mucoromycota) Especially with the Newer Triazoles. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(4), 271. <https://doi.org/10.3390/jof7040271>
17. Garre,V. (2022). Recent Advances and Future Directions in the Understanding of Mucormycosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vo.12 10.3389/fcimb.2022.850581, 2235-2988
18. Castrejón-Pérez, A. D., Welsh, E. C., Miranda, I., Ocampo-Candiani, J., & Welsh, O. (2017). Cutaneous mucormycosis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(3), 304–311. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20176614>
19. CDC (2020). Mucormycosis Statistics. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/mucormycosis/statistics.html>

20. Serris, A., Danion, F., & Lanternier, F. (2019). Disease Entities in Mucormycosis. *Journal of Fungi*, 5(1), 23. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof5010023>
21. Morales-López, S., Ceballos-Garzón, A. & Parra-Giraldo, C.M. Zygomycete Fungi Infection in Colombia: Literature Review. *Curr Fungal Infect Rep* 12, 149–154 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0326-9>
22. Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
23. Badali, H. Cañete-Gibas, C. McCarthy, D. Patterson, H, Sanders, C. David, M. Mele, J. Fan, H. Wiederhold, N. (2021). Epidemiology and Antifungal Susceptibilities of Mucoralean Fungi in Clinical Samples from the United States. *Journal of clinical Microbiology* . Vol 59 (9). <https://doi.org/10.1128/JCM.01230-21>
24. Nucci, M. Engelhardt, M. Hamed, K. (2019). Mucormycosis in South America: A review of 143 reported cases. *Mycoses* vol. 62(9) . <https://doi.org/10.1111/myc.12958>
25. García-Carnero, L. C., & Mora-Montes, H. M. (2022). Mucormycosis and COVID-19-Associated Mucormycosis: Insights of a Deadly but Neglected Mycosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(5), 445. <https://doi.org/10.3390/jof8050445>
26. Brinder, U. Maurer, E. Lass-Flor. C. (2014). Mucormycosis—from the pathogens to the disease. *Clin Microbiol Infect*; 20(6): 60–66. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12566>
27. Katragkou, A. Walsh, J. Roilides, E. (2014). Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses?. *European Society of Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12466>
28. Petrikos, G. Tsioutis, C. (2018). Recent Advances in the Pathogenesis of Mucormycosis. *Clinical Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.03.009>.

29. Ibrahim, A.S. Spellberg, B. Walsh, T. Kontoyiannis, D. (2012). Pathogenesis of Mucormycosis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 54, Issue suppl_1, Pages S16–S22, <https://doi.org/10.1093/cid/cir865>
30. García-Vidal, C. Salavert, M. (2014). Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología*. Vol. 31. Núm. 4. páginas 219-228 [10.1016/j.riam.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.09.001)
31. Álvarez, F. Fernández-Ruiz, M. Aguado, J. M. (2013). Hierro e infección fúngica invasiva. *Revista Iberoamericana de Microbiología*. 30 (4): 217-225. DOI: [10.1016/j.riam.2013.04.002](https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.04.002)
32. Tahiri, G., Lax, C., Cánovas-Márquez, J. T., Carrillo-Marín, P., Sanchis, M., Navarro, E., Garre, V., et al. (2023). Mucorales and Mucormycosis: Recent Insights and Future Prospects. *Journal of Fungi*, 9(3), 335. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof9030335>
33. Lugito, N. P. H., & Cucunawangsih, C. (2021). How Does Mucorales Benefit from the Dysregulated Iron Homeostasis During SARS-CoV-2 Infection?. *Mycopathologia*, 186(6), 877–882. <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00594-6>
34. Singh, A. Ahmad, N. Varadarajan, Naval Vikram, A. Singh, T.P. Sharma, S. Sharma, P. (2021). Lactoferrin, a potential iron-chelator as an adjunct treatment for mucormycosis – A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 187, Pages 988-998, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.156>.
35. Challa, S. (2019). Mucormycosis: Pathogenesis and Pathology. *Curr Fungal Infect Rep* 13, 11–20. <https://doi.org/10.1007/s12281-019-0337-1>
36. Lui, M. Spellberg, B. Phan, Q. Fu, Y. Fu, Y. Lee, A.S. Edwards Jr, J.E. Filler, S.G. Ibrahim, A.S. (2010). The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *Clin Invest*. 2010;120(6):1914–1924. <https://doi.org/10.1172/JCI42164>.
37. Ibrahim (2017).
38. Abdelwahab, M.I, Voigt, K. (2019). Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors, *Medical*

- Mycology, Volume 57, Issue Supplement_2, Pages S245–S256, <https://doi.org/10.1093/mmy/myz011>
39. Lax, C., Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M., Cánovas-Márquez, J., Tahiri, G., Pérez-Ruiz, J., Osorio-Concepción, M., et al. (2020). Genes, Pathways, and Mechanisms Involved in the Virulence of Mucorales. *Genes*, 11(3), 317. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/genes11030317>
 40. Biswas, D., Kotwal, A., Kakati, B., & Ahmad, S. (2015). Amphotericin B Resistant *Apophysomyces elegans* Causing Rhino-oculo-Cerebral Mucormycosis in an Immunocompetent Host. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 9(8), DD01–DD2. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13929.6272>
 41. Kumar, A. Gupta, V.(2022). Rhino-orbital Cerebral Mucormycosis.In: StatPearls [Internet] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557429/>
 42. Petrikkos, G.Skiada ,A. Lortholary ,O. Roilides , E. Walsh , T. Kontoyiannis, D. (2012). Epidemiology and Clinical Manifestations of Mucormycosis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 54, Issue suppl_1, Pages S23–S34, <https://doi.org/10.1093/cid/cir866>
 43. Cornely, O. A., Alastruey-Izquierdo, A., Arenz, D., Chen, S., Dannaoui, E., Hochhegger, B., Hoenigl, M., Jensen, H. E., Lagrou, K., Lewis, R. E., Mellinshoff, S. C., Mer, M., Pana, Z. D., Seidel, D., Sheppard, D. C., Wahba, R., Akova, M., Alanio, A., Al-Hatmi, A., Arikan-Akdagli, S., ... Mucormycosis ECMM MSG Global Guideline Writing Group (2019). Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *The Lancet. Infectious diseases*, 19(12), e405–e421. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30312-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30312-3)
 44. Mohanty, A. Gupta, P. Varshney, S. Kabi, A. Angral, S. (2021). Breaking the mold: a brief review on the diagnostic and treatment approaches of mucormycosis. *Int J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*.7(7)<https://dx.doi.org/10.18203/issn.2454-5929.ijohns20212336>
 45. Skiada, A. Lass-Floerl, C. Klimko,N. Ibrahim, A. Roilides, E. Petrikkos,G. (2018). Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis, *Medical Mycology*, Volume 56, Issue suppl_1, Pages S93–S101, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx101>

46. Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G. S., Benny, G. L., Kirk, P. M., & Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, 30, 57–76. <https://doi.org/10.3767/003158513X666259>
47. Cruz-Lachica, I. Marquez, I. García-Estrada, R.S. Carrillo-Fasio, J.A. León-Félix, J. Allende-Molar, R. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. *Rev. mex. fitopatol* vol.35 no.3 Texcoco sep. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-3>
48. Mendoza L, Vilela R, Voelz K, Ibrahim AS, Voigt K, Lee SC. Human Fungal Pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Nov 6;5(4):a019562. doi: 10.1101/cshperspect.a019562. PMID: 25377138; PMCID: PMC4382724.
49. Lackner, N., Posch, W., & Lass-Flörl, C. (2021). Microbiological and Molecular Diagnosis of Mucormycosis: From Old to New. *Microorganisms*, 9(7), 1518. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9071518>
50. Dadwal, S. Kontoyiannis, D. (2018). Recent advances in the molecular diagnosis of mucormycosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics* (18)10 <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1522250>
51. Brunet, K. Rammaert, B. (2020). Mucormycosis treatment: Recommendations, latest advances, and perspectives, *Journal de Mycologie Médicale* (30) 3, <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101007>.
52. Croxatto, A. Prodhom, G. Greud, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 36, Issue 2, Pages 380–407, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
53. Robert, M.-G., Cornet, M., Hennebique, A., Rasamoelina, T., Caspar, Y., Pondérand, L., Bidart, M., et al. (2021). MALDI-TOF MS in a Medical Mycology Laboratory: On Stage and Backstage. *Microorganisms*, 9(6), 1283. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9061283>
54. Wagner, L., de Hoog, S., Alastruey-Izquierdo, A., Voigt, K., Kurzai, O., & Walther, G. (2019). A Revised Species Concept for Opportunistic Mucor Species Reveals Species-Specific Antifungal Susceptibility Profiles.
55. Danion, F., Coste, A., Le Hyaric, C., Melenotte, C., Lamothe, F., Calandra, T.,

- Garcia-Hermoso, D., et al. (2023). What Is New in Pulmonary Mucormycosis? *Journal of Fungi*, 9(3), 307. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof9030307>
56. Muthu, V., Rudramurthy, S.M., Chakrabarti, A. Agarwal, R. (2021). Epidemiology and Pathophysiology of COVID-19-Associated Mucormycosis: India Versus the Rest of the World. *Mycopathologia* 186, 739–754. <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00584-8>
57. Mahalaxmi, I. Jayaramayya, K. Venkatesan, D. Subramaniam, M.D. Renu, K. Vijayakumar, P. Narayanasamy, A. Gopalakrishnan, A. Kumar, N. Sivaprakash, P. Sambasiva Rao, K. Vellingiri, B. (2021). Mucormycosis: An opportunistic pathogen during COVID-19. *Environmental Research*, Volume 201, 111643, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111643>.
58. Chandley, P., Subba, P., & Rohatgi, S. (2022). COVID-19-Associated Mucormycosis: A Matter of Concern Amid the SARS-CoV-2 Pandemic. *Vaccines*, 10(8), 1266. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines10081266>
59. Soare, A. Watkins, T. Bruno, V. (2020). Understanding Mucormycosis in the Age of “Omics”. *Front. Genet., Sec. Evolutionary and Genomic Microbiology*. Volume 11 - 2020 | <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00699>
60. Carolus, H. Person, S. Lagrou, K. Van dick, P. (2020). Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *J.Fungi* (6)4 <https://doi.org/10.3390/jof6040321>
61. Liu, M. Chen, M. Yang, Z. (2017). Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy, *Drug Delivery*, 24:1, 1-9, DOI: 10.1080/10717544.2016.1225852
62. Azanza, J. (2021). Anfotericina B liposomal: farmacología clínica, farmacocinética y farmacodinámica. *Forum Micológico*, doi: 10.1016/j.riam.2021.02.004
63. Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology*, 3, 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00286>
64. Sangalli-Leite, F. Scorzoni, L. Mesa-Arango, A.C. Casas, C. Herrero, E. Soares Mendes Gianinni, M.J. Rodríguez-Tudela, J. Cuenca-Estrella, M. Zaragoza, O.

- (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst, *Microbes and Infection*, Volume 13, Issue 5, Pages 457-467, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.01.015>.
65. Hamill, R.J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* 73, 919–934 (2013). <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>
66. Noor A, Preuss CV. (2023). Amphotericin B. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482327/>
67. Tonin, F. Steimbach, L. Borba, H. Sanches, A. Wiens, A. Pontarolo, R. Fernandez-Llimos, F. (2017). Efficacy and safety of amphotericin B formulations: a network meta-analysis and a multicriteria decision analysis, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 69, Issue 12, Pages 1672–1683, <https://doi.org/10.1111/jphp.12802>
68. Wang, X. Shair, I. Fan, L. Zhao, Z. Nurunnabi, M. Sallam, M. Wu, J. Chen, Z. Yin, L. He, W. (2021). Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections. *Pharmaceutica Sinica B*. Vol 11 (8) 2585-2604. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.04.010>
69. Cifani C, Costantino S, Massi M, Berrino L. (2012). Commercially available lipid formulations of amphotericin b: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? *Acta Biomed* ;83(2):154–63.c
70. Caramalho, R., Tyndall, J.D.A., Monk, B.C. et al. Intrinsic short-tailed azole resistance in mucormycetes is due to an evolutionary conserved amino acid substitution of the lanosterol 14 α -demethylase. *Sci Rep* 7, 15898 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16123-9>
71. Gollapudy, R. Ajmani, S. Kulkarni, S.A. (2004). Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14- α demethylase 'A' with azole antifungals, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 12, Issue 11, Pages 2937-2950, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.034>.
72. Ganesan, P., Ganapathy, D., Sekaran, S., Murthykumar, K., Sundramoorthy, A. K., Pitchiah, S., & Shanmugam, R. (2022). Molecular Mechanisms of Antifungal Resistance in Mucormycosis. *BioMed research international*, 2022, 6722245. <https://doi.org/10.1155/2022/6722245>

73. Chang Z, Billmyre RB, Lee SC, Heitman J (2019) Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet* 15(2): e1007957. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007957>
74. Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*, 10(7), 1403. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/nano10071403>
75. Sur, S. Rathore, A. Dave, V. Raghava, K. Singh, R. Sadhu, V. (2019). Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery systems. *Nano-Structures & Nano-Objects*. Vol (20). <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>
76. Zhang, K. Yang, P.P. Zhang, J.P. Wang, L. Wang,H. (2017) Recent advances of transformable nanoparticles for theranostics. *Chinese Chemical Letters*. Vol 28 (9), 1808-1816. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.07.001>.
77. Arias-Patron, E. (2020). Caracterización de copolímeros en bloque conjugados como vehículos nanoestructurados para Anfotericina B. Universidad Nacional de Colombia.
78. Singh, S. Kumar, V. Prakash, R. Agarwal, V. (2011). Nanoparticle based drug delivery system: Advantages and applications. *Indian Journal of Science and Technology* Vol. 4 (3). <https://sciresol.s3.us-east-2.amazonaws.com/IJST/Articles/2011/Issue-3/Article6.pdf>
79. Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(16), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
80. Díaz-Ariza,I.L. (2014). Evaluación de sistemas micelares catiónicos encapsulados con anfotericina B como alternativa para el tratamiento de biopelículas asociadas a enfermedades orales con presencia de *Candida spp*. Pontificia Universidad Javeriana.

81. Pereira, M.F. Rossi, C. da Silva, G. Nogueira-Rosa, J. Soares -Bazzolli, D. (2020) *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application, *Pathogens and Disease*, Volume 78, Issue 8, ftaa056, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa056>
82. Kavanagh, K., & Sheehan, G. (2018). The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 4(3), 113. <https://doi.org/10.3390/jof4030113>
83. Maurer, E., Browne, N., Surlis, C., Jukic, E., Moser, P., Kavanagh, K., Lass-Flörl, C., & Binder, U. (2015). *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. *Virulence*, 6(6), 591–598. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1045183>
84. EUCAST, 2015.
85. Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., Nelson, H. M., Giorgio, T. D., & Duvall, C. L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (73), e50166. <https://doi.org/10.3791/50166>
86. Usman F, Khalil R, Ul-Haq Z, Nakpheng T, Srichana T. Bioactivity, Safety, and Efficacy of Amphotericin B Nanomicellar Aerosols Using Sodium Deoxycholate Sulfate as the Lipid Carrier. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(5):2077–86.
87. Amorim-Vaz, S., Delarze, E., Ischer, F., Sanglard, D., and Coste, A. T. (2015). Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Front. Microbiol.* 6:367. doi: 10.3389/fmicb.2015.00367
88. Rincón, J. (2008), Efecto del quitosano sobre la membrana celular de *Rhizopus stolonifer*. Instituto Politécnico Nacional.
89. Fazili, A. B. A., Shah, A. M., Zan, X., Naz, T., Nosheen, S., Nazir, Y., Ullah, S., Zhang, H., & Song, Y. (2022). *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microbial cell factories*, 21(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01758-9>
90. Hoffmann, K. Discher, S. Voigt, K. (2007). Revision of the genus *Absidia* (*Mucorales*, *Zygomycetes*) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group,

- Mycocladiaceae fam. nov. *Mycological Research*, Volume 111, Issue 10, Pages 1169-1183. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.07.002>.
91. Espinel-Ingroff, A., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Cordoba, S., Dannaoui, E., Dufresne, P., Fothergill, A., Ghannoum, M., Gonzalez, G. M., Guarro, J., Kidd, S., Lass-Flörl, C., Meis, J. F., Pelaez, T., Tortorano, A. M., & Turnidge, J. (2015). Multicenter evaluation of MIC distributions for epidemiologic cutoff value definition to detect amphotericin B, posaconazole, and itraconazole resistance among the most clinically relevant species of Mucorales. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(3), 1745–1750. <https://doi.org/10.1128/AAC.04435-14>
 92. Drogari-Apiranthitou, M. Despina, F. Skiada, A. Kanioura, L. Grammatikou, M. Vrioni, G. Mitroussia, A. Tsakris, A. Petrikkos, G. (2012). In vitro antifungal susceptibility of filamentous fungi causing rare infections: synergy testing of amphotericin B, posaconazole and anidulafungin in pairs, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 67, Issue 8, Pages 1937–1940, <https://doi.org/10.1093/jac/dks137>
 93. Shao, J., Wan, Z., Li, R., & Yu, J. (2018). Species Identification and Delineation of Pathogenic Mucorales by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 56(4), e01886-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01886-17>
 94. Normand, A. C., Cassagne, C., Gautier, M., Becker, P., Ranque, S., Hendrickx, M., & Piarroux, R. (2017). Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC microbiology*, 17(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0937-2>
 95. Homa, M., Ibragimova, S., Szebenyi, C., Nagy, G., Zsindely, N., Bodai, L., Vágvölgyi, C., et al. (2022). Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of Fungi*, 8(4), 404. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof804040>
 96. León-Buitimea, A., Garza-Cervantes, J. A., Gallegos-Alvarado, D. Y., Osorio-Concepción, M., & Morones-Ramírez, J. R. (2021). Nanomaterial-Based Antifungal Therapies to Combat Fungal Diseases Aspergillosis,

Coccidioidomycosis, Mucormycosis, and Candidiasis. *Pathogens*, 10(10), 1303. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10101303>

97. Saqib, M., Ali Bhatti, A. S., Ahmad, N. M., Ahmed, N., Shahnaz, G., Lebaz, N., & Elaissari, A. (2020). Amphotericin B Loaded Polymeric Nanoparticles for Treatment of *Leishmania* Infections. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1152. <https://doi.org/10.3390/nano10061152>
98. Chowdhary, A., Singh, P. K., Kathuria, S., Hagen, F., & Meis, J. F. (2015). Comparison of the EUCAST and CLSI Broth Microdilution Methods for Testing Isavuconazole, Posaconazole, and Amphotericin B against Molecularly Identified Mucorales Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(12), 7882–7887. <https://doi.org/10.1128/AAC.02107-15>
99. Fernandez-Garcia, M. (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, Volume 37, Issue 2, February 2012, Pages 281-339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>
100. Haktaniyan, M., Bradley, M. (2022). Polymers showing intrinsic antimicrobial activity. *Chem. Soc. Rev.*, 2022, 51, 8584-8611. Doi: 10.1039/D2CS00558A
101. Azanza J.R (2021). Liposomal amphotericin B: Clinical pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Forum micológico*, doi: 10.1016/j.riam.2021.02.004
102. Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E. Jenssen, H., Hummel, B., Watts, J., Hakansson, J., Hansen, P. Svenson, J.(2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep* 10, 13206 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>
103. Brunet, K., Diop, C. A. B., Chauzy, A., Prébonnaud, N., Marchand, S., Rammaert, B., & Tewes, F. (2022). Improved In Vitro Anti-Mucorales Activity and Cytotoxicity of Amphotericin B with a Pegylated Surfactant. *Journal of Fungi*, 8(2), 121. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof8020121>
104. Vandermeulen, G., Rouxhet, L., Arien, A., Brewster, M.E., Pr eat, V. (2006). Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol) -block-poly

- (ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. Volume 309, Pages 234-240, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.031>.
105. Klepser, M. (2011): The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections, *Journal of Critical Care*, Volume 26, Issue 2, Pages 225.e1-225.e10, <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.08.005>.)
106. Abu Ammar, A., Nasereddin, A., Ereqat, S. Dan-Goor, M. Jaffe, C. Zussman, E. Abdeen, Z. (2019). Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 9, 76–84. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-00603-0>
107. Haley, R. M., Zuckerman, S. T., Gormley, C. A., Korley, J. N., & von Recum, H. A. (2019). Local delivery polymer provides sustained antifungal activity of amphotericin B with reduced cytotoxicity. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 244(6), 526–533. <https://doi.org/10.1177/1535370219837905>
108. Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V., & Donnio, P. Y. (2021). *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 782733. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.782733>
109. Bastidas, R. Shertz, C. Chan Lee, S. Heitman, J. Cardenas, M. (2012). Rapamycin Exerts Antifungal Activity *In Vitro* and *In Vivo* against *Mucor circinelloides* via FKBP12-Dependent Inhibition of Tor. *ASM Journals Eukaryotic Cell*. Vol. 11, No. 3. doi: <https://doi.org/10.1128/ec.05284-11>