



Nanotransportadores funcionales para administrar itraconazol contra hongos Infecciones intracelulares

Susana P. Mejía^{1,2}, Arturo Sánchez¹, Viviana Vasquez¹ y Jahir Orozco^{1*}

¹Grupo Tándem Max Planck en Nanobioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, ²Grupo de Micología Experimental y Médica, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

Las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos intracelulares representan un importante desafío en la atención médica debido a las interacciones entre fármacos durante las coinfecciones y al desarrollo de resistencia en los microorganismos, lo que limita las terapias existentes. Este trabajo informa sobre itraconazol (ITZ) encapsulado en nanopartículas poliméricas funcionales para su liberación dirigida y controlada en macrófagos para combatir infecciones intracelulares. Las NP se basan en polímeros de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) de diferentes composiciones, pesos moleculares y proporciones de ácido láctico a ácido glicólico. Se autoensamblaron utilizando el método de nanoemulsión de alta energía y se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y calorimetría diferencial de barrido. Se estudió cómo la relación polímero-fármaco, los cambios en el pH de la fase acuosa y el tipo y la concentración de surfactante afectaron la formación de nanoportadores, la capacidad de carga de fármacos y la eficiencia de encapsulación. Los resultados mostraron que la capacidad de carga del fármaco y la eficiencia de encapsulación alcanzaron el 6,7 y el 80 %, respectivamente, al bajar el pH a 5,0 y usar una mezcla de tensioactivos. La formulación optimizada mostró una liberación ITZ inmediata inicial, seguida de una fase de liberación prolongada que se ajustaba mejor a un modelo cinético de difusión de Fickian y una alta estabilidad a 4 y 37°C. Las NP funcionalizadas mediante el uso de los métodos de adsorción y carbodiimida tuvieron diferentes eficiencias, siendo el enfoque de carbodiimida más eficiente, estable y reproducible. Además, se demostró que la unión de F4/80 y manosa a las NP aumenta la absorción de los macrófagos J774A.1. General, in vitro ensayos mostraron la eficacia del nanosistema para eliminar la *Histoplasma capsulatum* hongos y allanan el camino para diseñar nanoportadores altamente eficientes para la administración de fármacos contra infecciones intracelulares.

Palabras clave: infección intracelular, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), itraconazol, nanoportadores, macrófagos, biorreceptor

INTRODUCCIÓN

La efectividad limitada de las terapias convencionales para combatir los agentes infecciosos intracelulares se relaciona comúnmente con los mecanismos de evasión fagocítica, los tratamientos de baja especificidad, la manipulación de la maquinaria intracelular por parte del patógeno y la aparición de coinfecciones y resistencia a los medicamentos. Abushaheen et al., 2020). En este contexto, la nanoencapsulación de principios terapéuticos en NPs se ha presentado como una poderosa alternativa para mejorar la eficacia terapéutica y brindar mayor especificidad, reduciendo dosis y efectos adversos (Begines et al., 2020; Eleraky et al., 2020; Sánchez et al., 2020). Lo mas

OPEN ACCESS

Editado por:

jiang pi,

Universidad meidcal de Guangdong, China

Revisado por:

Bin Zhou,

Universidad Médica de Zunyi, China

Mariappan Rajan,

Universidad de Madurai Kamaraj, India

* Correspondencia:

Jahir Orozco

grupotandem.nanobioe@

udea.edu.co

Sección de especialidades:

Este artículo fue enviado a

Inflammation Pharmacology,

una sección de la revista

Frontiers in Pharmacology

Recibió: 25 marzo 2021

Aceptado: 04 junio 2021

Publicado: 28 junio 2021

Citación:

Mejía SP, Sánchez A, Vásquez V and

Orozco J (2021) Nanoportadores

funcionales para administrar

itraconazol contra hongos

Infecciones intracelulares.

Front. Pharmacol. 12:685391. doi:

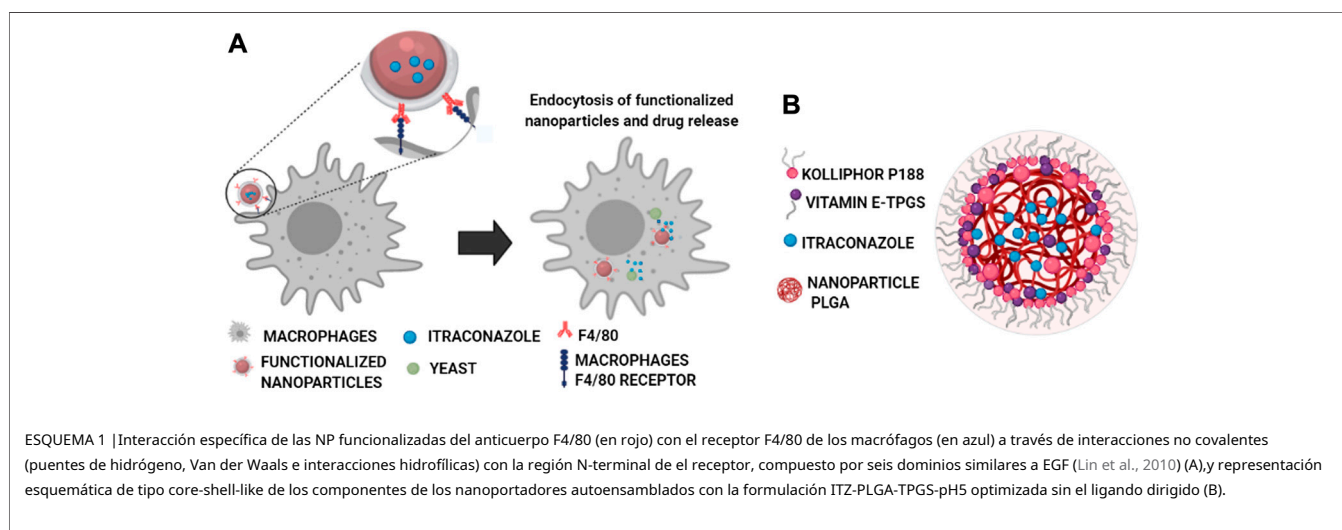
10.3389/ffar.2021.685391

Los sistemas de nanoencapsulación comúnmente explorados se basan en nanoemulsiones, NP lipídicas, nanoportadores poliméricos naturales y sintéticos, nanocápsulas, nanogeles, liposomas, niosomas, etc. (Endsley y Ho, 2012; Li et al., 2017; Bentz y Savin, 2018; Jorge et al., 2019; Colorado et al., 2020; Sánchez et al., 2020). Entre ellos, los nanosistemas poliméricos basados en PLGA disfrutan de alta biocompatibilidad y biodegradabilidad y alta reproducibilidad y escalabilidad. Las NP cumplen las funciones de reserva y protección del principio activo. Pueden diseñarse para cruzar barreras biológicas y funcionalizarse con ligandos dirigidos (Mena-Giraldo et al., 2020; Sánchez et al., 2020) en la superficie más externa de la NP para mejorar la captación celular, liberando la carga terapéutica de una manera específica del sitio. Se ha demostrado que los nanoportadores funcionales tienen potencial para el tratamiento de infecciones intracelulares causadas por virus, ciertas bacterias (p. ej., *Tuberculosis micobacteriana*), algunos protozoos (p. ej., *Toxoplasma gondii* y *Leishmaniaspp.*), y algunos hongos (p. ej., *Histoplasma capsulatum*) (Eleraky et al., 2020; Sánchez et al., 2020).

El tamaño, la forma, las propiedades fisicoquímicas y la química de la superficie de las NP se ajustan a pedido para un propósito específico (Duan y Li, 2013; Sánchez et al., 2020). Uno de los desafíos más importantes en el desarrollo de nanotransportadores funcionales es su interacción con proteínas fisiológicas, que pueden formar una corona biomolecular (o corona de proteínas), cambiando sus propiedades superficiales, afectando su tiempo de circulación en el cuerpo y disminuyendo su especificidad y eficacia. La corona de proteínas afecta la orientación de las NP recubiertas de anticuerpos y puede depender del método de funcionalización debido a su enmascaramiento parcial o total de NP (Mahmoudi et al., 2016; Tonigold et al., 2018). Los anticuerpos pueden unirse a las NP de forma reversible a través de interacciones iónicas, electrostáticas, hidrofóbicas o de Van der Waals (Tonigold et al., 2018) o irreversiblemente a través de enlaces covalentes. Las interacciones dependen no solo de la afinidad, la composición y los grupos funcionales pendientes de las NP, sino también del punto isoelectrico del anticuerpo, la química de la superficie y las condiciones de pH. Aunque físico

la adsorción puede mostrar baja reproducibilidad y baja estabilidad en diferentes condiciones de pH, se han reportado buenos resultados con respecto a la orientación de los anticuerpos (Oliveira et al., 2019). El acoplamiento covalente depende de la superficie de las NP y de los grupos reactivos del ligando. La unión de ligandos a NP mediante enlaces covalentes, como la química de la carbodiimida, ofrece una alta estabilidad a pesar de la posible agregación, polimerización y orientación aleatoria de los anticuerpos, lo que afecta la accesibilidad de los sitios de unión al antígeno (Oliveira et al., 2019).

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar una nueva estrategia terapéutica basada en la nanoencapsulación de un agente terapéutico en NPs con alta especificidad hacia macrófagos para combatir infecciones intracelulares (Esquema 1A), con el antifúngico itraconazol (ITZ) como modelo de fármaco hidrofóbico (Esquema 1B). Este medicamento se prescribe comúnmente a pacientes con infecciones fúngicas graves como la histoplasmosis, una infección producida por el agente etiológico *H. capsulatum*. Este hongo, junto con *neumocistis*, se asocia actualmente al desarrollo de coinfecciones en pacientes VIH positivos, cuya presencia en algunas regiones geográficas es incluso superior a la de bacterias como *Tuberculosis M.* (Agudelo et al., 2012; Cáceres et al., 2018; Carreto-Binaghi et al., 2019). Al encapsular ITZ en NP, esperamos reducir las limitaciones relacionadas con su alta lipofilicidad y baja capacidad de absorción (Ling et al., 2016; Alhowyan et al., 2019; Biswaro et al., 2019). Las nanoformulaciones ITZ incluyen nanocristales (Wan et al., 2018), NP (Alhowyan et al., 2019; Jana et al., 2019), y nanopartículas lipídicas sólidas (Kim et al., 2010), entre otros (Hong et al., 2006; Chen et al., 2008; Sharma et al., 2016; Karashima et al., 2017). Sin embargo, pocos estudios han abordado la dirección de NP funcionalizados hacia los macrófagos. El estudio actual desarrolla una formulación biocompatible de ITZ encapsulada en PLGA NP con propiedades coloidales óptimas en cuanto a tamaño, polidispersidad moderada y carga superficial y DLC y EE óptimos para una liberación de ITZ adecuada (Esquema 1B). Las NP se funcionalizaron aún más con el anticuerpo F4/80 y manosa mediante adsorción física y química.



acoplamiento para la entrega de carga dirigida en los macrófagos (Esquema 1A), lo que demuestra la eficacia en la eliminación de la H. capsulatum hongo. Hasta donde sabemos, este es el primer informe que muestra que las NP funcionalizadas con F4/80 pueden ayudar a mejorar la terapia dirigida a los macrófagos y con una eficacia similar a la de las NP acopladas a manosa. Por lo tanto, los nanoportadores funcionales podrían ser una plataforma para la encapsulación de fármacos como una alternativa terapéutica prometedora para combatir enfermedades infecciosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

químicos

poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA); LA:GA 75:25 (RG 752H) con una viscosidad inherente de 0,14–0,22 dl/g (4–15 kDa) y PLGA; LA:GA 50:50 (RG 503H) con una viscosidad inherente de 0,32–0,44 dl/g (24–38 kDa) fueron generosamente donados por Evonik (Essen, Alemania). Sigma-Aldrich proporcionó rojo Nilo (CAS 7385-67-3), itraconazol (ITZ, CAS 84625-61-6), poloxámero 188 (CAS 9003-11-6, Kolliphor®), D- α -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato (vitamina E-TPGS, CAS 9002-96-4), voriconazol (CAS 137234-62-9) y solución salina tamponada con fosfato (PBS D8573). D-manosa (CAS 3458-28-4), kit MTT TOX-1, caldo HMM (medio nutritivo F12 HAM, N6760), Janus Green (CAS 2869-83-2), tween 80 (CAS 9005-65-6), peryodato de sodio (CAS 7790-28-5), Hoechst (CAS 23491-45-4) y etilendiamina (EDA, CAS 107-15-3) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos). El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Ref. 10569010) y la penicilina-estreptomicina (Ref. 15140122) se adquirieron de Gibco (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). El acetato de etilo (CAS 141-78-6), el etanol (CAS 64-17-5), el acetónitrilo (CAS 75-05-8) y el sulfóxido de dimetilo (DMSO, CAS 67-68-5) se compraron a Merck. La sacarosa (CAS 57-50-1) y el ácido cítrico (CAS 77-92-9) se adquirieron de VWR Chemicals. JT Baker (JT Baker, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). El citrato de sodio dihidratado (CAS 6132-04-3) y el fosfato de sodio dibásico (CAS 7558-79-4) se adquirieron de Panreac. El anticuerpo F4/80 (ab100790), el isotipo IgG (ab171870) y la harina Alexa 488 (ab150077) se obtuvieron de Abcam (Abcam, Cambridge, Reino Unido). La infusión cerebro-corazón (BHI) se obtuvo de Difco Laboratories (Difco Laboratories, Ref. DF0418, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos). El suero bovino fetal (FBS) se adquirió de Trynity TEK (01010102, Cartagena, CO). Tampón de citrato 0,1 M (pH 4,5–5,5),

Microorganismos y Líneas Celulares

Histoplasma capsulatum cepa CIB 1980 fue aislada de un caso clínico humano y depositada en la colección del Grupo de Micología Experimental y Médica, CIB,

Medellín-Colombia. Las levaduras se cultivaron en caldo BHI y se suplementaron con 0,1% L-cisteína y glucosa al 1% a los 37°C con aireación en agitador mecánico (150 rpm, Innova® 44, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) y recolectadas de forma rutinaria durante la fase de crecimiento exponencial (a las 48 h). Se recogió el crecimiento fúngico y se pasó 20 veces a través de una jeringa de tuberculina con una aguja de 1/2 pulgada para eliminar las células fúngicas agrupadas. La viabilidad y el número de levaduras se determinaron mediante tinción con Janus Green. La unidad fúngica se consideró equivalente a una sola célula o célula madre con 2 a 7 células hijas. Las células fúngicas se contaron en un hemocitómetro y se resuspendieron en medio de cultivo HMM para obtener el número deseado. Los macrófagos murinos J774A.1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos). Las células se cultivaron en suspensión en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% a 37°C con 5% CO₂. Las células se pasaron cada 2-3 días. La viabilidad se determinó mediante inspección microscópica visual de los núcleos teñidos con azul de tripano.

Formulaciones de nanoemulsión

Las NP se prepararon utilizando el método de emulsificación de alta energía usando una variedad de composiciones de polímeros PLGA, es decir, diferentes proporciones de ácido glicólico a ácido láctico (50:50 o 75:25) y pesos moleculares (24–38 y 7–14). kDa, respectivamente), a saber, Resomer® RG 503H y RG 752H. Brevemente, se disolvieron 75 mg de PLGA en 5 ml de acetato de etilo y la fase orgánica se vertió en 10 ml de Kolliphor al 1%. Solución de P188 bajo mezcla vortex a 3200 rpm durante 20 s. Inmediatamente después de mezclar, la microemulsión se sometió a tres pulsos de ultrasonidos usando una sonda de 1/8 de pulgada al 20 % de amplitud (Ultrasonicator Q500, Qsonica, Newton, CT, Estados Unidos) para hacer la nanoemulsión. Posteriormente, la nanoemulsión se colocó en un evaporador rotatorio a 300 mbar a 150 rpm durante 10 min a 40°C (rotavapor® R-300, Buchi, Alemania). Las NP resultantes se purificaron mediante diálisis con etanol al 20 %. Finalmente, se liofilizó la dispersión coloidal en agua ultrapura. Para obtener NP con el tamaño, la carga superficial, la capacidad de carga del fármaco y la cinética de liberación adecuados, se llevaron a cabo estudios preliminares con varios tensioactivos en fase acuosa u orgánica. tabla 1 resume las propiedades coloidales de las formulaciones estudiadas.

Encapsulación de compuestos hidrofóbicos modelo en NP

Se evaluaron tres proporciones diferentes de polímero a ingrediente activo (1:25, 1:11 y 1:10) para encapsular ITZ en PLGA NP, lo que permitió determinar cómo la concentración de ITZ influyó en su proceso de encapsulación. El método de emulsificación se usó como se describe anteriormente. Se disolvieron 3,0–7,5 mg de ITZ en 5 ml de acetato de etilo. Se pesó una determinada cantidad de NP liofilizadas, se disolvió en acetónitrilo y se analizó mediante un método de cromatografía HPLC validado en fase inversa utilizando una columna C18 (Eclipse XDB, 150×4,6 mm, 5 μ m), un detector de UV-VWD, voriconazol como estándar interno, una proporción de 40:60 de agua a fase móvil de acetónitrilo, modo isocrático a 1 ml/min y una longitud de onda de 261 nm (Cáceres et al., 2016) descubrir

CUADRO 1 | Propiedades coloidales de PLGA NP con ITZ encapsulado.

Polímero (PLGA)	ZIT (mg)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)	contenido descargable (%)	EE (%)
50:50	3	189.9±7.5	0.21±0.01	- 50,7±3.3	2.8±0.1	72.1±0.2
	6.6	188.5±3.0	0.23±0.04	- 39,9±2.0	4.0±0.2	47.6±3.2
	7.5	272.5±43.3	0.41±0.12	- 46,4±2.4	8.2±0.2	89.4±2.8
75:25	6.6	150.4±6.4	0.16±0.02	- 40,9±2.9	6.0±0.2	75.2±2.9
50:50-pH5	6.6	217.7±5.5	0.24±0.04	- 46,9±1.3	5.6±0.1	68.0±0.3
50:50-TPGS-pH5	6.6	165.0±9.7	0.23±0.05	- 38,9±2.1	6.4±0.7	78.3±8.6
75:25-TPGS	6.6	157.7±7.7	0.16±0.01	- 38,8±2.1	6.1±1.1	75,0±13.0
75:25-TPGS-pH5	6.6	147.3±7.7	0.19±0.01	- 38,0±0.3	6.7±1.3	80.1±11.8

la cantidad de ITZ cargada en los NP. Como se describió anteriormente, se usó el método de emulsificación para encapsular el rojo Nilo como molécula modelo (a una concentración de 120 μ M). La cuantificación del rojo del Nilo encapsulado se evaluó mediante espectrofotometría UV-visible a 520 nm.

Determinación de la Eficiencia de Encapsulación y Capacidad de Carga de Drogas

La determinación de DLC y EE en NR-PLGA-NP e ITZ-PLGA-NP, respectivamente, se estimó a partir de lo siguiente:

contenido descargable-

$$\frac{\text{Masa encapsulada (NR o ITZ) en nanopartículas (mg)} \times 100\%}{\text{Masa total de nanopartículas (mg)}}$$

EE-

$$\frac{\text{Masa encapsulada (NR o ITZ) en nanopartículas (mg)} \times 100\%}{\text{Masa (NR o ITZ) añadida inicialmente (mg)}}$$

Caracterización fisicoquímica de nanopartículas

El tamaño de NP y la distribución de tamaño (PDI) se obtuvieron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y el potencial ζ (mV) se obtuvo mediante dispersión de luz electroforética (ELS) en un Zetasizer-pro (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C después de una dilución acuosa adecuada por triplicado. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) determinó la morfología de las NP. Se añadió una gota de la dispersión de nanopartículas a una rejilla de cobre con membrana de carbono y se dejó secar a temperatura ambiente para obtener las imágenes TEM (Tecnai F20 Super Twin, FEI). Se utilizó software de micrografía digital para el tratamiento de imágenes. El análisis térmico se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un modelo TA Instruments Q20. El análisis se realizó con las nanopartículas liofilizadas cargando itraconazol y sus precursores, provocando una deleción térmica antes de analizar cada muestra. El método consistió en pesar muestras de 4 a 8 mg, sellarlas en una cápsula hermética de aluminio y analizarlas a temperaturas que oscilaban entre 20 y 350°C a las 10° C/min en atmósfera de nitrógeno para obtener los respectivos termogramas. Las NP con el fármaco encapsulado, las nanopartículas funcionalizadas, la mezcla física de los precursores y los precursores solos se caracterizaron por FT-IR.

espectroscopia utilizando el accesorio de transmitancia en el equipo Thermo i550. Los materiales se prepararon como gránulos de bromuro de potasio (KBr) y las mediciones se realizaron mediante 32 escaneos con una resolución de 4 cm⁻¹. Se recogieron espectros de 4.400 a 350 cm⁻¹ números de onda Antes del análisis, la línea de base se midió en las mismas condiciones usando una tableta de KBr puro como referencia.

Liberación y estabilidad de fármacos

Para evaluar el perfil de liberación de ITZ, se preparó una dilución de 3 ml de la solución original de NP frescas, se diluyó en 25 ml de agua purificada estéril y se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 25 ml de medio de liberación simulando condiciones fisiológicas (solución de PBS a pH 7,2) que contenía 1% v/v de tween 80. A cada 1,5 se le añadió 1,0 ml de esta solución. -ml de tubo para un total de 11 tiempos de análisis (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 24, 48 y 72 h, respectivamente). Posteriormente, los tubos se incubaron en un mezclador térmico a 800 rpm y 37°C, y cada vial se extrajo en los tiempos seleccionados. Luego, los viales se centrifugaron a 10.000 rpm y 25°C durante 1 h. El sobrenadante y el sedimento se usaron para la determinación directa e indirecta de ITZ por cromatografía HPLC.

La estabilidad de las NP de dos tipos de polímeros se evaluó después de la liofilización y la crioconservación con sacarosa al 5%. 4 y 25°C se estudiaron como temperaturas de almacenamiento hasta por un mes. La dispersión de NP optimizadas almacenadas a 4° También se evaluó la C sin liofilización durante un mes. Además, la estabilidad de la dispersión a 37°C se analizó en las mismas condiciones de liberación cinética (PBS pH 7,2, interpolación 1 % v/v a 37°C). Para ello, se añadieron 20 mg de las NP a tubos de 1,5 ml y las muestras se extrajeron al inicio y al menos cinco veces entre la primera y la cuarta semana de evaluación. Las NP liofilizadas y dispersas se resuspendieron en 1 ml de agua purificada estéril y se evaluaron el tamaño, la carga superficial y el PDI como se mencionó anteriormente.

Pruebas de susceptibilidad antifúngica

La actividad antifúngica de ITZ cargado en PLGA-NP se comparó con suspensiones acuosas de ITZ. La inhibición del crecimiento fúngico se probó usando el método de microdilución para levadura (M27-A3) siguiendo el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), con PLGA-NP vacías y cada componente de las NP (PLGA, TPGS y Kolliphor P188) como un control. Se prepararon suspensiones de levadura

en medio HMM ajustado a una concentración de 3×10^5 UFC. Se añadieron alícuotas de 0,1 ml de levadura en suspensión por pocillo. Las diluciones de cada tratamiento se prepararon en medio HMM con DMSO al 1%. Las concentraciones finales de fármaco fueron de 16-0,007 $\mu\text{g/ml}$ para cada tratamiento, utilizando como control el medio con un 1% de disolvente sin fármaco. La placa se incubó a 37°C con aireación en agitador mecánico (150 rpm, Innova® 44, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) durante 7 días. Una vez finalizada la incubación, se comprobó el crecimiento del hongo por turbidez visible y se determinó la viabilidad del hongo mediante el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Inmovilización de anticuerpos en poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) NP y

NP recubiertas de manosa

La funcionalización de NP con anticuerpos por adsorción física y acoplamiento covalente se compararon en términos de eficiencia. Para la inmovilización física de los anticuerpos en la superficie de las NPs PLGA75:25-TPGS-pH5 con rojo Nilo encapsulado, 25 μl de la dispersión de partículas (1,5 mg/ml en tampón citrato 0,1 M con un valor de pH entre 4,5 y 5,5, Se diluyó tampón MMES 50 mM con un valor de pH entre 6,0 y 6,5, PBS 0,1 M con un valor de pH de 6,5 o tampón HEPES 50 mM con un valor de pH de 7,0) con 4 ml de tampón MES. La dispersión de NP se vertió gota a gota en 0,36 mg/ml de anticuerpo anti-F4/80, dependiendo de las proporciones 1:5, 1:10 y 1:20, se disolvió en 50 o 300 μl del tampón según el pH a ser evaluado. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 4 o 12 h o a 4°C durante 24 h bajo agitación constante. Se obtuvo un botón de NPs funcionalizadas por ultracentrifugación a 10.000 rpm a 4°C durante 30 min, seguido de dos pasos de lavado con 600 l de agua por ultracentrifugación de 10.000 rpm a 4°C durante 30 min. El botón final se diluyó hasta un volumen final de 17 μl con PBS 1X estéril.

La unión covalente de anticuerpos a la superficie de PLGA NP se realizó mediante la reacción de acoplamiento EDC/NHS, utilizando un proceso de dos pasos que implica la activación de un grupo carboxilo y la posterior conjugación con aminos primarias. Se diluyeron PLGA75:25-TPGS-pH5 NP con rojo Nilo encapsulado a 1,5 mg/ml en tampón MES 50 mM (pH 6,5). Se disolvieron 23 mg (100 mM) de NHS y 153 mg (400 mM) de EDC-HCl en 1 ml de tampón 50 mM MES (pH 6,5), se añadieron a 1 ml de esta dispersión y se agitaron a 800 rpm a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, la mezcla de reacción se lavó tres veces con tampón MES mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 min para eliminar el material sin reaccionar y se diluyó hasta un volumen final de 2 ml con PBS 10 mM (pH 6,5). Se diluyeron 5,7 μl de la dispersión de NP activada (6,5 mg/ml) en 50 μl de PBS (pH 6,5), 10,4 μl de F4/80 (0,36 mg/ml) o 3. Se disolvieron 75 μl de IgG de ratón (1 mg/ml) en 50 μl de PBS. La dispersión de NP se añadió gota a gota a la solución de anticuerpo y la mezcla de reacción combinada se agitó a 4°C durante 2 h. A continuación, las NP funcionalizadas se lavaron dos veces con PBS 10 mM (pH 7,2) mediante centrifugación a 3000 rpm durante 30 min. El volumen final de la dispersión se ajustó a 17 μl con PBS 10 mM (pH 7,2).

Las NP recubiertas de manosa se prepararon en base a trabajos previos (Ghotbi et al., 2011), con modificaciones. Brevemente, se resuspendieron 3 mg de cada PLGA NP en 2 ml de MES (pH 6,5) y se mezclaron con 500 μl de NHS 0,1 M y 500 μl de DCC 0,4 M. Después de 30 min, se añadieron 0,2 μl de EDA y se incubó durante 2 h. Simultáneamente, se abrió el anillo de D-manosa tratando 3 mg del mismo con NaIO 10 mM solución y se incubó en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, la manosa se agregó a la solución con PLGA NP y se incubó durante 12 h a temperatura ambiente (TA) con agitación a 800 rpm. Posteriormente, las NP se lavaron con PBS 10 mM mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4°C durante 30 min tres veces para eliminar el exceso de EDA y manosa sin reaccionar.

Detección de anticuerpos en NP

4, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ cabra antiRabbit IgG Alexa Fluor 488 (AF 488) se agregaron a la solución de NP funcionalizados. Se añadió PBS estéril 1X hasta alcanzar el volumen final de 20 μl . Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con agitación constante. Una vez finalizada la incubación, se llevó a un volumen final de 200 μl para medirlos por citometría de flujo o espectrofotometría de fluorescencia, respectivamente. Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de AF488 entre 25 y 0,195 $\mu\text{g/ml}$, los valores de intensidad de fluorescencia se graficaron frente a la concentración (Figura complementaria S4A, S4B), y los valores de las concentraciones de anticuerpos desconocidos se calcularon a partir de la ecuación lineal.

Estudio de la formación de corona de proteínas

Las NP funcionalizadas se incubaron con suero fetal bovino al 10-100 % a 37°C durante 1 h para permitir la adsorción de proteínas en un volumen final de 20 μl , y luego, se tomaron 3,4 μl para realizar las mediciones de tamaño y carga superficial como se indicó anteriormente. Las NP funcionalizadas gestadas con la proteína corona se incubaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo secundario AF 488 a temperatura ambiente durante 30 min, se llevaron a un volumen de 100 μl con PBS estéril y se midieron en términos de intensidad de fluorescencia por espectrofotometría para evaluar la accesibilidad del anticuerpo primario F4/80 después de que se formó la corona de proteína (Tonigold et al., 2018).

in vitro Ensayo de especificidad

5×10^4 Las células J774.1A se adhirieron a una placa de 96 pocillos durante 16 h en DMEM con BFS al 10 %. A continuación, se añadieron 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de NPs funcionalizadas por el método que presentó mayor grado de funcionalización o NPs sin recubrir y se incubaron a 37°C durante 3 h con 5% CO_2 . Por lo tanto, las monocapas se lavaron tres veces con PBS que se templó previamente para eliminar las NP no endocitadas. Los cultivos celulares se caracterizaron por microscopía de fluorescencia. La determinación de rojo Nilo dentro de las células (área de rojo Nilo) se midió indirectamente para averiguar las diferencias en la especificidad de los ligandos. Para corroborar la captación de las NP, utilizamos colorante Hoechst para teñir los núcleos de las células y colocalizar las NP. El área de rojo Nilo (%) se determinó utilizando el software ImageJ versión 1.48 (Institutos Nacionales de Salud). Se capturaron diez imágenes usando un objetivo 40X y se analizaron aleatoriamente de diferentes regiones. Se enmarcaron las celdas individuales y las áreas rojas del Nilo.

con selección a mano alzada para medir la región interior. Estas áreas se tomaron como el área total y el área de Nilo rojo se calculó utilizando el paquete Microsoft Excel 2013 utilizando los datos (Mejía et al., 2015).

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño experimental de cribado tipo Plackett-Burman de forma aleatoria con tres puntos centrales por duplicado, y el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XVII se utilizó para evaluar los parámetros críticos del método de nanoemulsión para obtener un total de 15 pruebas. Todos los análisis estadísticos utilizaron el software GraphPad Prism (versión 8.0); la distribución normal se determinó mediante ANOVA y se verificó mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. De acuerdo con la distribución gaussiana de los datos, las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney. Apags-valor $\leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Preparación y Caracterización de NPs

Un diseño experimental racional de Plackett-Burman evaluó los factores más importantes que influyen en el autoensamblaje de los nanotransportadores, utilizando el método de nanoemulsión con rojo Nilo como modelo de molécula hidrofóbica. El diseño consistió en quince experimentos que evaluaron la influencia sobre el tamaño de las NP, PDI y carga superficial como variables de respuesta. Los factores evaluados fueron concentraciones de PLGA (5–15 mg/ml), rojo Nilo (20–40 μ M) y surfactante (3–5 %), amplitud de sonicación (50–80 %), tiempo (30–40 s), y relación entre fase orgánica y fase acuosa (v/v; 1:2, 1:1,5 y 1:1). El proceso se estudió con PLGA de dos composiciones diferentes (proporción de ácido glicólico a ácido láctico 50:50 o 75:25) y pesos moleculares (24–38 y 7–14 kDa). Se establecieron condiciones experimentales óptimas para ensamblar nanoportadores PLGA con un tamaño de 200 nm, PDI <0.3 y potencial $\zeta \leq -30$ mV, que se consideran adecuados para nuestro propósito. A partir del diseño experimental, las condiciones óptimas fueron 15 mg/ml de PLGA, 30 μ M de rojo Nilo, 3 % de surfactante, 20 % de amplitud de sonicación, 30 s de tiempo de sonicación y proporción de fase orgánica a agua de 1:2, en la que el diámetro de NPs de PLGA 50:50 (148.2 \pm 23,3 nm) fue mayor que la de PLGA 75:25 NP (119,9 \pm 18,1) (Figura complementaria S1A). Este comportamiento se explica por el aumento de la viscosidad inherente del sistema PLGA 50:50 (0,32-0,44 dl/g), con un peso molecular superior al de PLGA 75:25 (0,14-0,22 dl/g). Los nanoportadores de PLGA 50:50 tenían una distribución de tamaño de partícula con una polidispersidad ligeramente inferior (0,12 \pm 0,02) que los nanoportadores de PLGA 75: 25 (0,16 \pm 0,04). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ζ -potencial, siendo estos negativos en ambos sistemas (-34,5 \pm 9,0 y -32,9 \pm 6,8 mV) para NP de PLGA 50:50 y 75:25, respectivamente.

En las condiciones optimizadas, denominadas en adelante “formulación base”, se estudió la influencia de la relación PLGA/ITZ sobre las propiedades fisicoquímicas, DLC y EE.

Los nanoportadores se prepararon a partir de PLGA 50:50 cambiando el peso de ITZ (3, 6,6 y 7,5 mg) pero manteniendo constante el peso de PLGA (15 mg/ml) para obtener diferentes proporciones de ITZ a PLGA (1:25, 1: 11 y 1:10). HPLC logró la cuantificación de ITZ usando el método isocrático para determinar DLC y EE. contenido descargable (8.2) \pm 0,2%) y EE (89,4 \pm 2,8%) del sistema 1:10 ITZ-to-PLGA aumentó significativamente con respecto al sistema 1:25 ITZ-to-PLGA, que tiene un DLC de 2,8 \pm 0,1% y un EE de 72,1 \pm 0,2%. Sin embargo, el tamaño de partícula aumentó a 272.5 \pm 43,3 nm con un PDI de 0,4 \pm 0.1. Dicha formulación fue probada con NPs de PLGA 75:25, mostrando tamaño adecuado (150.4 \pm 6,4 nm) y propiedades adecuadas (-40,9 \pm 2,9 mV, PDI 0,16 \pm 0.02, contenido descargable 6.0 \pm 0,2% y EE 75,2 \pm 2,9%) (Figura 1A; Tabla 1). El tamaño, la distribución, el grado de agregación y la homogeneidad morfológica de las NP se estudiaron mediante análisis TEM de muestras secas al aire sin teñir que mostraban imágenes de bajo y alto aumento (Figura 1B; Figura complementaria S2A). La imagen del núcleo denso de partículas de las NP ensambladas presentó una morfología de forma esférica y cuasi esférica con una superficie lisa, ausencia de estructuras vesiculares y bajo grado de agregación o coalescencia. Las NP presentaron un tamaño de partícula promedio de 132.0 \pm 36,6nm (PLGA 75:25) y 145,0 \pm

28,2nm (PLGA 50:50) (Figura 1B; Figura complementaria S2A), conn-30, respectivamente.

FT-IR y DSC caracterizaron el proceso de nanoencapsulación para determinar las interacciones ITZ-PLGA. Figuras 1C, Emuestre los espectros FT-IR de los precursores individuales (a-c), la mezcla física (d) y los NP sin (e) y con (f) ITZ encapsulados en ambos tipos de polímeros. La mezcla física muestra señales principalmente de la contribución de los picos a 1.767 cm^{-1} (estiramiento de CO) de polímeros PLGA, un pequeño pico a 1.697 cm^{-1} (estiramiento de CO) del grupo amida de ITZ, y a 2.844 cm^{-1} (estiramiento C-H) y 1.106 cm^{-1} (estiramiento C-O) del estabilizador. El patrón de mezcla física cambió en las NP con ITZ encapsulado (f) con respecto a las NP vacías (e), mostrando un pico a 1767 cm^{-1} (Estiramiento CO) de mayor intensidad. La característica ITZ alcanza su punto máximo a 1.697 cm^{-1} (CO que se extiende desde el grupo amida), 1.520 cm^{-1} (estiramiento CN), y 1.232 cm^{-1} (Estiramiento C-N) no se pudo observar en NP con ITZ encapsulado, lo que indica interacciones PLGA-ITZ. Figuras 1D, Emuestre el análisis DSC de los precursores individuales (a-c), la mezcla física (d) y los NP sin (e) y con (f) ITZ encapsulados en ambos tipos de polímeros. Por ejemplo, los termogramas 1 F muestran la temperatura de transición vítrea y el pico de fusión endotérmico único a 49,1 y 55,9°C del polímero PLGA 75:25 (a) y el tensioactivo Kolliphor P188 (c), respectivamente. Una transición monofásica a 53,8°C se observó C para la mezcla física de los componentes. En comparación, la ITZ libre (b) muestra un único pico de fusión endotérmica a 169,9°C, típica de un fármaco en forma cristalina, mientras que las NP vacías (e) muestran un único pico de fusión endotérmica a 53,1°C. Sorprendentemente, el pico de fusión de ITZ desapareció por completo en el termograma de ITZ encapsulado en NP, lo que indica que PLGA e ITZ podrían estar interactuando a través del grupo triazol (o el grupo amina) de ITZ y el grupo carboxílico de la cola hidrofóbica de PLGA (Yi et al., 2007). Un análisis similar se deriva del termograma en Figura 1D para PLGA 50:50.

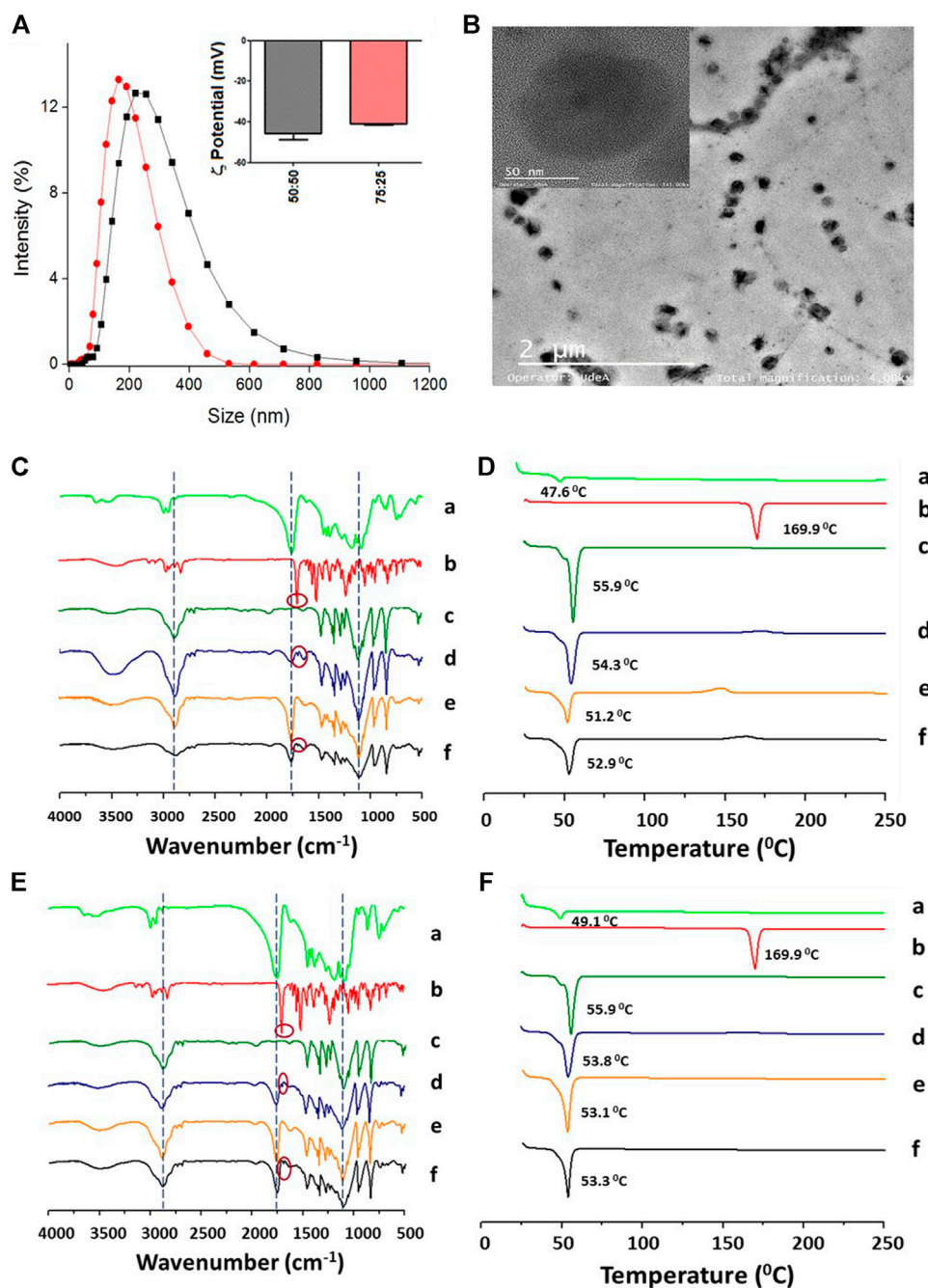


FIGURA 1 | Caracterización fisicoquímica de las PLGA NPs (formulación base) con ITZ encapsulado. (A) Tamaño hidrodinámico y potencial ζ de PLGA 50:50 (línea negra y barras) y PLGA 75:25 (línea roja y barras). (B) Caracterización morfológica de PLGA 50:50 NPs por TEM. (C) Caracterización de PLGA 50:50 y (E, F) PLGA 75:25 NP, respectivamente, por FT-IR (izquierda) y DSC (Correcto). PLGA (a), ITZ (b), Kolliphor P188 (c), mezcla física de 1:11:37,9 ITZ-a-PLGA-a-Kolliphor P188 relación en peso (d) y NP de la mezcla sin (e) y con (f) ITZ encapsulado.

El siguiente conjunto de experimentos introdujo algunas modificaciones en la formulación de la base para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, evaluadas por el perfil de liberación del fármaco, EE y DLC. Las modificaciones consistieron en bajar el pH de la solución acuosa a cinco e incluir un excipiente anfifílico multipropósito como la vitamina E-TPGS en una proporción 1:10 en peso

con respecto a PLGA, uno a la vez. Cuando ITZ se encapsuló en PLGA 50:50 NP a un valor de pH de 5, el DLC ($5,60 \pm 0,03\%$) y EE ($68,0 \pm 0,3\%$) aumentado con respecto a las NPs a pH neutro (Tabla 1), con otras características dentro de los valores esperados ($217,7 \pm 5,5\text{nm}$, $0,24 \pm 0,04$ y $-46,9 \pm 1,3\text{mV}$) para tamaño, PDI y potencial ζ , respectivamente. Entonces, una combinación de surfactantes

(Kolliphor P188 y vitamina E-TPGS) a diferentes concentraciones. Los NP resultantes mostraron un DLC mejorado ($6.1 \pm 1,1\%$) y EE ($75,0 \pm 13,0\%$) en comparación con la formulación base (Tabla 1), con otras características en valores óptimos ($157.7 \pm 7,7\text{nm}$, $0,16 \pm 0,01$ y $-38,8 \pm 2,1$ mV) para tamaño, PDI y potencial ζ , respectivamente. Cuando se evaluó en conjunto la mezcla de tensioactivos a un valor de pH de 5, ambos polímeros (PLGA 50:50 y PLGA 75:25) mostraron una mejora de DLC y EE (Tabla 1), polidispersidad moderada, y tamaño y carga superficial adecuados. De igual forma, una formulación optimizada con PLGA 75:25 y la mezcla de tensioactivos (Kolliphor P188 y vitamina E-TPGS) al valor de pH de 5 mostró un incremento en los valores de DLC y EE con respecto a la formulación base, pasando de 6.0 a 6.7% de DLC y de 75.2 a 80.1% de EE, manteniendo similares características de tamaño, distribución y carga superficial.

Para investigar la interacción de ITZ con los componentes presentes en las NP con formulación optimizada, se estudiaron la composición química y los cambios físicos de los materiales mediante FT-IR y DSC, respectivamente. Figuras 2C, Emuestre los espectros FT-IR de los precursores individuales (a-e), la mezcla física (f) y las NP sin (g) y con (h) ITZ encapsulado en ambos tipos de polímeros. La mezcla física muestra principalmente los picos a 1.767 cm^{-1} (estiramiento de CO) del polímero PLGA, un pequeño pico a 1.697 cm^{-1} (estiramiento de CO) del grupo amida de ITZ y una pequeña banda de dobles enlaces carbono-carbono a 1511 cm^{-1} , y a 2.844 cm^{-1} (estiramiento C-H) y 1.106 cm^{-1} (estiramiento C-O) del estabilizador. El patrón de mezcla física cambió en las NP con respecto a las NP vacías (e) y las ITZ encapsuladas (f), mostrando un pico a 1.760 cm^{-1} (Estiramiento CO) de mayor intensidad. La característica ITZ alcanza su punto máximo a 1.697 cm^{-1} (CO que se extiende desde el grupo amida), 1.520 cm^{-1} (estiramiento CN), y 1.232 cm^{-1} (Estiramiento C - N) no se pudo observar en NP con ITZ encapsulado. Figuras 2D, Emuestre picos de Tg y picos de fusión endotérmica para polímeros PLGA, ITZ y Kolliphor P188 (a-c), como se mencionó anteriormente con respecto al análisis DSC para la formulación optimizada. La fusión endotérmica alcanza su punto máximo en $36,87^\circ\text{C}$ para vitamina E-TPGS (d) y para la mezcla física de citrato de sodio y ácido cítrico (2:1) a 160 y $195,38^\circ\text{C}$ (e) se observaron. Además, utilizando el polímero PLGA 75:25 (Figura 2F), se observó una transición de fase única para la mezcla física (f), las NP en blanco (g) y las NP ITZ encapsuladas (h) a $52,4$, $50,0$ y $50,1^\circ\text{C}$, respectivamente. Un análisis similar se deriva del termograma en Figura 2D para formulación optimizada PLGA 50:50 (Yi et al., 2007).

in vitro Liberar modelos cinéticos

La cinética de liberación de ITZ de los nanoportadores con la formulación optimizada se evaluó en un medio de liberación que contenía tween 80 al 1% v/v para garantizar condiciones de dilución de "hundimiento" infinitas y emular las condiciones fisiológicas (PBS con un valor de pH de $7,2$ a 37°C). La cinética se determinó obteniendo la fracción de ITZ liberada en un momento determinado (M/METRO) durante 72 h por HPLC. Figura 3A muestra un perfil cinético de liberación de ITZ similar, con una liberación máxima de ITZ de 46 y 43% de los nanoportadores PLGA50:50-TPGS-pH5 y PLGA75:25-TPGS-pH5, respectivamente, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Ling et al., 2016; Varga et al., 2019). Los datos fueron

ajustado mediante modelos matemáticos buscando el mejor ajuste analizando el coeficiente de correlación y otros parámetros relacionados con los modelos estudiados (Tabla complementaria S1) para solicitar información sobre la formulación optimizada del mecanismo de liberación de ITZ. Con respecto a ambos tipos de partículas, se encontró que la cinética de liberación no se ajustaba a los modelos de orden cero, Higuchi o Korsmeyer-Peppas, a juzgar por sus bajos coeficientes de correlación. El ajuste de los perfiles de liberación empleando el modelo de Lindner y Lippold para evaluar el efecto "burst" presentó valores relativamente bajos de coeficientes de correlación; por tanto, los perfiles estudiados tampoco se ajustaban a este modelo. Sin embargo, cuando los sistemas se evaluaron utilizando los modelos Ritger-Peppas y Peppas-Sahlin, los coeficientes de correlación se acercaron más a la unidad, mostrando un mejor ajuste.

Estabilidad del nanoportador

La estabilidad de los nanoportadores optimizados PLGA-TPGS-pH5 se evaluó en suspensión acuosa a 4°C y en las condiciones de cinética de liberación, es decir, PBS (pH $7,2$), con tween al 1% v/v a 37°C . Figura 3B muestra que durante el mes de evaluación, las dispersiones acuosas de las formulaciones almacenadas a 4°C presentaron alta estabilidad física en cuanto a su tamaño de partícula, con una variación de menos del $5,5\%$ de la desviación estándar relativa (RSD) (gráfico superior), polidispersidad moderada (gráfico medio), y un potencial negativo medio-alto (trama inferior). Similarmente, Figura 3C muestra la suspensión en condiciones de cinética de liberación para ambos tipos de NP. Demostró alta estabilidad coloidal durante los 14 días de evaluación con variaciones de tamaño de partícula inferiores al 10% de la RSD (gráfico superior), polidispersidad moderada (gráfico medio) y potencial negativo medio a alto (gráfico inferior). Debido a que las NP PLGA75:25-TPGS-pH5 presentan características óptimas (tamaño, PDI y potencial ζ) y mayor DLC, EE, estabilidad y reproducibilidad, continuaron hasta el in vitro estudios.

Actividad antifúngica

La concentración inhibitoria mínima (MIC) de ITZ libre y encapsulado en los nanoportadores optimizados se determinó con una cepa colombiana de *H. capsulatum* (CIB 1980). Para ello se evaluaron diferentes concentraciones que oscilaron entre 16 y $0,015\text{ }\mu\text{g/ml}$ de ITZ libre y encapsulado en PLGA75:25 TPGS-pH5 NPs y NPs vacías (como control). Se encontró que la MIC era de $0,031$ y $0,061\text{ }\mu\text{g/ml}$ para ITZ libre y encapsulado usando el método de turbidez macroscópica (datos no mostrados) y ensayos MTT (Figura complementaria S3). Las NP vacías a la concentración alta ($16\text{ }\mu\text{g/ml}$) mostraron una ligera inhibición del crecimiento fúngico. El control con cada componente de NP no inhibió el crecimiento fúngico (datos no mostrados). Por otro lado, la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se estimó en $0,031\text{ }\mu\text{g/ml}$ con ambos tratamientos (Figura 4A).

Funcionalización de Nanocarriers

El efecto del pH, la temperatura, el tiempo de incubación y la proporción de anticuerpos a NP de PLGA75:25 TPGS-pH5 NP en la eficiencia de funcionalización se evaluó mediante citometría de flujo. Se observó que a pH $4,5$ y $7,0$ las NPs aumentaron de tamaño y PDI, sugiriendo procesos de aglomeración. A un pH tan extremo, los picos fueron

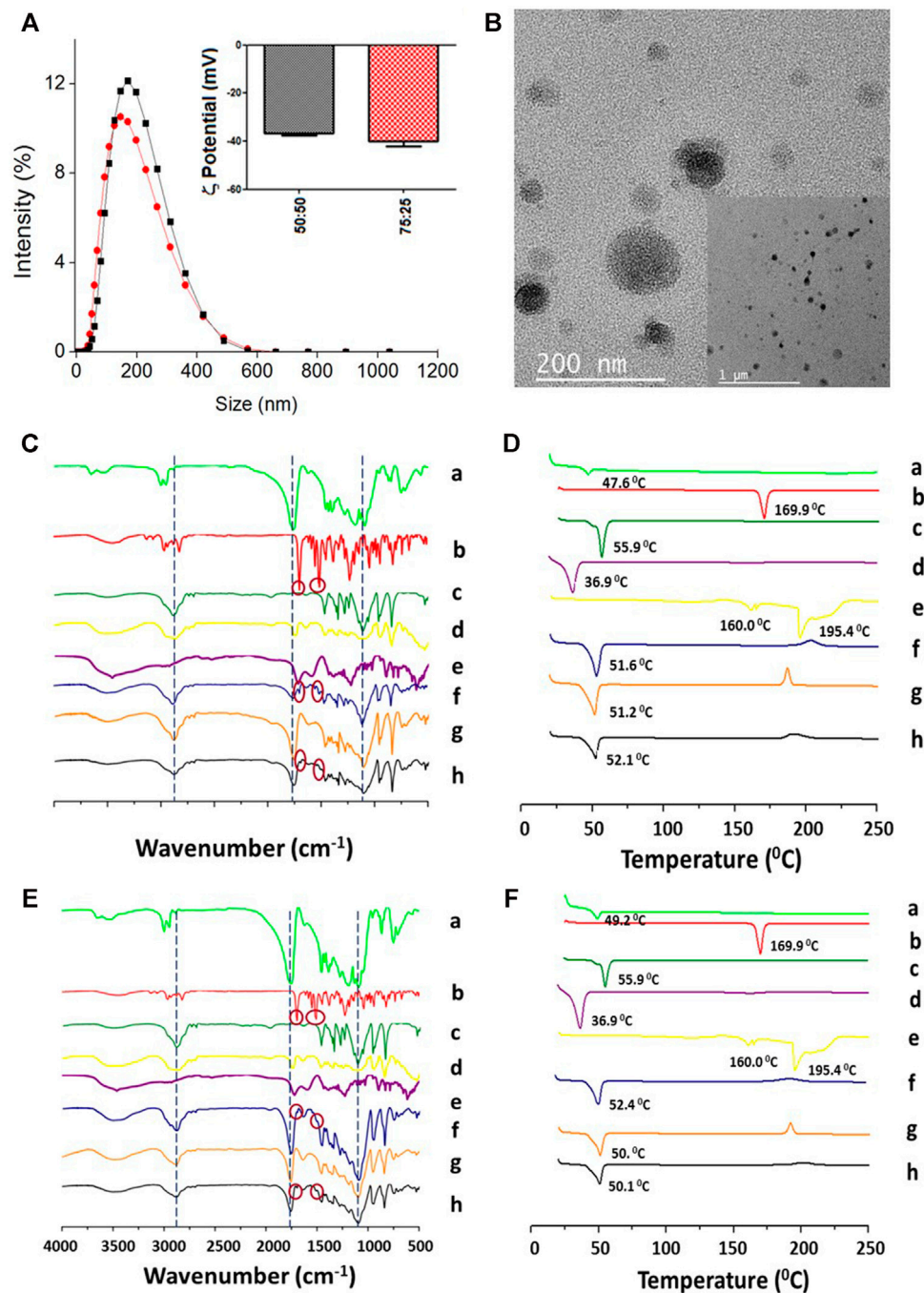


FIGURA 2 | Caracterización fisicoquímica de las NPs PLGA-TPGS-pH5 (formulación optimizada) con ITZ encapsulado. (A) Tamaño hidrodinámico y potencial ζ de PLGA 50:50 (línea negra y barras) y PLGA 75:25 (línea roja y barras). (B) Caracterización morfológica de PLGA 50:50 NPs por TEM. (C) Caracterización de PLGA 50:50 y (E, F) PLGA 75:25 NP, respectivamente, por FT-IR (izquierda) y DSC (Correcto). PLGA (a), ITZ (b), Kollipor P188 (c), vitamina E-TPGS (d), mezcla de citrato de sodio y ácido cítrico (2:1) (e), mezcla física de 1:11:14,2:1,1 ITZ Relación en peso de -a-PLGA-a-Kollipor P188-a-vitamina E-TPGS (f) y NP de la mezcla sin (g) y con (h) ITZ encapsulada.

generados en voltajes tanto negativos como positivos, lo que podría indicar la aglomeración y/o la precipitación de anticuerpos no absorbidos y posiblemente desnaturalizados y/o la desestabilización de las NP (datos no mostrados). Una disminución significativa en el potencial ζ fue evidente a las 12 h, lo que podría indicar una disminución en la estabilidad de

los NP (datos no mostrados). En general, las condiciones óptimas para el método de adsorción fueron una proporción de anticuerpo a NP de 1:10 (Figura 4B), un valor de pH de 6,5 (Figura 4C), y 24 h de incubación a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 4F), aumentando el tamaño pero manteniendo una polidispersidad moderada de 0.3 con una carga superficial negativa mantenida

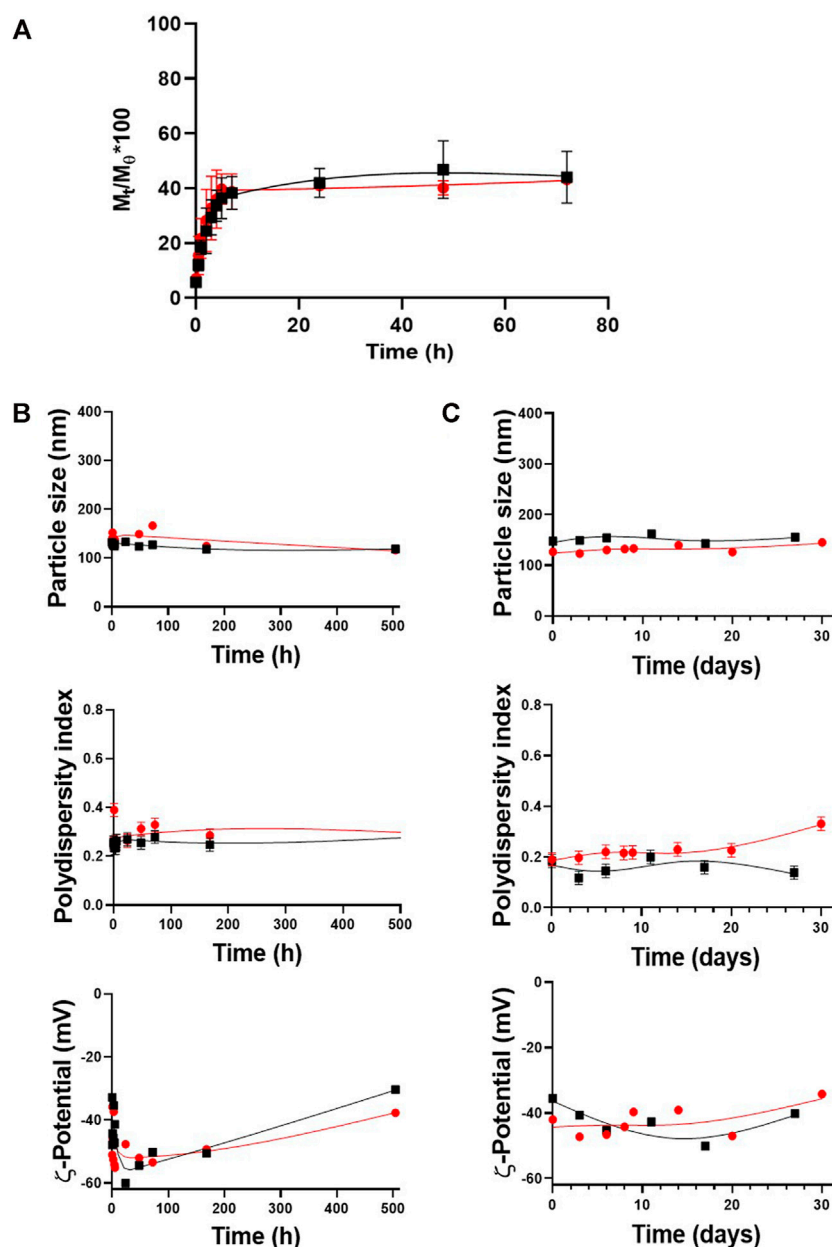
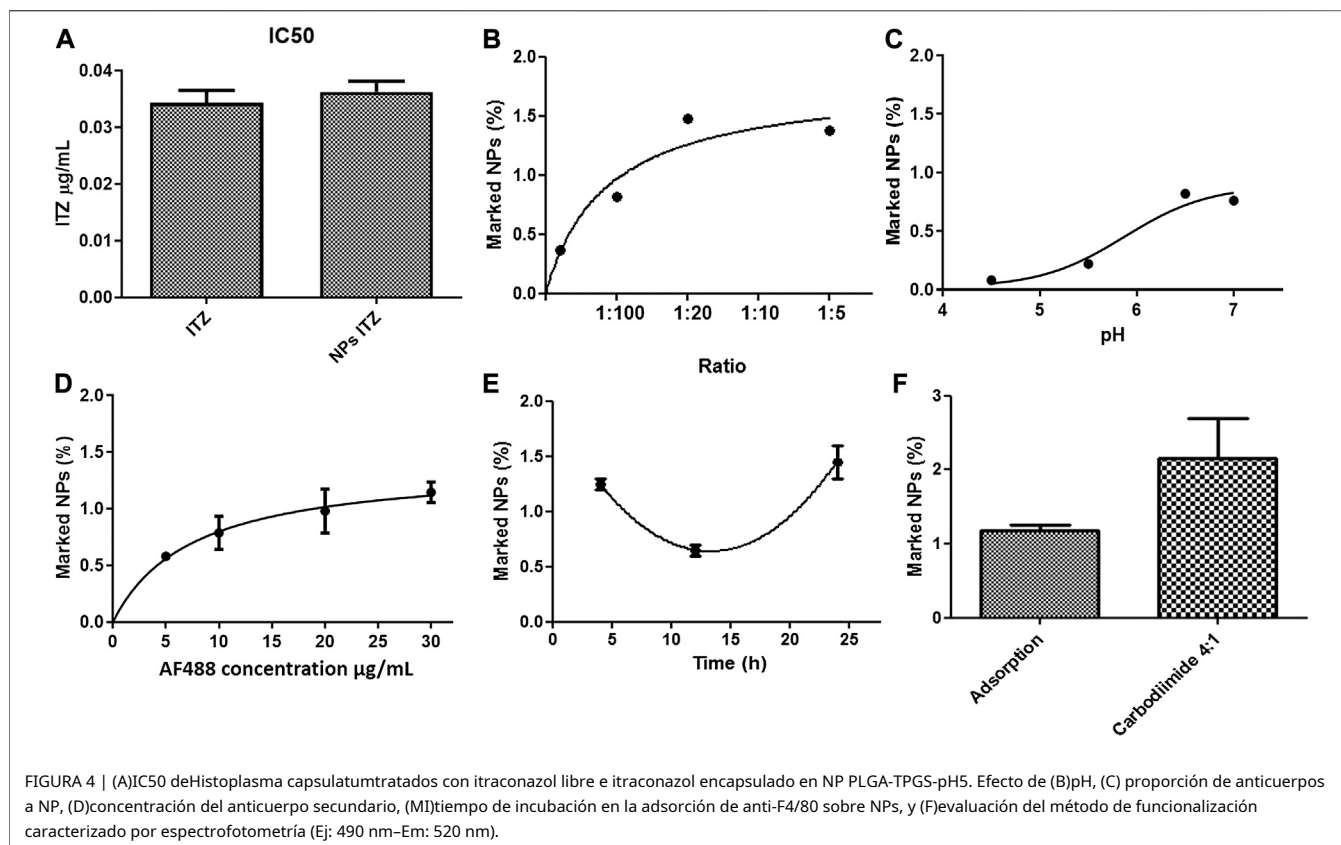


FIGURA 3 | Cinética de liberación y estabilidad de la formulación optimizada en el tiempo. (A) Perfiles de liberación para PLGA50:50-TPGS-pH5 y PLGA75:25-TPGS-pH5. Estabilidad de PLGA50:50-TPGS-pH5 (cuadrados negros) y PLGA75:25-TPGS-pH5 (círculos rojos) en términos de tamaño de partícula, PDI y potencial ζ (B) almacenado durante un mes a 4°C en una dispersión acuosa y (C) bajo las mismas condiciones cinéticas de liberación (PBS con un valor de pH de 7,2, entre 1% v/v a 37°C). Las barras de error indican la desviación estándar de tres mediciones sucesivas.

de -46 mV, lo que indica estabilidad coloidal. Una extensión máxima de 1,48 % de NP marcadas fue el valor más alto en comparación con las muestras funcionalizadas en otras condiciones (Figura 4D). Además, se determinó que la concentración óptima de anticuerpos secundarios era de 20 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4D).

Para el acoplamiento covalente, los grupos carboxilo disponibles primero se semicuantificaron mediante esterificación con EDC/NHS, seguido de análisis FTIR. Figura complementaria S5A muestra el espectro FTIR de las NP esterificadas (NP_PLGA_75: 25_Ester),

NP no esterificados (NP_PLGA_75: 25) y EDC, NHS y urea (que pueden ser residuos de reacción) (Wang et al., 2011). Las NP esterificadas no presentaron los picos característicos de NHS, EDC o urea, lo que indica que la reacción fue eficiente y que el proceso de lavado de las NP fue adecuado. Además, las NP esterificadas mostraron una disminución en el área bajo la curva del pico en λ -3492 cm^{-1} , correspondiente al grupo OH, y un aumento en el pico en λ -1,758 cm^{-1} , correspondiente al grupo RC-O. Este hecho se explica por la presencia del C-O adscrito al



cadena cíclica. Midiendo las áreas bajo la curva de las NP esterificadas (áreas finales) con respecto al control (áreas iniciales) (Figura complementaria S5C), la eficiencia de la reacción podría estimarse y relacionarse con la extensión de los grupos carboxilo activados en la superficie de la NP. Alrededor del 40 % de los grupos carboxilo en las NP estaban disponibles para la activación y el anclaje de anticuerpos covalentes. El acoplamiento del anticuerpo fue evaluado por la química de carbodiimida, obteniendo 2.7% de NPs funcionalizadas bajo las condiciones optimizadas utilizando el método de adsorción basado en protocolos reportados en la literatura (Figura 4F).

Formación de una corona proteica

Como análisis inicial de la formación de la corona de proteínas en la superficie NP funcionalizada más externa, según el método de funcionalización, se incubaron con 10-100 % de FBS a 37°C durante 1 h para simular las condiciones de circulación en el cuerpo. Las nanopartículas modificadas por el método de adsorción presentaron un tamaño mayor que las NP modificadas por la química de la carbodiimida. Con una concentración de 10% de FBS, los NP de ambos métodos tendieron a ± 260 nm de tamaño (Figura complementaria S6A). El potencial ζ mostró una disminución significativa cuando se modificó usando el método de adsorción (solo con 10% de FBS), pasando de -58 a -37 mV, en comparación con el del acoplamiento covalente que no mostró un cambio drástico en la carga superficial, pasando de -37,2 a -33,85 mV (Figura complementaria S6B). Finalmente, al analizar si había enmascaramiento del anti-F4/80 por la proteína corona, no hubo cambio significativo en

la eficiencia de funcionalización anti-F4/80 bajo adsorción, variando de 0,92 a 0,98%. En cambio, el acoplamiento covalente presentó una disminución significativa de 1,88 a 0,98 % de anti-F4/80 en la superficie de la NP (Figura complementaria S6C).

Especificidad para macrófagos

El rojo Nilo se utilizó como modelo del compuesto hidrofóbico para evaluar la especificidad de las NP funcionalizadas debido a su alta hidrofobicidad (solubilidad en agua <1 $\mu\text{g/ml}$), peso molecular relativamente alto (318,37 g/mol), detección simple (UV- espectroscopía visible y microscopía de fluorescencia), y alta fotoestabilidad. Se utilizó microscopía de fluorescencia para evaluar la especificidad de las NP funcionalizadas por los macrófagos J774A.1. Mientras que se evaluaron y compararon las NP funcionalizadas con el anticuerpo F4/80 o D-manosa por acoplamiento covalente, que se esperaba que presentaran una alta especificidad por los macrófagos, se usaron como controles las NP desnudas y las funcionalizadas con el isotipo IgG. Las imágenes combinadas muestran que F4/80 y D-manosa aumentaron la endocitosis de NP (NP: núcleo de células rojas y azules del Nilo) (Figuras 5C,D), pero las NP desnudas y las NP recubiertas con el isotipo IgG fueron menos endocitadas por los macrófagos (NP: rojo del Nilo y fusionadas; Figura 5B). La captación de NP se produjo en los macrófagos después de 3 h de incubación, como se muestra en Figura 5. La fluorescencia roja del Nilo se estimó como se describe en la sección Materiales y métodos para confirmar las diferencias de captación entre las NP funcionalizadas de manera diferente. De esta manera, la extensión de la internalización del macrófago fue mayor

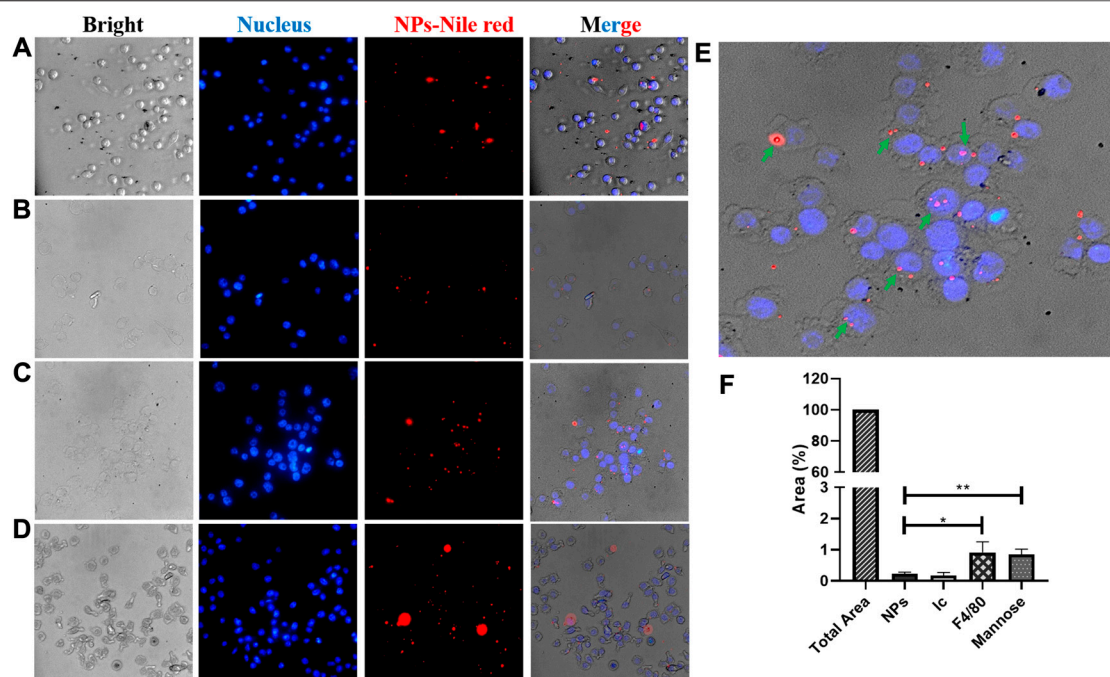


FIGURA 5 | Imágenes de microscopía de fluorescencia. Evaluación de endocitosis de NP funcionalizados con rojo Nilo encapsulado en el macrófago J774A.1. NP (A) sin y (B–D) con diferentes ligandos, (B) isotipo de control, (C) anticuerpo F4/80, y (D) manosa, a las 3 h de incubación. Las imágenes son el campo brillante (izquierda), filtro DAPI (izquierda-centro), filtro TRITC (derecha-centro), y combinado (Correcto), respectivamente. La escala es de 100 μ m. (MI) Imagen ampliada de la imagen fusionada F4/80; las flechas verdes indican macrófagos con NP endocitosis. (F) NP endocitadas estimadas midiendo el rojo Nilo por intensidad de fluorescencia como se describe en la sección Materiales y métodos.

para los tratados con NP recubiertas de anticuerpos F4/80 (0,91 %) que para los tratados con NP funcionalizadas con D-manosa (0,84 %), con NP desnudas (0,23 %) y recubiertas con isotipo IgG (0,17 %) que se utilizan como controles, respectivamente (Figura 5F).

DISCUSIÓN

Se desarrollaron NP para la administración de fármacos antimicóticos en sitios específicos para combatir las infecciones intracelulares a fin de mejorar la eficacia terapéutica. En este contexto, la literatura científica muestra que ITZ se ha encapsulado en micelas poliméricas mediante nanoemulsión, pero tiene una DLC relativamente baja. Además, la mayoría de ellos no son específicos de los macrófagos, una de las principales células diana de las enfermedades infecciosas y el principal problema en el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Los NP funcionalizados son una opción valiosa para regular la biodistribución a través de una célula o tejido objetivo y pueden dirigir fármacos a través de barreras biológicas (Esquema 1A) a un objetivo específico a través de la modulación del tamaño de partículas y la modificación de la superficie con ligandos para aumentar la penetración celular y lograr la especificidad de acción. Mediante el uso de esta estrategia, las NP pueden dirigirse a los focos de infección, donde se encuentra la carga principal de patógenos para liberar su carga. Además, se pueden administrar dosis más altas de fármaco en el sitio infectado (Esquema 1A), disminuyendo la resistencia de los microorganismos existentes o eliminando los microorganismos, provocando así menos efectos adversos en los pacientes.

En este estudio, las propiedades de las NP se ajustaron para encapsular una concentración óptima de ITZ en un sistema altamente biocompatible. Con la formulación base, al estudiar la influencia de la relación PLGA/ITZ en las propiedades fisicoquímicas de las NP preparadas por nanoemulsión, el sistema que contenía 7.5 mg de ITZ produjo un tamaño de partícula mayor, el cual aumentó a medida que aumentó la viscosidad relativa, de acuerdo con informes en la literatura (Wooster et al., 2008; Gupta et al., 2016). Además, una proporción de 1:5 de ITZ a PLGA produjo NP con una mayor polidispersidad (PDI - 0,41) que una proporción de 1:10 (PDI - 0,19), como se informó en otro lugar (Bian et al., 2013). Este efecto puede estar relacionado con la adsorción inadecuada de surfactante en una proporción menor de ITZ a PLGA y una mayor cantidad de ITZ a nivel de la superficie que no recubrió de manera efectiva las gotas emulsionadas, lo que provocó su desestabilización (Bian et al., 2013; Lakkireddy y Bazile, 2016; Wilkosz et al., 2018) y mayor aglomeración. Además, una relación ITZ a PLGA de 1:11 produjo NP con valores de DLC más altos ($4.0 \pm 0,3\%$) pero valores de EE más bajos ($47,6 \pm 3,2\%$). El mayor peso molecular de PLGA 50:50 posiblemente incrementó su carácter hidrofílico, evitando una partición adecuada de ITZ en las NP por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas PLGA-ITZ, por lo que ITZ podría estar migrando hacia la fase continua durante el proceso de nanoemulsión, produciendo menor EE. Sin embargo, dicha formulación base de PLGA 50:50 NPs presentó un tamaño óptimo ($188.5 \pm 3,0$ nm), PDI ($0,23 \pm 0,04$) y potencial ζ ($-39,9 \pm 2$ mV), en comparación con otras relaciones evaluadas (1:10 y 1:25) (Figura 1; Tabla 1). Los

CUADRO 2 | Comparación del tamaño medio de partícula por DLS y TEM.

Polímero (PLGA)	Tamaño (nm), DLS	Tamaño (nm), TEM
50:50	188.5±3.0	145.0±28.2
75:25	150.4±6.4	132.0±36.6
50:50-TPGS-pH5	165.0±9.7	140.3±26.7
75:25-TPGS-pH5	147.3±7.7	131.0±30.8

El tamaño de partícula promedio más pequeño de PLGA 75:25 NP en comparación con el de PLGA 50:50 puede estar relacionado con el peso molecular más bajo de PLGA 75:25, lo que reduce la viscosidad del sistema. En contraste, el aumento de DLC puede explicarse por la mayor interacción hidrofóbica entre los carbonos alifáticos de la ITZ y los grupos metilo de PLGA 75:25, lo que resultó en una mayor estabilización del principio activo dentro de las NP. En otras palabras, mayores interacciones hidrofóbicas de PLGA 75: 25-ITZ produjeron mayor empaquetamiento y, por lo tanto, nanoestructuras más pequeñas.

El siguiente conjunto de experimentos introdujo algunas modificaciones en la formulación de la base para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, evaluadas por el perfil de liberación del fármaco, EE y DLC. Las modificaciones consistieron en bajar el pH de la solución acuosa a cinco e incluir un excipiente anfifílico multipropósito como la vitamina E-TPGS en una proporción 1:10 en peso con respecto al PLGA, uno a la vez. Un medio tan ligeramente ácido aumentó la ionización de ITZ como su grupo carbonilo amida ($R-N-CO-H\delta^-$) fue protonado, aumentando así su solubilidad y dispersabilidad (Prentice y Glasmacher, 2005; Kapoor et al., 2015; Alhowyan et al., 2019). Por lo tanto, la mayor cantidad de interacciones electrostáticas estabilizadoras entre los componentes de la formulación disminuyó la difusión de ITZ hacia la fase continua durante el proceso de nanoemulsión para evitar afectar considerablemente la composición de PLGA pero impactar la DLC y EE mejoradas. Luego, se evaluó una combinación de tensioactivos (Kolliphor P188 y vitamina E-TPGS) a diferentes concentraciones. A diferencia de la formulación base, Kolliphor P188 se añadió en una concentración más baja (9,37 mg/ml) y se disolvió en la fase acuosa, mientras que la vitamina E-TPGS se utilizó en una proporción de 1:10 de PLGA 75:25 a vitamina E-TPGS y disuelto en la fase orgánica. Esta formulación aumentó DLC y EE, y dicha mejora puede explicarse por el aumento de las interacciones hidrofóbicas de la cola alifática (18 carbonos) de la vitamina E-TPGS con los carbonos alifáticos de ITZ además de las interacciones electrostáticas del grupo éster carbonilo de la vitamina E-TPGS con los grupos triazol de ITZ. PLGA 75:25 DLC de NP ($6.7\pm1.3\%$) fue ligeramente más alto que el DLC de PLGA 50:50 NPs ($6.4\pm0.7\%$), y esta formulación basada en PLGA 75:25 pasó al siguiente conjunto de experimentos. Por otro lado, se sabe que altas concentraciones de Kolliphor P188 podrían estar involucradas en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno durante el proceso de sonicación cuando las NP se ensamblan, generando así respuestas biológicas como la afectación de la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, entre otras. otros efectos adversos, cuando se prueban en vivo (Batrakova y Kabanov, 2008; Wang et al., 2012). Por lo tanto, es importante resaltar que a través de esta formulación mejorada, el contenido de Kolliphor

P188 se redujo más de 2,5 veces con respecto a la formulación base, por lo que se esperaba una mayor biocompatibilidad.

Los resultados de FT-IR y DSC para ambas formulaciones (base y optimizada) mostraron las interacciones polímero-fármaco en las NP encapsuladas con ITZ. En este contexto, estas interacciones ocurren posiblemente debido a un complejo formado entre el grupo triazol (o amina) de ITZ y el grupo carboxílico de la cola hidrofóbica de PLGA, como lo señalaron Yi y colaboradores (Yi et al., 2007). Además, la banda característica del polímero a 1.745 cm^{-1} (Estiramiento de CO) en los NP con ITZ fue muy intenso. Esta banda es indicativa de grupos terminales carboxílicos disponibles para funcionalización adicional con ligandos. Sorprendentemente, el pico de fusión de ITZ desapareció por completo en el termograma ITZ NPencapsulado, lo que indica la ausencia del estado cristalino del fármaco encapsulado. La interacción entre los precursores de la formulación permite una cierta libertad de movimiento molecular para organizarse de forma cristalina, reflejada por pequeños picos exotérmicos de baja intensidad entre 150 y 210°C para la mezcla física y los NP vacíos y cargados en los dos tipos de nanocarriers.

Las imágenes TEM determinaron las características estructurales y morfológicas de las NP de los dos polímeros PLGA con formulación optimizada (Figuras 2B; Figura complementaria S2), mostrando estructuras esféricas tipo núcleo-cáscara. Las NP consisten en el núcleo hidrofóbico PLGA y la cubierta hidrofílica de las colas hidrofílicas de la mezcla de surfactante Kolliphor P188 y vitamina E-TPGS. Los esquemas 1A,B ilustran un diagrama que representa la composición de las NP tipo núcleo-capa y las interacciones receptor-ligando correspondientes en la superficie celular para lograr los procesos de internalización (Lin et al., 2010). La repulsión estérica producida por las cadenas de polímeros hidrofílicos puede mejorar el tiempo de circulación de los nanoportadores en la sangre superando el sistema mononuclear fagocítico (Mu y Feng, 2003; Mu y Feng, 2003). El tamaño de partícula de PLGA 75:25 NPs, estimado por TEM, fue más pequeño que el de PLGA 50:50 NPs para las formulaciones optimizadas y comparable con los obtenidos de DLS (Tabla 2). Además, el tamaño de partícula por DLS fue sobreestimado, como se esperaba.

Se estudió la cinética de liberación de ITZ de los nanoportadores con la formulación optimizada. Aunque se esperaba que el sistema PLGA50:50-TPGS-pH5 NP más hidrofílico se degradara más rápido que los PLGA75:25-TPGS-pH5, el hecho de que se presenten comportamientos similares en ambos tipos de nanotransportadores puede explicarse por el peso molecular más alto. peso del polímero PLGA 50:50, que tiene una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas con ITZ, comparable a las interacciones hidrofóbicas de PLA en el PLGA 75:25 de menor peso molecular. En otras palabras, el mayor peso molecular de PLGA 50:50 afecta la cinética de liberación más que el carácter hidrofílico de este polímero en comparación con PLGA 75:25 de menor peso molecular (Fredenberg et al., 2011). Además, el comportamiento multipropósito de la vitamina E-TPGS como componente de la matriz permite el establecimiento de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas dentro de la nanopartícula que equipara los dos tipos de sistemas con diferentes naturalezas químicas. En ambos tipos de partículas, se encontró que la cinética de liberación no se ajusta a los modelos de orden cero, Higuchi o Korsmeyer-Peppas si se juzga por la baja correlación

coeficientes obtenidos. El hecho de que no siga un modelo de orden cero nos permite asegurar que la tasa de liberación de ITZ no es constante en el tiempo y que la relajación de las cadenas de polímeros no controla el proceso de liberación. Como no sigue un modelo cinético como Higuchi o Korsmeyer-Peppas, implica que se deben tener en cuenta los fenómenos de hinchamiento/contracción. La cinética de liberación se ajusta mejor a los modelos Ritger-Peppas y Peppas-Sahlin. Se especula que existe un mecanismo acoplado o una superposición de mecanismos aparentemente independientes como la difusión fickiana y el hinchamiento/relajación de la matriz polimérica. Es importante resaltar que la contribución del mecanismo de Fickian (K1) es mayor que la contribución del mecanismo de relajación de las cadenas poliméricas (K2), como lo indica el mayor valor de K1 en comparación con K2. El valor fue muy cercano pero superior a 0,5, lo que indica una difusión fickiana casi normal (Bruschi, 2015).

Las formulaciones de PLGA-TPGS-pH5 almacenadas a 4°C presentaron alta estabilidad física. Al disminuir la temperatura, la energía cinética y difusiva y la frecuencia de colisión entre las NP disminuyeron en consecuencia y, por lo tanto, la agregación de partículas fue menor. Similarmente, Figura 4C muestra las suspensiones en condiciones de cinética de liberación para ambos tipos de NP. Demostró alta estabilidad coloidal durante los 14 días de evaluación con variaciones de tamaño de partícula inferiores al 10 % de la RSD (gráfico superior), polidispersidad moderada (gráfico medio) y potencial negativo medio a alto (gráfico inferior). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el perfil cinético de liberación de ITZ tiene una baja contribución causada por la erosión/degradación hidrolítica de la matriz de PLGA.

Al evaluar las CIM con los diferentes tratamientos de ITZ libre y encapsulada en NPs de PLGA-TPGS-pH5, se pudo demostrar que la ITZ encapsulada conservó su actividad antifúngica frente al hongo requiriendo una concentración mayor de 0.061 µg/ml con respecto a 0.031 µg/ml de ITZ libre. Sin embargo, cuando se calculó la IC50 de ambos tratamientos, se evidenció que se necesitaba la misma cantidad de ITZ libre o encapsulada para obtener un 50% de control del hongo (Figura 4A). Estos resultados están relacionados con el tipo de liberación cinética que presentaron las NPs (Figura 3A), donde a las 72 h solo se liberó el 43% de la ITZ encapsulada. Por lo tanto, para inhibir el 100% del crecimiento fúngico sería necesaria una mayor concentración de ITZ encapsulada que la libre, pero la cantidad de ITZ liberada de las NP fue lo suficientemente alta como para inhibir el 50% del crecimiento fúngico. La concentración de ITZ en el ensayo con NP puede estar alcanzando el punto máximo de saturación, lo que dificulta la difusión de más ITZ desde el núcleo de las NP hidrofóbicas a la fase hidrofílica. Además, las NP vacías a mayor concentración (16 µg/ml) presentaron una acción inhibitoria contra el crecimiento fúngico, que no se relacionó con los componentes de las NP considerando los resultados de los controles, donde no mostraron inhibición alguna. Por lo tanto,

Los métodos para funcionalizar las NP tienen una fuerte influencia en el rendimiento de las NP con respecto a su especificidad para las células diana. Pueden influir en la cantidad y orientación de los ligandos acoplados a las NP, mejorando la captación de NP por parte de los macrófagos. Al comparar los métodos, observamos que el acoplamiento químico presentó un mayor grado de funcionalización que el

la adsorción física, siendo más reproducible y manteniendo la estabilidad de las NPs. Además, los resultados de Figura complementaria S6 muestran que las NP funcionalizadas por acoplamiento covalente y adsorción en presencia de FBS al 10 % tuvieron una disminución insignificante en la extensión del recubrimiento del anticuerpo, lo que indica un bajo enmascaramiento de los ligandos para ambas metodologías. Por el contrario, la presencia de 100% FBS, funcionalizado por acoplamiento covalente, provocó una disminución significativa en la extensión del recubrimiento del anticuerpo, lo que indica un enmascaramiento más eficaz con respecto a los modificados por adsorción. Sin embargo, este efecto puede estar relacionado con la mayor cantidad del ligando en las NPs con acoplamiento covalente que en las NPs recubiertas por adsorción, sugiriendo la formación de la corona proteica más extensa sobre las NPs como se reporta en la literatura. Tonigold et al., (2018).

Con respecto a la evaluación de la especificidad de las NP funcionalizadas, los resultados mostraron que las NP funcionalizadas con el anticuerpo F4/80 y manosa utilizando el método covalente aumentaron significativamente su endocitosis en macrófagos. Por lo tanto, demostramos que la funcionalización de NP podría aumentar el número de NP endocitadas, según el tipo de recubrimiento de (bio) molécula. En este sentido, es bien sabido que existen diferentes poblaciones de macrófagos, caracterizadas por su heterogeneidad, plasticidad y expresión de diversos receptores. Por ejemplo, los macrófagos pulmonares en ratones (macrófagos alveolares) tienen alta expresión de manosa y del receptor siglec-F y baja expresión del receptor F4/80 en comparación con los macrófagos peritoneales que presentan una expresión intermedia de F4/80, baja expresión de manosa, y sin expresión del receptor siglec-F (Gordon y Pluddemann, 2017). Además, algunos informes han demostrado que las NP funcionalizadas con manosa controlan la infección por leishmaniasis aumentando la distribución de las NP funcionales en los órganos seleccionados, como el hígado y el bazo, y disminuyendo la cantidad en la sangre periférica en comparación con las NP sin manosa. Astana et al., 2015; Barros et al., 2015). Este es el primer informe que muestra que la funcionalización de NP con anticuerpos F4/80 puede ayudar a mejorar la terapia dirigida a macrófagos y con una eficacia similar a la de las NP acopladas a manosa. Por lo tanto, las NP funcionalizadas con F4/80 abren la posibilidad de uso en terapias dirigidas a otras subpoblaciones de macrófagos que no presentan una alta expresión de manosa, es decir, los macrófagos peritoneales (Hussell y Bell, 2014). En general, las NP funcionalizadas son una plataforma tecnológica versátil que podría extenderse a un amplio espectro de aplicaciones para el tratamiento de enfermedades infecciosas intracelulares.

CONCLUSIÓN

Encapsulamos con éxito ITZ en NP tipo núcleo-capa basados en dos tipos de PLGA, obteniendo nanoportadores estables y moderadamente polidispersos con tamaño adecuado y DLC (6,6%) y EE (80%) óptimos al reducir el pH y al modular el tipo y concentración de una mezcla de tensioactivos. Mientras que los análisis FT-IR y DSC demostraron las interacciones ITZ-PLGA, FT-IR mostró la presencia de grupos terminales carboxílicos disponibles para reaccionar con los ligandos. El perfil de liberación de PLGA 75:25 y PLGA 50:50 NP encajaba bien con el modelo de difusión de Fickian. Las NPs mostraron estabilidad en agua a 4°C y bajo cinética de liberación

condiciones. ITZ encapsulado eliminado eficientemente. H. capsulatum, con un IC50 similar al de ITZ libre. El acoplamiento covalente para funcionalizar las NPs fue más eficiente que el método de adsorción, pero el enmascaramiento de corona proteica fue similar en ambos métodos. In vitro los ensayos mostraron que las NP funcionalizadas con F4/80 y manosa aumentaron la captación de NP por los macrófagos J774. Por lo tanto, los NP acoplados a F4/80 pueden ser una alternativa para marcar otras subpoblaciones de macrófagos. Debido a los múltiples mecanismos que presentan los patógenos que provocan infecciones intracelulares, el uso de NPs funcionalizadas permitiría un tratamiento mucho más específico de estas infecciones, reduciendo los efectos no deseados en los pacientes. En este contexto, la investigación actual sobre terapias dirigidas a macrófagos está dirigida a encontrar diferentes tipos de ligandos para la liberación dirigida de fármacos en subpoblaciones específicas de macrófagos.

DECLARACIÓN DE DISPONIBILIDAD DE DATOS

Las contribuciones originales presentadas en el estudio se incluyen en el artículo/Material suplementario; más consultas pueden dirigirse al autor de correspondencia.

CONTRIBUCIONES DE AUTOR

SM diseñó y realizó la mayoría de los experimentos. AS contribuyó al diseño experimental y realizó los experimentos con nanoportadores. VV hizo la funcionalización

REFERENCIAS

- Abushaheen, MA, Muzaheed Fatani, AJ, Fatani, M., Mansy, W. y George, M. (2020). Resistencia antimicrobiana, mecanismos y su significado clínico. *Enfermedad-al-mes* 66 (6), 100971. doi:10.1016/j.disamonth.2020.100971
- Agudelo, CA, Murillo, C., Tobón, AM, Restrepo, A., Restrepo, CA, Kauffman, CA, et al. (2012). Coinfección de tuberculosis e histoplasmosis en pacientes con sida. *Soc. J. Trop. Medicina. Hig.* 87, 1094–1098. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0292
- Alhowyan, AA, Altamimi, MA, Kalam, MA, Khan, AA, Badran, M., Binkhathlan, Z., et al. (2019). Eficacia antifúngica de las nanopartículas de PLGA cargadas con itraconazol estabilizadas con vitamina E TPGS: in vitro y ex vivo. *Estudios J. Microbiol. Métodos* 161, 87–95. doi:10.1016/j.mimet.2019.01.020
- Asthana, S., Gupta, PK, Jaiswal, AK, Dube, A. y Chourasia, MK (2015). Receptor de manosa de macrófagos sobreexpresado: Enfoque de entrega de carga mediada por nanocápsulas dirigidas para la erradicación del parásito residente: in vitro y in vivo. *Estudios Farmacia Res.* 32, 2663–2677. doi:10.1007/s11095-015-1651-0
- Barros, D., Costa Lima, SA y Cordeiro-da-Silva, A. (2015). Superficie La funcionalización de nanoesferas poliméricas modula la activación de macrófagos: relevancia en la terapia de leishmaniasis. *Nanomedicina* 10, 387–403. doi:10.2217/nmm.14.116
- Batrakova, EV y Kabanov, AV (2008). Copolímeros de bloque Pluronic: Evolución del concepto de administración de fármacos desde nanoportadores inertes hasta modificadores de respuesta biológica. *J. Liberación controlada* 130, 98–106. doi:10.1016/j.jconrel.2008.04.013
- Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., et al. (2020). Nanopartículas poliméricas para la administración de fármacos: desarrollos recientes y perspectivas futuras. *Nanomateriales* 10, 1403. doi:10.3390/nano10071403

experimentos SM escribió el primer borrador del manuscrito con contribuciones de AS y VV. JO consiguió la financiación, supervisó el trabajo y editó el manuscrito. Todos los autores participaron en las discusiones y leyeron y aceptaron publicar esta versión del manuscrito.

FONDOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el financiamiento de Minciencias (Proyecto 2213-777-57106), la Universidad de Antioquia y la Sociedad Max Planck a través del Convenio de Cooperación 566-1, 2014. Los autores agradecen a Ruta N y EPM por albergar el tándem.

EXPRESIONES DE GRATITUD

Agradecemos a la Prof. Luz Elena Cano, Ph.D. Tonny Naranjo, Ph.D. Diana Zarate y al Prof. Rogelio Hernandez Pando por sus consejos y discusiones. También agradecemos a la empresa Evonik por la donación de los polímeros utilizados en el estudio.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

El material complementario de este artículo se puede encontrar en línea en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.685391/full#supplementary-material>

- Bentz, KC y Savin, DA (2018). Nanocápsulas de Polímero Hueco: Síntesis, Propiedades y Aplicaciones. *polim. química* 9, 2059–2081. doi:10.1039/C8PY00142A
- Bian, X., Liang, S., John, J., Hsiao, CH, Wei, X., Liang, D., et al. (2013). Desarrollo de nanoesferas inyectables de itraconazol basadas en PLGA para liberación sostenida. *En t. J. Nanomedicina* 8, 4521–4531. doi:10.2147/IJN.S54040
- Biswara, LS, Garcia, MP, da Silva, JR, Escobar, P., Vera, A., Neira Fuentes, L. F., et al. (2019). Nanopartículas de PLGA encapsuladas con itraconazol recubiertas de manosa como candidatos potenciales contra la leishmaniasis. *J. Biomédica. Mate. Res.* 107, 680–687. doi:10.1002/jbm.b.34161
- Bruschi, ML (2015). Estrategias para modificar la liberación de fármacos desde la industria farmacéutica. *Sistemas. Cambridge: publicación de Woodhead.*
- Cáceres, DH, Tobón, Á. M. A. Á., Chiller, T., Gómez, BL y Gómez, BL (2018). El papel importante de las coinfecciones en pacientes con sida e histoplasmosis diseminada progresiva (HDP): una cohorte de Colombia. *Medicina. Mycol. Representante de caso* 19, 41–44. doi:10.1016/j.mmcr.2017.07.004
- Cáceres, DH, Zapata, JD, Granada, SD, Cano, LE y Naranjo, TW (2016). Estandarización y validación en Colombia de una metodología basada en HPLC para la determinación de la concentración sérica de posaconazol. *Revista Iberoamericana de Micología* 33, 230–236. doi:10.1016/j.riam.2015.09.002
- Carreto-Binaghi, LE, Morales-Villarreal, FR, García-de la Torre, G., Vite-Garín, T., Ramírez, J.-A., Aliouat, E.-M., et al. (2019). Coinfección por Histoplasma Capsulatum y Pneumocystis jirovecii en pacientes hospitalizados con VIH y sin VIH de un hospital de tercer nivel en México. *En t. J. infectar. Dis.* 86, 65–72. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.010
- Chen, W., Gu, B., Wang, H., Pan, J., Lu, W. y Hou, H. (2008). Desarrollo y Evaluación de nuevas nanopartículas intravenosas cargadas con itraconazol. *En t. J. Farmacéutica* 362, 133–140. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.039
- Colorado, D., Fernandez, M., Orozco, J., Lopera, Y., Muñoz, DL, Acín, S., et al. (2020). Actividad metabólica de extractos de antocianinas cargados en no iónicos

- Niosomas en ratones obesos inducidos por dieta. *Farmacia Res.* 37, 152. doi:10.1007/s11095-020-02883-z
- Duan, X. y Li, Y. (2013). Características fisicoquímicas de las nanopartículas Afecta la circulación, la biodistribución, la internalización celular y el tráfico. *Pequeña*, 1521–1532. doi:10.1002/pequeño.201201390
- Eleraky, NE, Allam, A., Hassan, SB y Omar, MM (2020). Nanomedicina Lucha contra la Resistencia Antibacteriana: Una Visión General de las Innovaciones Farmacéuticas Recientes. *Farmacia* 12, 142. doi:10.3390/farmacia12020142
- Endsley, AN y Ho, RJY (2012). Eficacia mejorada contra el VIH de indinavir después de la inclusión en nanopartículas lipídicas dirigidas a CD4. *J. Adquirir. Inmunodeficiencia Sindr.* 61, 417–424. doi:10.1097/QAI.0b013e3182653c1f
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M. y Axelsson, A. (2011). los Mecanismos de liberación de fármacos en sistemas de administración de fármacos basados en poli(ácido láctico-co-glicólico)-Una revisión. *En t. J. Farmacéutica* 415, 34–52. doi:10.1016/j.jipharm.2011.05.049
- George, A., Shah, PA y Shrivastav, PS (2019). biodegradables naturales Nanoformulaciones basadas en polímeros para la administración de fármacos: una revisión. *En t. J. Pharm.* 561, 244–264. doi:10.1016/j.jipharm.2019.03.011
- Ghotbi, Z., Haddadi, A., Hamdy, S., Hung, RW, Samuel, J. y Lavasanifar, A. (2011). Selección activa de células dendríticas con nanopartículas de PLGA decoradas con manano. *J. Blanco de la droga.* 19 (4), 281–292. doi:10.1186/s12915-017-0392-4
- Gordon, S. y Plüddemann, A. (2017). Macrófagos tisulares: heterogeneidad y Funciones. *BMC Biol.* 15, 53. doi:10.1186/s12915-017-0392-4
- Gupta, A., Eral, HB, Hatton, TA y Doyle, PS (2016). Nanoemulsiones: Formación, Propiedades y Aplicaciones. *materia blanda* 12, 2826–2841. doi:10.1039/c5sm02958a
- Hong, J.-Y., Kim, J.-K., Song, Y.-K., Park, J.-S. y Kim, C.-K. (2006). Un nuevo yo-Formulación emulsionante de itraconazol con disolución y absorción oral mejoradas. *J. Liberación controlada* 110, 332–338. doi:10.1016/j.jconrel.2005.10.002
- Hussell, T. y Bell, TJ (2014). Macrófagos alveolares: plasticidad en un tejido-Contexto específico. *Nat. Rev. Inmunol.* 14, 81–93. doi:10.1038/nri3600
- Jana, SS, Jana, SS, Eleraky, NE, Allam, A., Hassan, SB, Omar, MM, et al. (2019). Base de datos PubChem. Cloroquina, CID-2719. *En t. J. Pharm.* 10, 3–21. doi:10.1086/504492
- Kapoor, DN, Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G. y Dhawan, S. (2015). PLGA: un polímero único para la administración de fármacos. *El r. entrega*, 41–58. doi:10.4155/tde.14.91
- Karashima, M., Sano, N., Yamamoto, S., Arai, Y., Yamamoto, K., Amano, N., et al. (2017). Absorción pulmonar mejorada de itraconazol poco soluble mediante formulaciones de polvo seco de cocrystal micronizado. *EUR. J. Farmacéutica Biofarmacéutica* 115, 65–72. doi:10.1016/j.ejpb.2017.02.013
- Kim, J.-K., Park, J.-S. y Kim, C.-K. (2010). Desarrollo de un lípido binario Formulación de Nanopartículas de Itraconazol para Administración Parenteral y Liberación Controlada. *En t. J. Farmacéutica* 383, 209–215. doi:10.1016/j.jipharm.2009.09.008
- Lakkireddy, HR y Bazile, D. (2016). Construyendo el Diseño, Traducción y Principios de desarrollo de nanomedicinas poliméricas utilizando el caso de nanotecnología de poli(láctida-glicólido)-poli(etilenglicol) clínicamente avanzada como modelo: un punto de vista industrial. *Adv. Entrega de drogas Rvdo.* 107, 289–332. doi:10.1016/j.dirección.2016.08.012
- Li, D., van Nostrum, CF, Mastrobattista, E., Vermonden, T. y Hennink, WE (2017). Nanogels para la administración intracelular de productos bioterapéuticos. *J. Liberación controlada* 259, 16–28. doi:10.1016/j.jconrel.2016.12.020
- Lin, HH, Stacey, M., Stein-Streilein, J. y Gordon, S. (2010). “F4/80: El Adhesión específica de macrófagos: GPCR y su función en la inmunorregulación”, en *Adhesión- GPCR. Avances en Medicina Experimental y Biología.* Editores S. Yona y M. Stacey (Boston, MA: Springer), 706, 1049–1156. doi:10.1007/978-1-4419-7913-1_13
- Ling, X., Huang, Z., Wang, J., Xie, J., Feng, M., Chen, Y., et al. (2016). Desarrollo de una plataforma de nanopartículas poliméricas encapsuladas con itraconazol para una terapia antifúngica eficaz. *J. Mater. química B*, 1787–1796. doi:10.1039/c5tb02453f
- Mahmoudi, M., Bertrand, N., Zope, H. y Farokhzad, OC (2016). emergentes Comprensión de la corona de proteínas en las interfaces Nano-Bio. *nano hoy* 11, 817–832. doi:10.1016/j.nantod.2016.10.005
- Mejía, SP, Cano, LE, López, JA, Hernández, O. y González, Á. (2015). Los neutrófilos humanos producen trampas extracelulares contra *Paracoccidioides Brasiliensis*. *Microbiología* 161, 1008–1017. doi:10.1099/mic.0.000059
- Mena-Giraldo, P., Pérez-Buitrago, S., Londoño-Berrio, M., Ortiz-Trujillo, IC, Hoyos-Palacio, LM y Orozco, J. (2020). Nanoportadores fotosensibles para la entrega específica de carga en las células. *ciencia Reps.* 10, 2110. doi:10.1038/s41598-020-58865-z
- Mu, L. y Feng, S.-S. (2003a). Nanopartículas PLGA/TPGS para liberación controlada de Paclitaxel: Efectos del Emulsionante y Relación de Carga de Fármaco. *Farmacia Res.* 20, 1864–1872. doi:10.1023/b:pham.0000003387.15428.42
- Mu, L. y Feng, SS (2003b). Una nueva formulación de liberación controlada para el Medicamento contra el cáncer Paclitaxel (Taxol): nanopartículas de PLGA que contienen vitamina E TPGS. *J. Liberación controlada* 86, 33–48. doi:10.1016/s0168-3659(02)00320-6
- Oliveira, JP, Prado, AR, Keijok, WJ, Antunes, PWP, Yapuchura, ER, y Guimarães, MCC (2019). Impacto de las estrategias de conjugación para el direccionamiento de anticuerpos en nanopartículas de oro para la detección ultrasensible de 17 β -estradiol. *ciencia Reps.* 9, 13859. doi:10.1038/s41598-019-50424-5
- Prentice, AG y Glasmacher, A. (2005). Dar sentido al itraconazol Farmacocinética. *J. Antimicrobiano. Quimioterapia.* 56, i17–i22. doi:10.1093/jac/dki220
- Sánchez, A., Mejía, SP y Orozco, J. (2020). Avances recientes en polímeros Fármacos encapsulados en nanopartículas contra infecciones intracelulares. *Moléculas* 25, 3760. doi:10.3390/moleculas25163760
- Sharma, S., Parmar, A., Kori, S. y Sandhir, R. (2016). basado en PLGA Nanopartículas: Un Nuevo Paradigma en Aplicaciones Biomédicas. *Trac Tendencias Anal. química* 80, 30–40. doi:10.1016/j.trac.2015.06.014
- Tonigold, M., Simon, J., Estupiñán, D., Kokkinopoulou, M., Reinholz, J., Kintzel, U., et al. (2018). La preadsorción de anticuerpos permite la orientación de nanoportadores a pesar de una corona biomolecular. *Nat. Nanotecnología* 13, 862–869. doi:10.1038/s41565-018-0171-6
- Varga, N., Hornok, V., Janovák, L., Dékány, I. y Csapó, E. (2019). El efecto de Condiciones de síntesis e hidrofiliidad ajustable en la capacidad de encapsulación de fármacos de nanopartículas de PLA y PLGA. *Surf de coloides. B: Biointerfaces* 176, 212–218. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.01.012
- Wan, KY, Wong, KW, Chow, AHL y Chow, SF (2018). Impacto de Reordenamiento molecular de estabilizadores anfífilos sobre la estabilidad física de nanopartículas de itraconazol preparadas por nanoprecipitación flash. *En t. J. Pharm.* 542 (1–2), 221–231. doi:10.1016/j.jipharm.2018.03.006
- Wang, C., Yan, Q., Liu, H.-B., Zhou, X.-H. y Xiao, S.-J. (2011). Diferentes EDC/NHS Mecanismos de activación entre cepillos de PAA y PMAA y las siguientes reacciones de amidación. *Langmuir* 27, 12058–12068. doi:10.1021/la202267p
- Wang, R., Hughes, T., Beck, S., Vakil, S., Li, S., Pantano, P., et al. (2012). Generación de productos de degradación tóxicos por sonicación de dispersantes plurónicos: implicaciones para las pruebas de nanotoxicidad. *Nanotoxicología* 7, 1272–1281. doi:10.3109/17435390.2012.736547
- Wilkosz, N., Łazarski, G., Kovacic, L., Gargas, P., Nowakowska, M., Jamróz, D., et al. (2018). Información molecular sobre la capacidad de carga de fármacos de las nanopartículas de PEG-PLGA para itraconazol. *J. física. química B* 122, 7080–7090. doi:10.1021/acs.jpcc.8b03742
- Wooster, TJ, Golding, M. y Sanguansri, P. (2008). Impacto del tipo de aceite en Formación de nanoemulsiones y estabilidad de maduración de Ostwald. *Langmuir* 24, 12758–12765. doi:10.1021/la801685v
- Yi, Y., Yoon, HJ, Kim, BO, Shim, M., Kim, S.-O., Hwang, S.-J., et al. (2007). A Formulación Micelar Polimérica Mixta de Itraconazol: Características, Toxicidad y Farmacocinética. *J. Liberación controlada* 117, 59–67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.10.001

Conflicto de intereses: Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.

Copyright © 2021 Mejía, Sánchez, Vásquez y Orozco. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de Creative Commons Attribution License (CC BY). Se permite el uso, distribución o reproducción en otros foros, siempre que se acredite al autor o autores originales y a los propietarios de los derechos de autor y se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada. No se permite ningún uso, distribución o reproducción que no cumpla con estos términos.