



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*



**BIOTECNOLOGÍA**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

# **NANOARCILLAS FUNCIONALIZADAS CON ANTIFÚNGICOS CONTRA EL EUMICETOMA.**

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Autor:** Óscar Hernández Espinosa.

**Tutora:** Consuelo Ferrer Rodríguez.

**Cotutora:** M<sup>a</sup> Francisca Colom Valiente.

**Modalidad:** Experimental.

**Departamento de producción vegetal y microbiología.**

**Curso académico 2024-2025.**

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	2
1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE. ....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. ....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Agentes infecciosos.....	10
4.2 Fármacos empleados.....	11
4.3 Formulaciones de antifúngico en Nanotransportadores.....	11
4.4 Ensayos <i>in vitro</i> .....	13
4.4.1. Medio de cultivo.....	13
4.4.2 Procedimiento para ensayos <i>In vitro</i> .....	13
4.5 Ensayos <i>In vivo</i> .....	15
4.5.1 Modelo experimental. ....	15
4.5.2 Procedimiento.....	16
4.5.3 Agentes infecciosos y preparación del inóculo.....	17
4.5.4 Método de infección. ....	17
4.5.5 Administración del fármaco.....	18
5. RESULTADOS .....	19
5.1 Resultados ensayos <i>in vitro</i> .....	19
5.2 Resultados de ensayos <i>in vivo</i> .....	24
6. DISCUSIÓN.....	30
7. CONCLUSIONES.....	32
8. PROYECCIÓN FUTURA .....	33
9. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## 1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.

El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a la piel y al tejido celular subcutáneo, provocando una grave discapacidad. En el año 2016, fue reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una Enfermedad Tropical Desatendida (ETD) debido a su alta prevalencia en regiones empobrecidas y las dificultades asociadas a su diagnóstico y tratamiento. Su abordaje terapéutico es complejo, ya que los antifúngicos convencionales presentan baja penetración en los tejidos afectados y requieren tratamientos prolongados y monitorización que no se pueden permitir los servicios sanitarios de las zonas donde se da esta patología.

En este trabajo se evalúa la eficacia antifúngica de formulaciones híbridas basadas en nanotransportadores funcionalizados con Anfotericina B y/o itraconazol frente a hongos causantes de eumicetoma. Las formulaciones se ensayaron tanto en medio semisólido como en un modelo *in vivo* con *Galleria mellonella*. Los ensayos *in vitro* mostraron una actividad destacada de los productos funcionalizados con itraconazol. Los ensayos *in vivo* no han sido totalmente concluyentes, aunque refuerzan el potencial de los nanotransportadores como sistema de liberación antifúngica prolongada y localizada frente a los patógenos de difícil tratamiento.

Palabras clave: Eumicetoma, antifúngicos, nanotransportadores, *Galleria mellonella*, arcillas funcionalizadas, sistema de liberación controlada.

### **ABSTRACT:**

Mycetoma is a chronic infectious disease that affects the skin and subcutaneous cellular tissue, causing severe disability. In 2016, it was recognized by the World Health Organization (WHO) as a Neglected Tropical Disease (NTD) due to its high prevalence in impoverished regions and the difficulties associated with its diagnosis and treatment. Its therapeutic approach is complex, since conventional antifungal drugs have low penetration in the affected tissues and require prolonged treatments and monitoring that cannot be afforded by the health services of the affected areas.

This work evaluates the antifungal efficacy of hybrid formulations based on nanocarriers functionalized with amphotericin B or itraconazole against fungi causing eumycetoma. The formulations were tested both in semi-solid medium and in an *in vivo* model using *Galleria mellonella*. In vitro assays showed outstanding activity of the itraconazole-functionalized products, while *in vivo* assays have not been entirely conclusive, although they enhance the potential of nanocarriers as a prolonged and localized antifungal delivery system against difficult-to-treat pathogens.

Key words: Eumycetoma, antifungals, nanocarriers, *Galleria mellonella*, functionalized clays, controlled release system.

## 2. INTRODUCCIÓN.

El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que avanza progresivamente afectando tanto a la piel, como al tejido subcutáneo, el hueso y los vasos linfáticos. Lo que provoca deformidades notables, deterioro y destrucción tisular del miembro afectado, resultando mortal en ciertos casos (OMS, *Micetoma*, s. f.). A nivel mundial, la mayor parte de los casos de micetoma se dan en países ubicados en zonas tropicales o subtropicales como Venezuela, México, India o Sudán entre otros, en lo que se conoce como el "cinturón del micetoma" (Figura 1). Puede ser causado por diferentes especies de hongos y bacterias que se encuentran de forma habitual en el suelo y en la materia vegetal en descomposición. Dependiendo de la naturaleza del agente causal, se diferenciará entre actinomicetoma (bacterias) o eumycetoma (hongos).



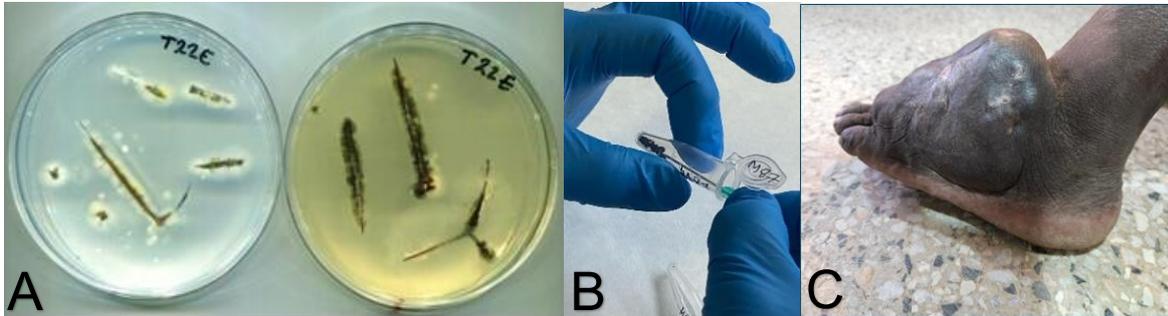
**Figura 1:** Representación del "Cinturón del micetoma" (adaptado de Abdelrahman et al., 2019)

Desde el 2016, el micetoma fue declarado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una Enfermedad Tropical Desatendida (ETD) con el objetivo de visibilizar las graves consecuencias socioeconómicas y de salud pública que supone esta enfermedad tanto para las sociedades rurales empobrecidas, como para el servicio sanitario de las zonas afectadas. Así como para hacer un llamamiento a la comunidad internacional con el fin de reforzar su atención e investigación.

Las ETD son un grupo heterogéneo de aproximadamente 20 enfermedades especialmente prevalentes en áreas tropicales y entre cuyos causantes se encuentran virus, toxinas, hongos, bacterias y parásitos. A nivel mundial, afectan a más de mil millones de personas en comunidades empobrecidas donde tienen mayor incidencia, áreas afectadas por conflictos y regiones de difícil acceso, donde el acceso al agua potable y servicios de saneamiento resulta muy limitado. Sumado a esto, la desnutrición que suele afectar a estas comunidades empeora el desarrollo de las enfermedades, y la falta de concienciación sobre los riesgos imposibilita una correcta prevención (OMS: *Enfermedades tropicales desatendidas*, s. f.).

En el caso del eumicetoma, los principales causantes de esta infección son los hongos *Madurella mycetomatis*, *Trematosphaeria grisea* y *Scedosporium apiospermum*, pero existen más de 40 especies de hongos ya descritos que pueden provocarla (Chandler et al., 2023; Welsh et al., 2014). Generalmente, el hongo presente en el suelo (Figura 2A) se introduce en el tejido subcutáneo por un pequeño traumatismo, ocurriendo de forma más habitual en el pie al estar normalmente desprotegido y en contacto con el terreno, pero también puede afectar a otras partes del cuerpo. Una vez inoculado, el hongo y la respuesta defensiva del hospedador inducen la formación de estructuras características en forma de “granos” de color negro, grisáceo, amarillentos o blancos dependiendo del agente causante (Figura 2B). La lesión suele comenzar como un pequeño nódulo que crece de forma indolora hasta convertirse en una gran masa subcutánea (Figura 2C) con sinuosidades o trayectos fistulosos por los que se segregan pus, sangre y los característicos granos del hongo (Ahmed et al., 2004). Por ello, al tratarse de una enfermedad que avanza de forma indolora, y sumada la escasez tanto de educación sanitaria como de instalaciones de salud

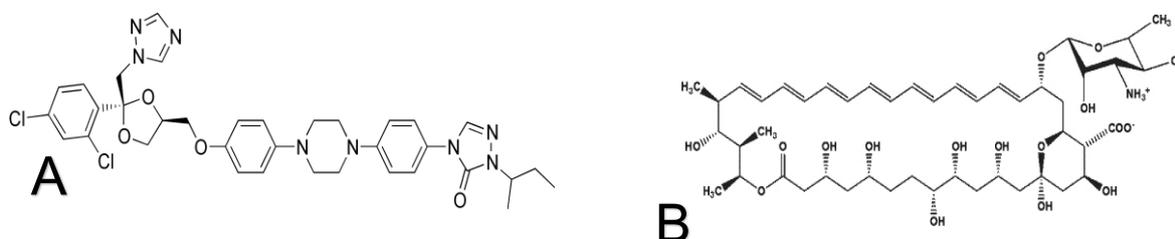
en las áreas endémicas, es frecuente encontrar casos de pacientes que no reciben atención médica hasta que la infección se encuentra en una etapa crónica muy avanzada y de difícil tratamiento.



**Figura 2:** A) Crecimiento fúngico a partir de púas de acacia cultivadas en medio Sabouraud y PDA. B) Granos negros obtenidos de un eumicetoma. C) Micetoma en el pie izquierdo en un paciente de Turkana

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, este dependerá de la naturaleza del agente causal. El actinomicetoma (infección bacteriana) puede tratarse de forma efectiva y ser controlado gracias al uso de antibióticos. Para el eumicetoma sin embargo es necesaria la administración prolongada de fármacos antimicóticos en combinación con escisión quirúrgica. Aunque incluso con este abordaje, las tasas de curación no superan el 26% según estudios realizados por el *Mycetoma Research Centre* de la Universidad de Jartum (Sudán), llegando a requerir la amputación del miembro afectado con frecuencia (CDC, 2024; Zein et al., 2012). Esta baja eficacia se debe a diversos factores como que no todos los antifúngicos tienen la misma actividad contra las distintas variedades de hongos que causan el eumicetoma y que además, al tratarse de una infección crónica, el tejido afectado desarrolla un alto grado de fibrosis que dificulta un acceso adecuado de los fármacos (Chandler et al., 2023). Entre los antifúngicos más utilizados, los azoles como el itraconazol (Figura 3A) han demostrado una buena eficacia (Ahmed et al., 2004; Chandler et al., 2023). Sin embargo, su espectro antifúngico restringido, su elevado coste y la falta de disponibilidad en algunos países, limita su uso para los pacientes de regiones de bajos recursos económicos (Ahmed et al., 2004). Otro fármaco efectivo es la anfotericina B (AmB) (Figura 3B), un polieno que a pesar de su efecto antifúngico de amplio espectro y de la baja incidencia de resistencias clínicas, no se ha utilizado ampliamente en el tratamiento del eumicetoma debido a que su administración por vía intravenosa

requiere de monitorización durante un periodo prolongado a causa de su toxicidad que acarrea pronunciados efectos secundarios (sobre todo nefrotoxicidad) (Welsh et al., 2014). Sin embargo, cada vez son más comunes los estudios sobre el uso tópico de la AmB, que buscan reducir la incidencia de dichos efectos adversos (Cui & Zhao, 2024; Kuiper & Ruijgrok, 2009).

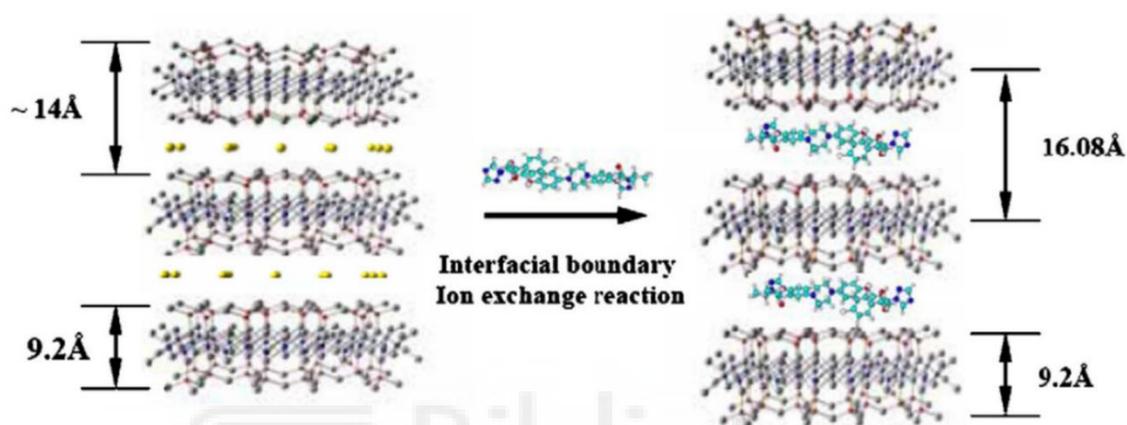


**Figura 3:** Representación de las moléculas de los antifúngicos **A)** Itraconazol y **B)** Anfotericina B

Entre las múltiples estrategias para la administración de fármacos, los sistemas de liberación controlada han cobrado gran relevancia por su capacidad de mantener niveles terapéuticos durante períodos prolongados, reduciendo así la necesidad de múltiples dosis (Park et al., 2022). En el ámbito de las infecciones fúngicas, se han empleado diversos nanotransportadores como nanopartículas metálicas, lipídicas o poliméricas para mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y localización del tratamiento antifúngico (Du et al., 2021; Roque et al., 2017; Wang et al., 2021).

Dentro de estos, los minerales de arcilla han despertado un creciente interés debido a su baja toxicidad, bajo coste, abundancia natural, alta dispersabilidad en agua y su capacidad para intercambiar iones (Aguzzi et al., 2007; Ruiz-Hitzky et al., 2019). Por ello, se han utilizado como excipientes farmacéuticos y, más recientemente, como nanotransportadores activos. Las esmectitas como la montmorillonita (Jayrajsinh et al., 2017) y arcillas sintéticas como Laponita® (Tomás et al., 2018) destacan por su eficacia como sistemas de carga y liberación. Por otra parte, los hidróxidos dobles laminares (HDL), generalmente formados por capas de magnesio y aluminio, ofrecen propiedades similares con la particularidad de actuar como cambiadores aniónicos, facilitando la encapsulación de fármacos cargados negativamente (Nabipour & Hu, 2022; León-Vallejo et al., 2019).

Pese al creciente estudio de los nanotransportadores, su aplicación como sistemas de liberación antifúngica tópica sigue siendo limitada. Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado resultados ciertamente prometedores, como la intercalación de itraconazol en Laponita (Figura 4) (Jung et al., 2008) o de anfotericina B en HDL de Mg-Al (Li et al., 2023), abriendo nuevas posibilidades para el tratamiento localizado de infecciones difíciles.



**Figura 4:** Intercalación de itraconazol en Laponita (adaptado de Jung et al., 2008)

Cabe destacar que un trabajo especialmente relevante en el contexto del eumicetoma propuso el uso de semiesferas absorbibles de sulfato cálcico cargadas con AmB, implantadas directamente en la zona infectada, logrando evitar la amputación del miembro afectado (Lalchandani et al., 2020). Este tipo de aproximaciones refuerzan la necesidad de desarrollar tratamientos localizados que permitan una acción más directa y efectiva en tejidos infectados de difícil acceso.

Por ello, debido a las limitaciones terapéuticas actuales, surgen nuevas líneas de investigación centradas en el uso de nanotransportadores como herramienta para mejorar la administración prolongada y local de antifúngicos. Este trabajo se enmarca en ese contexto, evaluando distintas formulaciones híbridas basadas en nanoarcillas funcionalizadas con itraconazol o anfotericina B frente a hongos causantes de eumicetoma, tanto en ensayos *in vitro* como en un modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*.

### 3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

#### ANTECEDENTES:

La asociación de medicina humanitaria “Cirugía en Turkana” (CeT), fundada en 2004 por un grupo de cirujanos de hospitales de Madrid, se planteó como objetivo la atención quirúrgica a la población del condado de Turkana (Kenia). Entre las campañas de 2013 y 2018, se atendieron un total de 86 pacientes diagnosticados con micetoma, lo que supuso aproximadamente un 3% de los casos tratados por la ONG en ese periodo. En un 10% de dichos casos fue necesaria la amputación del miembro afectado debido al estado avanzado de la infección. (Cirugía en Turkana)

Como respuesta a la incidencia observada, en 2019 se inició el “Proyecto Micetoma en Turkana”, en colaboración con el equipo de Micología Médica de la Universidad Miguel Hernández (UMH). Desde entonces, se han desarrollado estrategias para evaluar la distribución e incidencia de la enfermedad, identificar los pacientes más afectados, y estudiar tanto los microorganismos más prevalentes como sus nichos ecológicos en el entorno. Por lo tanto, a raíz de esta colaboración, se han realizado diversos trabajos centrados en la identificación de los agentes etiológicos del micetoma en pacientes, así como en el análisis de muestras ambientales para detectar la presencia de estos hongos patógenos en el suelo y sustratos vegetales. Además, desde 2023 se ha iniciado una colaboración con el Instituto de Ciencia de los Materiales de Madrid (ICMM-CSIC), para el desarrollo de alternativas terapéuticas basadas en el uso de nanocompuestos con antifúngicos.

En concreto, el presente trabajo se enmarca en el proyecto de investigación “Hidrogeles nanocompuestos con actividad antifúngica como alternativa terapéutica para el eumicetoma”, Los resultados preliminares realizados *in vitro* fueron prometedores y me han permitido continuar con el trabajo experimental tanto *in vitro* como *in vivo* para la realización de este TFG.

Con base en estos antecedentes y siguiendo la línea de trabajo ya establecida, el presente proyecto se orienta a evaluar de manera experimental la eficacia de nuevas formulaciones antifúngicas en un modelo que reproduzca con mayor fidelidad las condiciones del eumicetoma.

## HIPÓTESIS.

La administración tópica de antifúngicos mediante su encapsulación en nanoarcillas podría mejorar la eficacia terapéutica frente al eumicetoma, al permitir una liberación controlada del fármaco en el foco de infección y mejorar su biodisponibilidad en el tejido afectado.

## OBJETIVOS.

### Primario:

- Desarrollar y evaluar un tratamiento tópico más eficaz contra el eumicetoma mediante el uso de nanoarcillas funcionalizadas con antifúngicos.

### Secundarios:

- Realizar ensayos *in vitro* para determinar la actividad antifúngica de diferentes formulaciones híbridas nanotransportador–antifúngico frente a especies fúngicas aisladas de pacientes con eumicetoma.
- Evaluar la eficacia terapéutica de las construcciones que hayan mostrado mayor actividad *in vitro* mediante ensayos *in vivo* empleando el modelo larvario de *Galleria mellonella*.
- Analizar la biocompatibilidad y toxicidad de los nanotransportadores en ausencia de principio activo.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Agentes infecciosos.

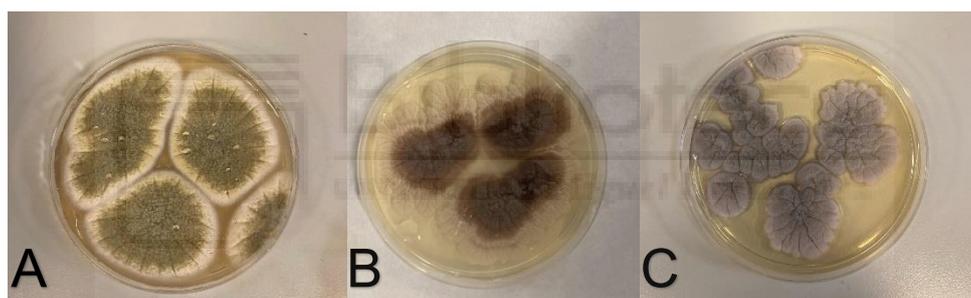
Entre las diversas especies fúngicas causantes del eumicetoma, se ensayó con tres hongos aislados a partir de muestras provenientes de pacientes de Turkana (Kenia) gracias a la colaboración de la Universidad Miguel Hernández con la ONG “Cirugía en Turkana”. Entre ellos encontramos:

***Aspergillus flavus***: es un hongo filamentoso saprofita de distribución cosmopolita, comúnmente encontrado en suelos y materia orgánica en descomposición, existen publicaciones que lo identifican como agente causal de eumicetoma, una forma crónica de infección subcutánea. (Kamali Sarvestani et al., 2022)

***Chaetomium atrobrunneum***: se trata de un hongo filamentoso melanizado que se encuentra comúnmente en suelos ricos en materia orgánica en descomposición. Este hongo ha sido identificado como agente causal de eumicetoma de grano negro en humanos (Mhmoud et al., 2019).

***Subramaniula thielavioides***: es un hongo melanizado y saprófito común en los suelos ricos en residuos vegetales. Aunque su patogenicidad en humanos aún no está tan documentada, recientemente *S. thielavioides* ha sido propuesto como un nuevo agente etiológico de eumicetoma, especialmente en regiones endémicas como el condado de Turkana, Kenia. Su identificación se ha logrado mediante técnicas moleculares avanzadas (Colom et al., 2023).

La selección de estas tres especies permite evaluar la eficacia antifúngica de los nanotransportadores frente a hongos de diferente naturaleza taxonómica y ecológica, incluyendo especies melanizadas, productoras de micelio compacto.



**Figura 6:** Crecimiento *in vitro* en Agar de Sabouraud de las tres especies fúngicas causantes de eumicetoma utilizadas en el estudio. **A)** *A. flavus*. **B)** *C. atrobrunneum*. **C)** *S. thielavioides*

#### 4.2 Fármacos empleados.

Para el diseño de los sistemas híbridos nanotransportador–antifúngico se seleccionaron dos compuestos conocidos por su eficacia frente a los agentes causales del eumicetoma: anfotericina B (AmB) e itraconazol (ITZ). Ambos fármacos han sido evaluados previamente en estudios *in vitro* e *in vivo*, mostrando actividad antifúngica significativa frente a especies como *Madurella mycetomatis*, *Aspergillus flavus* y otros hongos melanizados. (Ahmed et al., 2004)

#### 4.3 Formulaciones de antifúngico en Nanotransportadores.

En este estudio se emplearon tres tipos de arcillas (naturales y sintéticas) y dos hidróxidos dobles laminares (HDLs) como sistemas nanotransportadores para la

administración de fármacos antifúngicos. Todos los nanomateriales fueron sintetizados en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC) y posteriormente enviados al laboratorio de Micología Médica de la Universidad Miguel Hernández (UMH) para su aplicación experimental.

Entre los materiales empleados se encuentran las arcillas naturales y sintéticas, cuya eficacia como sistemas de liberación controlada ha sido ampliamente documentada (Ruiz-Hitzky et al., 2019; Jung et al., 2008; Li et al., 2023). Cada uno de estos nanomateriales fue funcionalizado con uno de los dos antifúngicos seleccionados anfotericina B (AmB) o itraconazol (ITZ) en función de su compatibilidad química y su historial de uso en formulaciones farmacéuticas.

Las formulaciones empleadas fueron las siguientes:

- **Sepiolita:** funcionalizada con AmB, tanto en su forma pura como combinada con fosfocolina (PC), una molécula utilizada para modificar la afinidad superficial y potencialmente mejorar la interacción con el tejido diana.
- **Montmorillonita (Mmt):** utilizada como soporte para ambos antifúngicos, AmB e ITZ, debido a su alta capacidad de intercambio catiónico y su compatibilidad con moléculas hidrofóbicas.
- **Laponita:** una arcilla sintética empleada exclusivamente con itraconazol, seleccionada por su alta dispersabilidad en medio acuoso y biocompatibilidad. Su eficacia como nanotransportador de ITZ ha sido previamente descrita en la literatura (Jung et al., 2008).
- **Hidróxidos dobles laminares (HDL)** de magnesio-aluminio (MgAl) y zinc-aluminio (ZnAl): ambos fueron intercalados con AmB. La incorporación del catión  $Zn^{2+}$  en el HDL se exploró por su posible efecto antimicrobiano añadido y su contribución a la estabilidad estructural del sistema (Li et al., 2023).

Estas formulaciones híbridas se evaluaron tanto por su capacidad de inhibición del crecimiento fúngico como por su potencial para una liberación sostenida del fármaco, contribuyendo así al desarrollo de tratamientos tópicos localizados más eficaces frente al eumicetoma.

#### **4.4 Ensayos *in vitro*.**

##### **4.4.1. Medio de cultivo.**

El medio de cultivo utilizado para los ensayos *in vitro* fue BHI (*Brain Heart Infusion*), ampliamente empleado en microbiología por su capacidad para favorecer el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluidos hongos exigentes. Su composición incluye infusiones de cerebro y corazón de ternera, hidrolizado de caseína, glucosa y sales minerales, lo que proporciona un entorno nutritivo completo.

Con el objetivo de imitar de una forma más realista el tejido subcutáneo afectado por el eumicetoma, se incorporó un 1,5% de agar, generando una textura semisólida que permite una distribución más fisiológica del hongo y del tratamiento antifúngico. Esta estrategia proporciona un modelo más representativo de las condiciones *in vivo*.

##### **4.4.2 Procedimiento para ensayos *In vitro*.**

Una etapa crítica en el desarrollo del ensayo *in vitro* fue la estandarización de la concentración del inóculo fúngico. Para ello, se realizó un pequeño estudio previo en el que se generaron distintas concentraciones de los hongos mediante diluciones seriadas, cuya densidad óptica se midió con un densitómetro, permitiendo así ajustar la concentración celular según la escala MacFarland para cada especie ensayada.

Las concentraciones finales utilizadas fueron:

***Chaetomium atrobrunneum* y *Subramaniula thielavioides*:** índice McFarland de 0,9–1, correspondiente a aproximadamente  $10^6$  células/mL.

***Aspergillus flavus*:** índice McFarland de 0,523, equivalente a  $10^5$  células/mL.

El inóculo fúngico se mezcló con el medio BHI semisólido a unos 60°C en una proporción de 1 mL de inóculo por cada 8 mL de medio. Tras una homogenización adecuada, se distribuyeron 9 mL de la mezcla en placas de cultivo estériles de 4 cm de diámetro, donde se dejó gelificar.

Una vez solidificado el medio semisólido, se añadieron 5  $\mu$ L de cada formulación híbrida nanotransportador–antifúngico directamente sobre la superficie de la

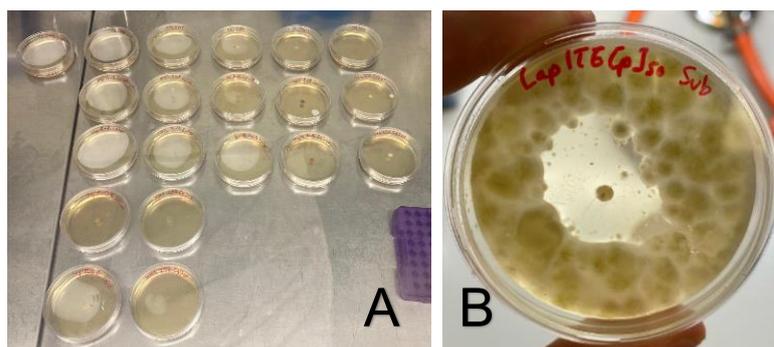
placa. Para evaluar el efecto dosis-dependiente, se aplicaron los nanocompuestos tanto en la concentración terapéutica a testar (100%) (Tabla 1) como con una dilución al 50%, esta última obtenida mezclando 2,5  $\mu\text{L}$  del producto con 2,5  $\mu\text{L}$  de agua estéril (Figura 7A).

**Tabla 1:** Concentraciones máximas de antifúngico in vitro

Sep-AmB	0,027 mg/ $\mu\text{L}$
Sep-PC-AmB	0,059 mg/ $\mu\text{L}$
Mmt-AmB	0,072 mg/ $\mu\text{L}$
Mmt-ITZ	0,034 mg/ $\mu\text{L}$
ZnAl-AmB	0,103 mg/ $\mu\text{L}$
MgAl-AmB	0,456 mg/ $\mu\text{L}$
Lap-ITZ	0,024 mg/ $\mu\text{L}$

**Controles:** Se utilizaron placas de medio igualmente inoculadas, a las que se añadió el nanotransportador en ausencia de antifúngico.

Las placas fueron incubadas a 37 °C y revisadas cada 1 o 2 días durante siete días. Al finalizar el periodo de incubación, se evaluó el crecimiento fúngico y la formación de halos de inhibición alrededor del punto de aplicación del tratamiento (Figura 7B). La inhibición se midió radialmente en milímetros, valorando tanto la magnitud como la persistencia del efecto antifúngico.



**Figura 7:** Experimentos de eficacia in vitro en medio semisólido. **A)** Experimento a tiempo 0. **B)** Inhibición de Lap-itz [50%] frente a *S. thielavioides* tras 7 días.

## 4.5 Ensayos *In vivo*

### 4.5.1 Modelo experimental.

El modelo de *Galleria mellonella* es comúnmente utilizado en investigaciones sobre enfermedades infecciosas debido a varias características que resultan de gran utilidad. Este invertebrado posee un sistema inmune innato que comparte similitudes funcionales con el de los mamíferos, incluyendo mecanismos de fagocitosis, producción de péptidos antimicrobianos y activación de rutas oxidativas. Esto permite modelar la respuesta inmunitaria frente a infecciones fúngicas de manera representativa. Además, *G. mellonella* tolera temperaturas de 37 °C, lo que facilita ensayos en condiciones cercanas a las fisiológicas humanas.

Su manipulación es sencilla y económica, permitiendo trabajar con una cantidad grande de ejemplares sin necesidad de instalaciones especializadas. Además, su uso se alinea y promueve el principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) en experimentación animal, aportando un enfoque ético en investigación biomédica (Kloezen et al., 2015).

En el contexto del eumicetoma, los agentes etiológicos forman estructuras granulares compactas denominadas “granos”, difíciles de replicar en ensayos *in vitro*. Por ello, varios estudios han señalado a *G. mellonella* como un modelo alternativo útil para reproducir estas formaciones *in vivo*, permitiendo evaluar tanto la patogenicidad del hongo como la eficacia de tratamientos antifúngicos en un entorno más realista (Serrano et al., 2023).



**Figura 8:** Larvas de *G. mellonella* en la última fase del estadio larval

#### 4.5.2 Procedimiento.

Para cada una de las tres especies fúngicas seleccionadas (*A. flavus*, *C. atrobrunneum* y *S. thielavioides*), se utilizaron 100 larvas de *G. mellonella*, divididas en cuatro grupos de 25 individuos según el inóculo inicial: Se usaron 3 concentraciones de propágulos fúngicos ( $10^3$ ,  $10^4$  o  $10^5$ ) y a un grupo se le administró suero salino (grupo control).

Cada grupo fue a su vez subdividido en subgrupos de 5 larvas, que recibieron distintos tratamientos, incluyendo las formulaciones híbridas o suero fisiológico, permitiendo así evaluar múltiples condiciones experimentales frente a cada especie (Tabla 2).

Tabla 2: Organización del ensayo in vivo

LARVAS	INÓCULO	ANTIFÚNGICO				CONTROL
		ZnAl-AMB	MgAl-AMB	LP-ITZ	MMT- ITZ	SSF
25 uds	$10^3$ cels/mL	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds
25 uds	$10^4$ cels/mL	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds
25 uds	$10^5$ cels/mL	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds
25 uds	SSF	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds	5 Uds

Por otro lado, se realizó un ensayo de toxicidad independiente administrando únicamente los nanotransportadores, sin principio activo, con el objetivo de valorar su biocompatibilidad y descartar efectos adversos de los mismos.

Aunque *G. mellonella* ha sido previamente utilizada para modelar la formación de granos de eumicetoma, existen muy pocos estudios que hayan explorado su uso para evaluar tratamientos antifúngicos frente a esta patología. Aún más limitada es la evidencia experimental con nanomateriales funcionalizados, lo que posiciona este trabajo como una contribución innovadora en el desarrollo de estrategias terapéuticas tópicas o localizadas para el tratamiento del eumicetoma.

La variable principal evaluada fue la supervivencia de los individuos a lo largo del tiempo, registrando diariamente la viabilidad de cada larva hasta el final del experimento. Los resultados se representaron en gráficas de supervivencia de

Kaplan Meier, que permiten comparar la eficacia de cada formulación frente a su correspondiente grupo control. Además, el diseño experimental fue adaptado a partir de estudios previos sobre infecciones fúngicas en *G. mellonella*, ajustándolo específicamente a la fisiopatología del eumicetoma (Serrano et al., 2023; Klozenz et al., 2015).

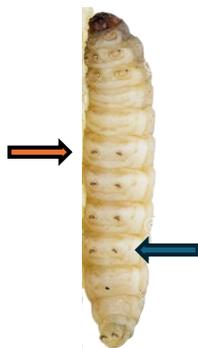
#### **4.5.3 Agentes infecciosos y preparación del inóculo.**

Se utilizaron las mismas especies fúngicas que en los ensayos *in vitro*: ***A. flavus***, ***C. atrobrunneum*** y ***S. thielavioides***,

La preparación del inóculo se realizó del mismo modo que en los ensayos *in vitro*. Obteniendo los inóculos:  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  células/mL. Estas concentraciones se evaluaron en paralelo en el experimento, con el objetivo de analizar el impacto del inóculo en la progresión de la infección y establecer cuál de ellas podría ser la más adecuada para futuros estudios.

#### **4.5.4 Método de infección.**

La infección de las larvas de *Galleria mellonella* se realizó mediante microinyección utilizando agujas de insulina, tras la inmovilización del animal. A cada larva se le administró un volumen constante de entre 20 y 40  $\mu$ L del inóculo correspondiente, independientemente de la concentración celular ( $10^3$ ,  $10^4$  o  $10^5$  células/mL), aplicando la inyección en la última pata izquierda (Figura 9). En el caso de los controles negativos, se inyectó suero fisiológico en las mismas condiciones de volumen y localización anatómica.



**Figura 9:** Localización de las zonas de inyección en *G. mellonella*. Flecha naranja: administración del fármaco. Flecha azul: inyección del inóculo fúngico

Tras la inoculación, se dejó transcurrir un periodo de entre 24 y 48 horas antes de administrar el tratamiento antifúngico, con el fin de permitir el desarrollo progresivo de la infección y replicar una fase temprana del micetoma. Esta

espera permitió observar en muchas de las larvas manchas negras características lo largo del cuerpo, indicativas del proceso de melanización, una respuesta inmunitaria propia de *G. mellonella*. Esta reacción, mediada por la activación de la vía de la fenoloxidasa tras el reconocimiento y fagocitosis del patógeno, constituye uno de los mecanismos de defensa clave en este modelo invertebrado. Por lo tanto, la presencia de estas lesiones pigmentadas resultó útil como indicador visual de que la infección se había instaurado correctamente antes de proceder a la administración de las formulaciones antifúngicas (Figura 10).



**Figura 10:** Melanización de *G. mellonella* post infección

#### **4.5.5 Administración del fármaco.**

La administración de los tratamientos antifúngicos se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento técnico que en la infección. En este caso, la inyección se realizó en la primera pata derecha de cada larva, en oposición al punto de entrada del inóculo, tal y como se describe en la literatura (Serrano et al., 2023). La concentración de cada antifúngico se calculó sobre la base de las indicaciones de uso terapéutico.

En cuanto a los productos, se seleccionaron las cuatro formulaciones híbridas nanotransportador–antifúngico que mostraron mayor actividad aparente en los ensayos *in vitro* previos:

**Tabla 3:** Concentraciones de productos administrados *in vivo*

[MMT-ITZ]	0,0034 mg/ $\mu$ L
[Lap-ITZ]	0,0024 mg/ $\mu$ L
[ZnAl-Amb]	0,0005 mg/ $\mu$ L
[MgAl-Amb]	0,0005 mg/ $\mu$ L

Cada larva recibió entre 20 y 40  $\mu\text{L}$  de la formulación correspondiente. Los controles negativos recibieron igual volumen de suero fisiológico estéril. Las dosis fueron determinadas en función de la concentración efectiva observada en ensayos *in vitro*, con un ajuste estimado para el modelo larvario teniendo en cuenta su peso promedio y el volumen inyectable compatible con su fisiología.

Tras la administración, las larvas fueron mantenidas en condiciones constantes de oscuridad, sin alimento y a 37 °C en incubadora, simulando condiciones fisiológicas humanas, tal y como se menciona en los protocolos (Kloezen et al., 2015; Serrano et al., 2023). Se realizó un seguimiento diario de la supervivencia, anotando el tiempo transcurrido hasta la muerte para cada individuo, como principal variable experimental. Además, la eficacia del tratamiento se comprobó mediante curvas de Kaplan–Meier que permiten comparar la eficacia relativa de cada formulación.

Por último, la evaluación secundaria incluyó también la observación de formación de granos negros, indicativos del desarrollo progresivo del eumicetoma. (Figura 11)



**Figura 11:** Formación de grano en la larva

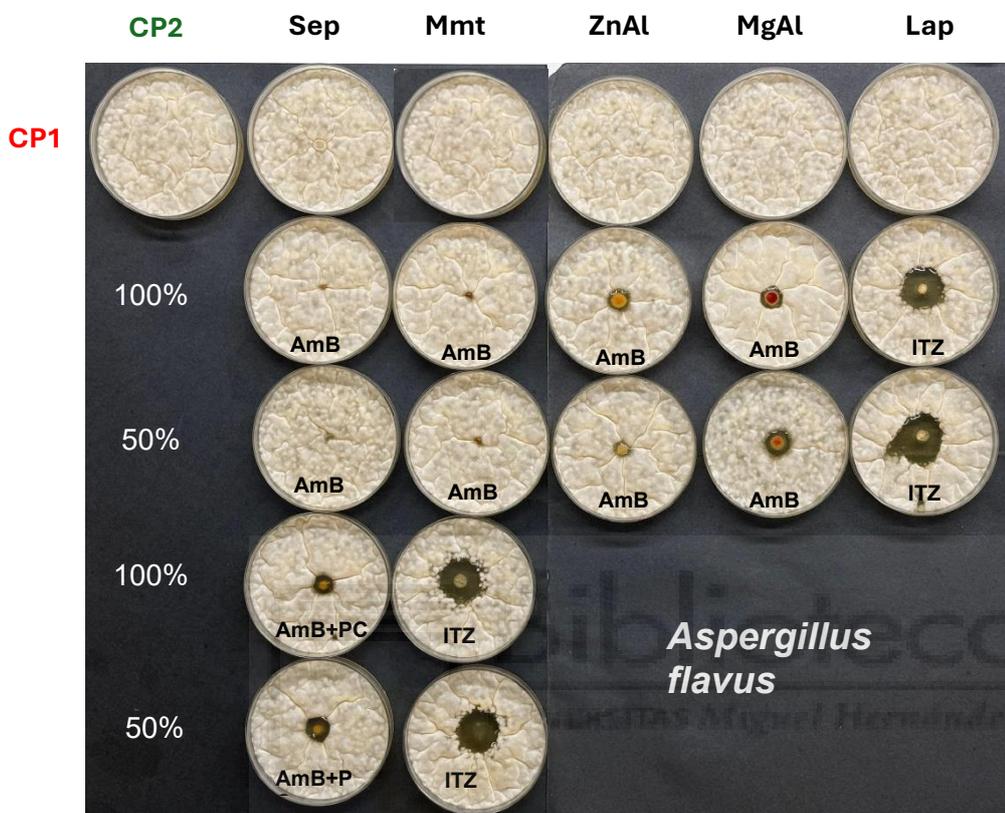
## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Resultados ensayos *in vitro*.**

A continuación, se presentan las imágenes de las placas de cultivo que muestran el crecimiento de los hongos en presencia de los híbridos arcilla–antifúngico, acompañadas de las representaciones gráficas de la inhibición radial expresada en centímetros para cada producto evaluado.

Este diseño permite comparar la eficacia antifúngica de cada producto a distintas concentraciones (100% o 50%), facilitando la evaluación visual y cuantitativa de la inhibición del crecimiento fúngico.

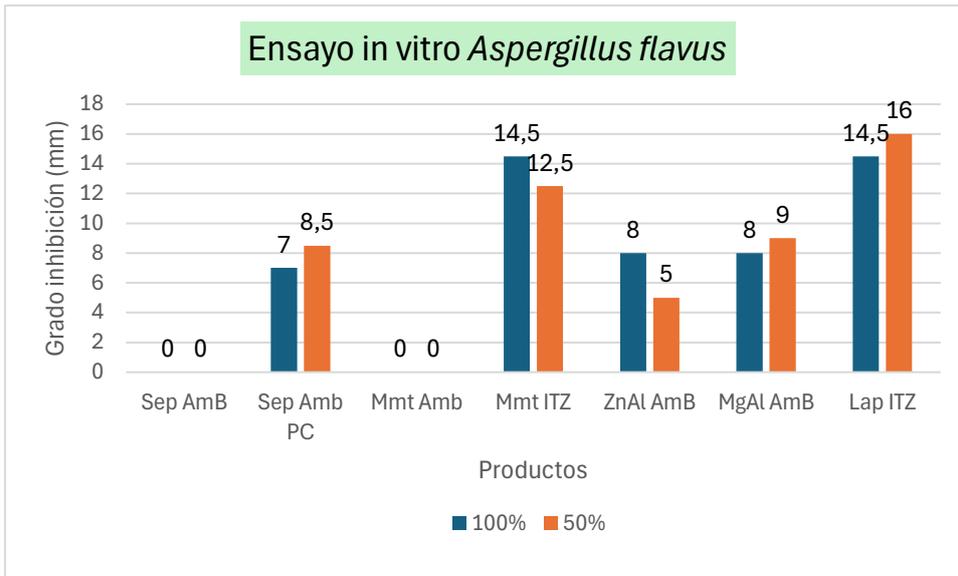
### ***Aspergillus flavus***



**Figura 12:** Resultados del ensayo in vitro con *A. flavus*.

Filas: **CP1** Control positivo (crecimiento sin antifúngico) 100%: nanocompuestos administrados en concentración máxima. 50%: Nanocompuestos administrados al 50% de la concentración máxima.

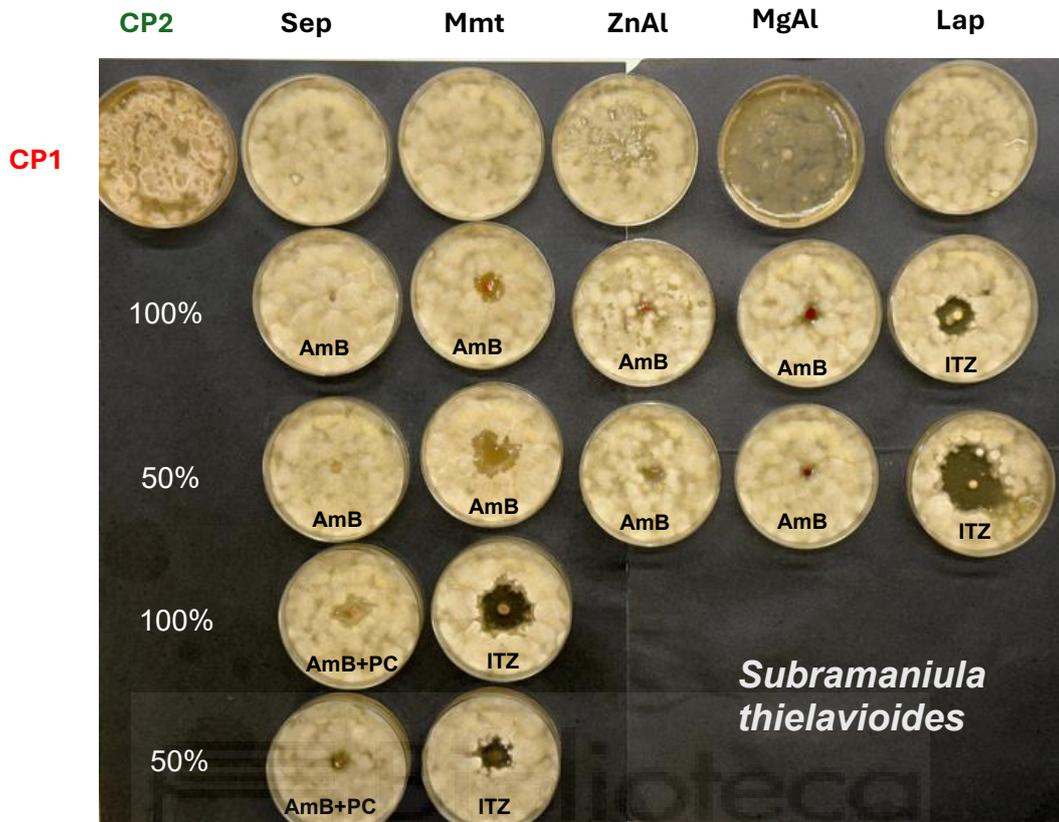
Columnas: **CP2:** Control positivo de crecimiento sin antifúngico ni nanoarcilla. **Sep:** Construcciones con sepiolita. **Mmt:** Construcciones con Montmorillonita. **ZnAl:** Hidróxido doble laminar Zinc-Aluminio. **MgAl:** Hidróxido doble laminar Magnesio-Aluminio. **Lap:** Construcción con laponita.



**Figura 13:** Representación de la medida de los halos de inhibición de los productos frente a *A. flavus*.

En el ensayo *in vitro* frente a *A. flavus*, se observa inhibición del crecimiento fúngico en varias de las formulaciones evaluadas. Según se aprecia en las placas (Figura 12) y en la gráfica correspondiente (Figura 13), se detecta una inhibición despreciable en los productos Sep-AmB y Mmt-AmB, mientras que el resto de las formulaciones mostraron halos de inhibición de diferente tamaño.

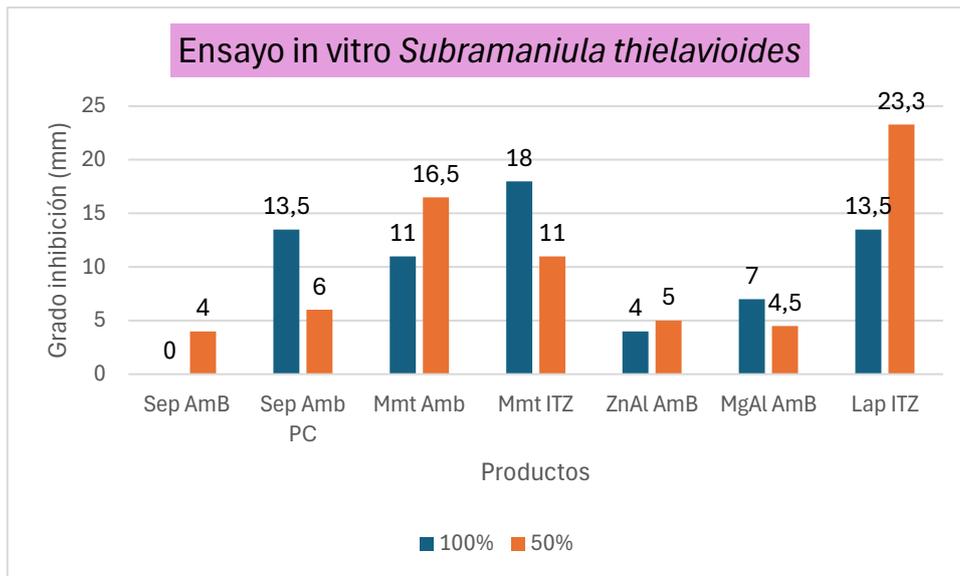
## *Subramaniula thielavioides*



**Figura 14:** Resultado del ensayo *in vitro* con *S. thielavioides*.

Filas: **CP1** Control positivo (crecimiento sin antifúngico) 100%: nanocompuestos administrados en concentración máxima. 50%: Nanocompuestos administrados al 50% de la concentración máxima.

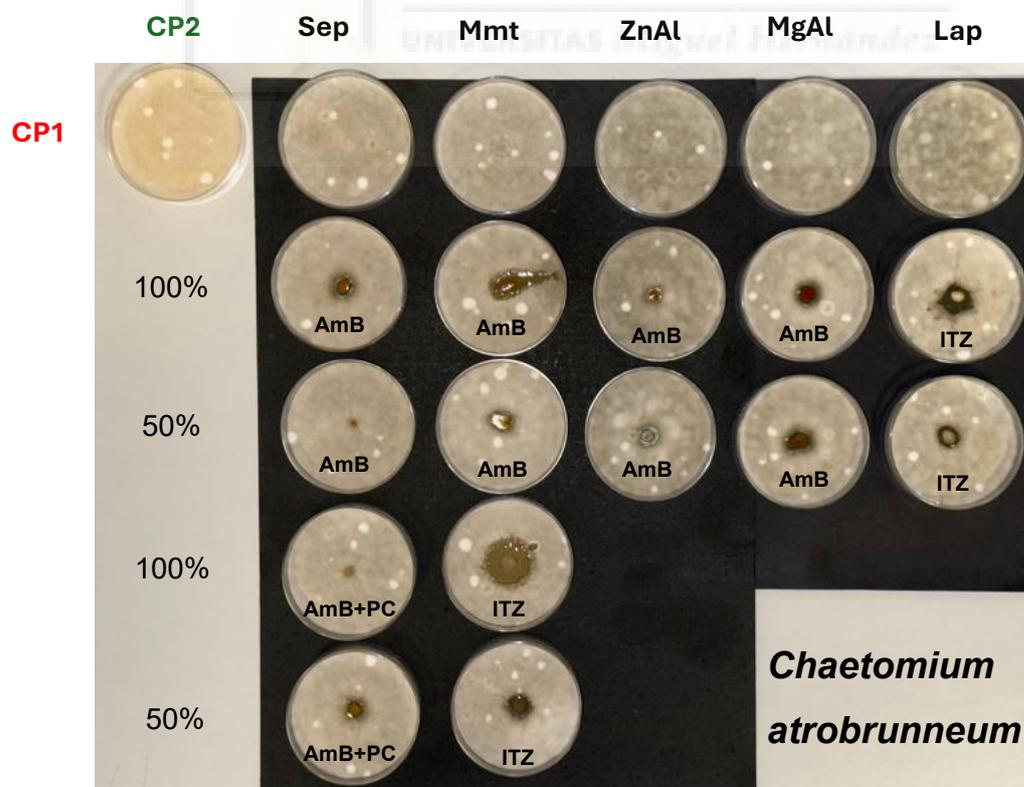
Columnas: **CP2:** Control positivo de crecimiento sin antifúngico ni nanoarcilla. **Sep:** Construcciones con sepiolita. **Mmt:** Construcciones con Montmorillonita. **ZnAl:** Hidróxido doble laminar Zinc-Aluminio. **MgAl:** Hidróxido doble laminar Magnesio-Aluminio. **Lap:** Construcción con laponita.



**Figura 15:** Representación de la medida de los halos de inhibición de los productos frente a *S. thielavioides*

En los ensayos realizados frente a *Subramaniula thielavioides*, se observaron halos de inhibición en la totalidad de las formulaciones evaluadas.

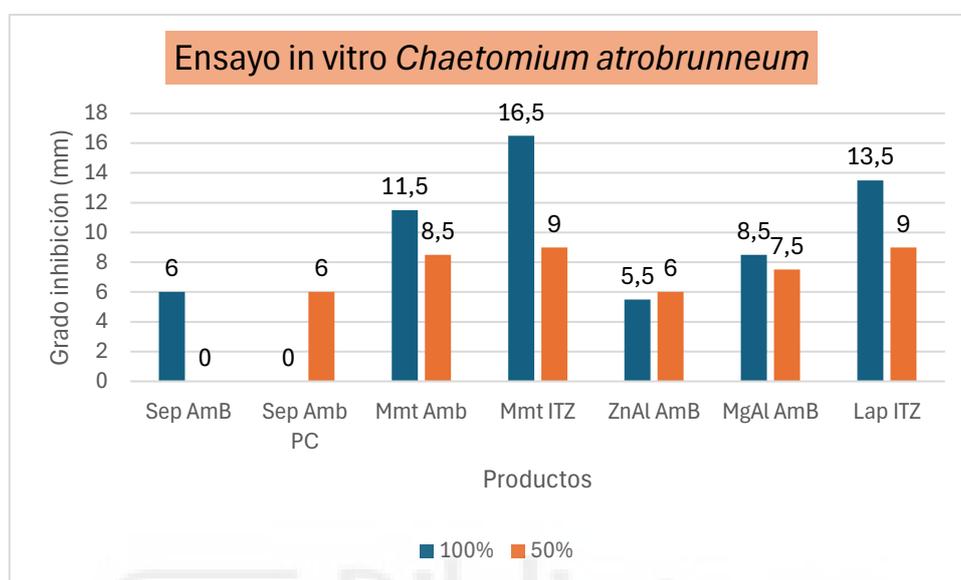
***Chaetomium atrobrunneum***



**Figura 16:** Resultados del ensayo in vitro con *C. atrobrunneum*

Filas: **CP1** Control positivo (crecimiento sin antifúngico) 100%: nanocompuestos administrados en concentración máxima. 50%: Nanocompuestos administrados al 50% de la concentración máxima.

Columnas: **CP2**: Control positivo de crecimiento sin antifúngico ni nanoarcilla. Sep: Construcciones con sepiolita. Mmt: Construcciones con Montmorillonita. ZnAl: Hidróxido doble laminar Zinc-Aluminio. MgAl: Hidróxido doble laminar Magnesio-Aluminio. Lap: Construcción con laponita.



**Figura 17:** Representación de la medida de los halos de inhibición de los productos en *C. atrobrunneum*

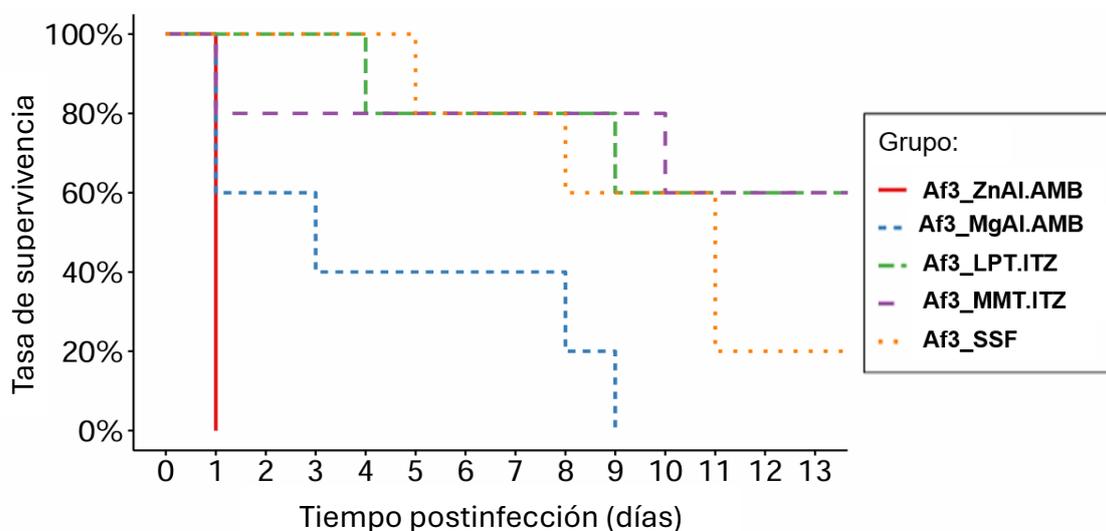
En el enfrentamiento frente a *Chaetomium atrobrunneum*, se observó inhibición fúngica en todas las formulaciones evaluadas.

## 5.2 Resultados de ensayos *in vivo*.

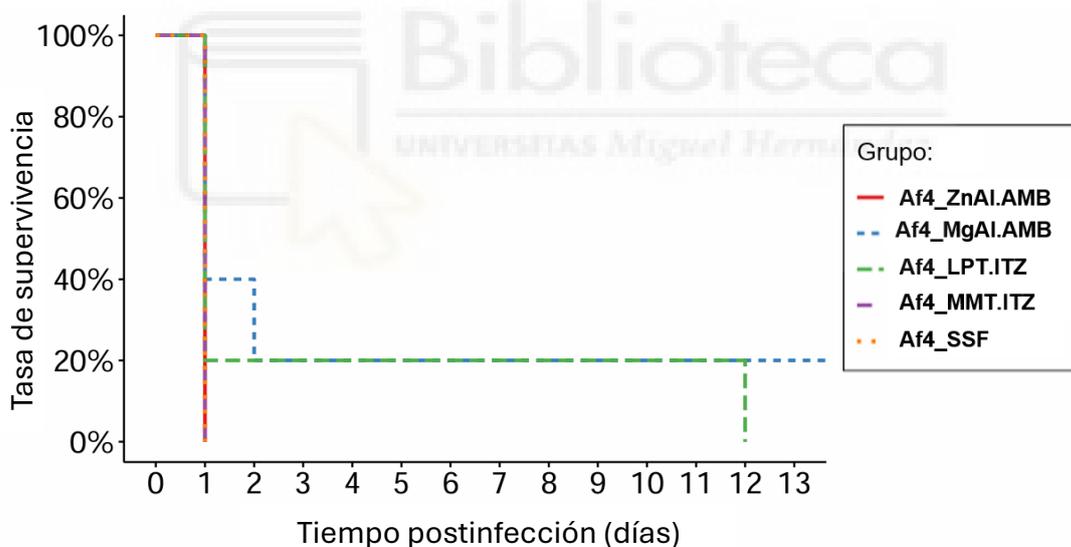
Las curvas de supervivencia con los diferentes hongos y compuestos se muestran en las figuras (18-26). A la derecha, en la leyenda de las gráficas se encuentran los productos probados, así como su color asignado en la representación.

Además, en todos los ensayos *in vivo* realizados, se evaluaron tres concentraciones de inóculo fúngico ( $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  células/mL).

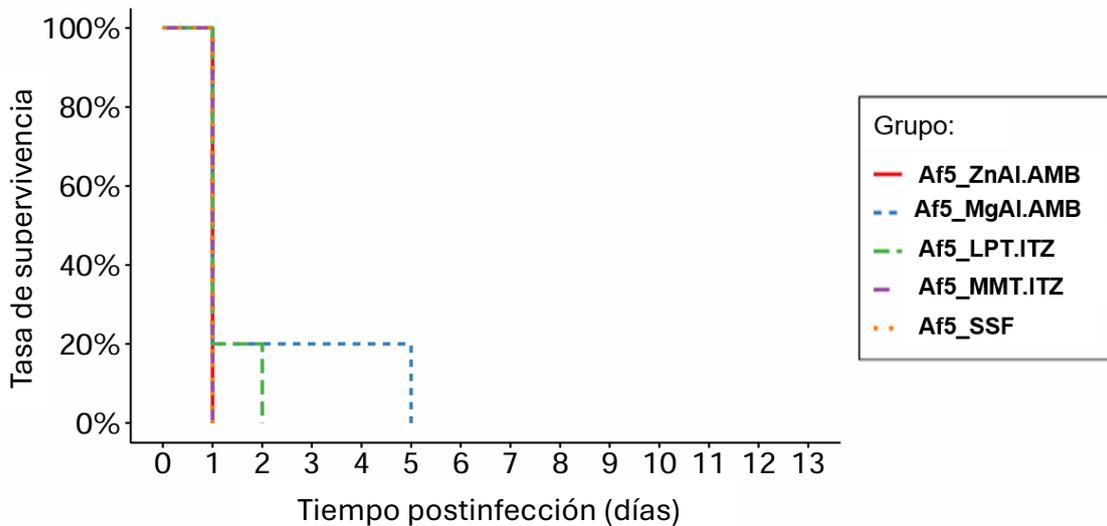
### ***Aspergillus flavus*:**



**Figura 18:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Aspergillus flavus* en concentración de  $10^3$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

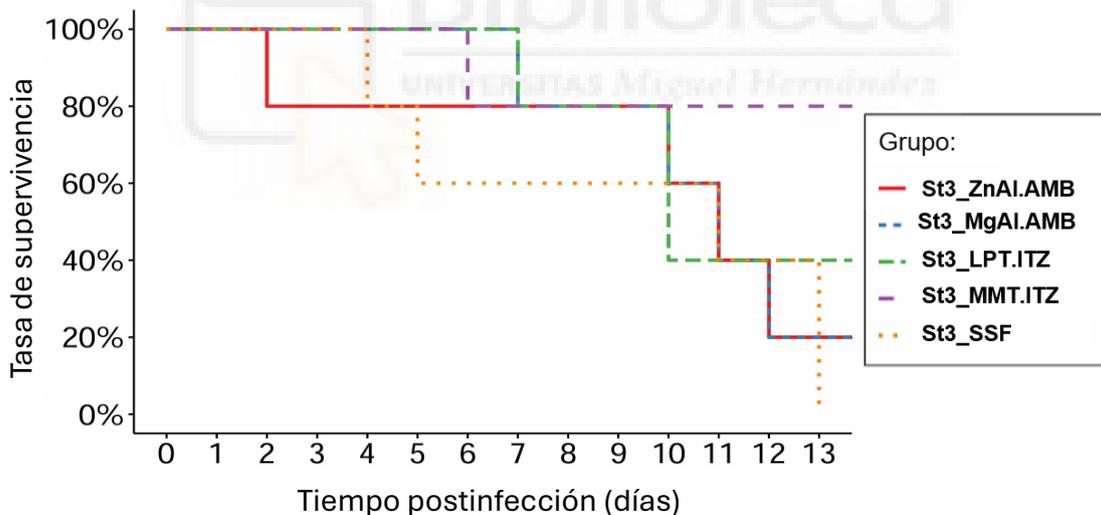


**Figura 19:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Aspergillus flavus* en concentración de  $10^4$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

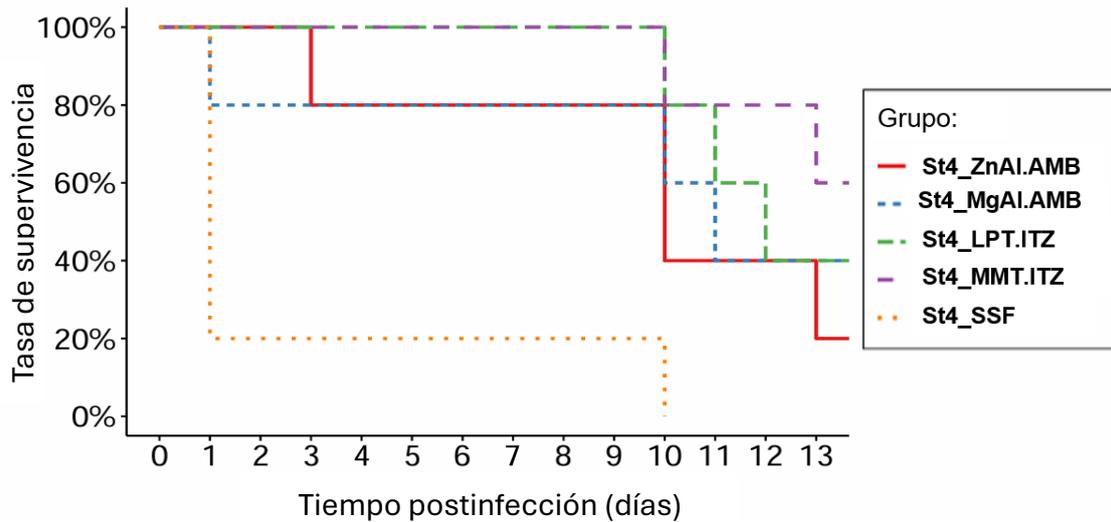


**Figura 20:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Aspergillus flavus* en concentración de  $10^5$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

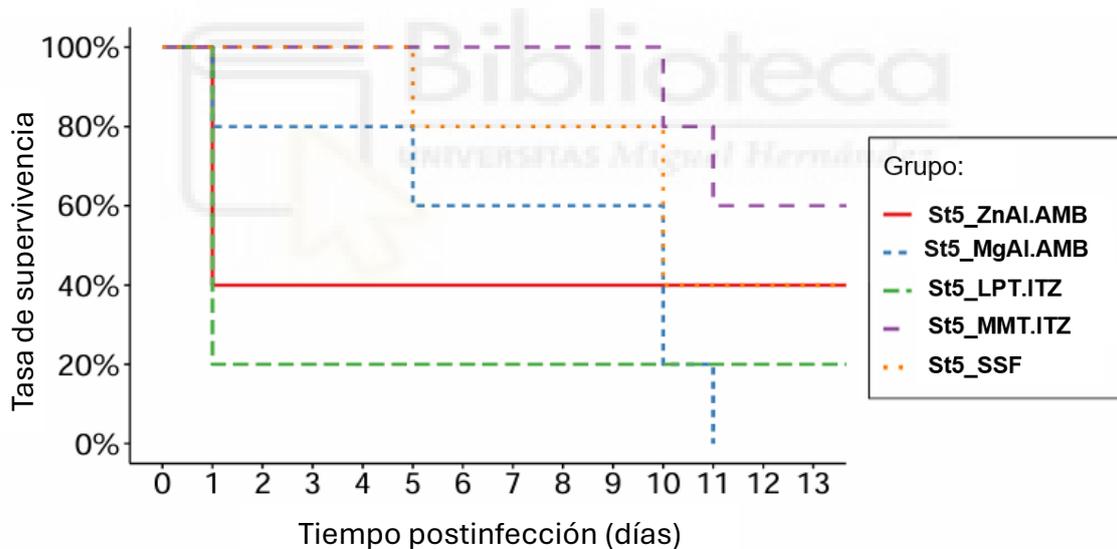
### ***Subramaniula thielavioides.***



**Figura 21:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Subramaniula thielavioides* en concentración de  $10^3$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

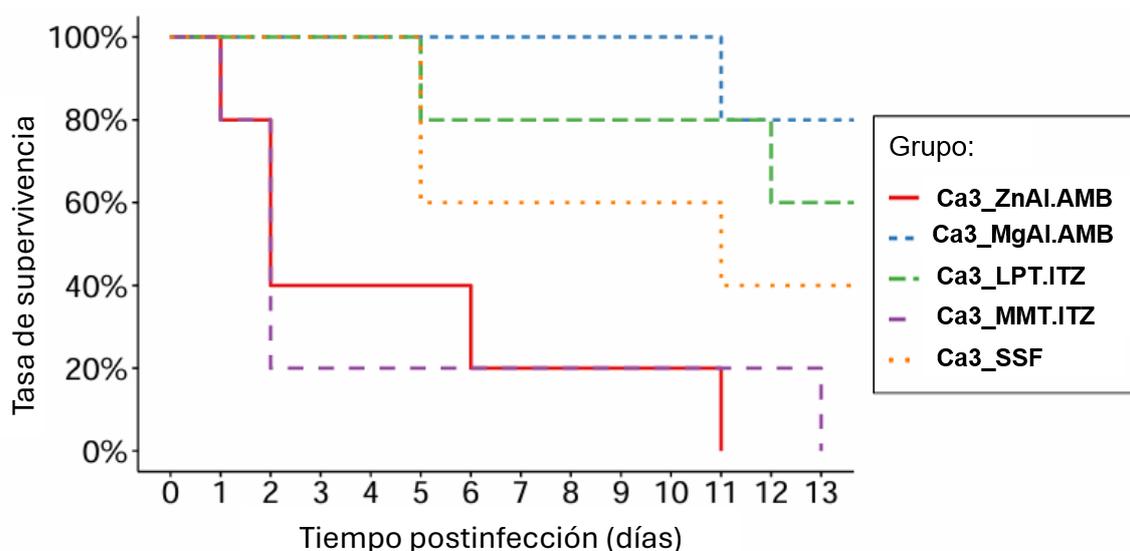


**Figura 22:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Subramaniula thielavioides* en concentración de  $10^4$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

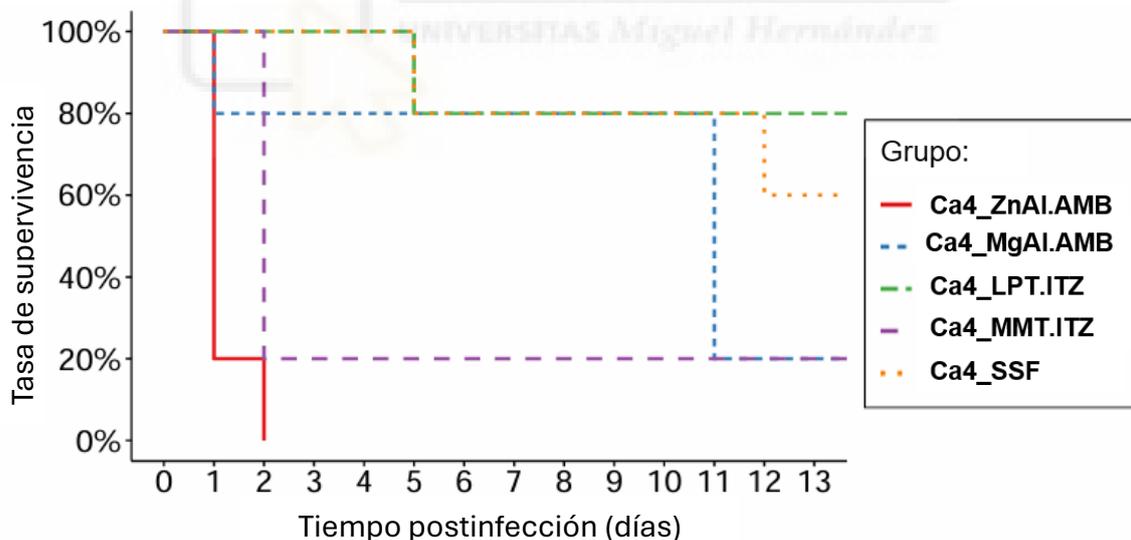


**Figura 23:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Subramaniula thielavioides* en concentración de  $10^5$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

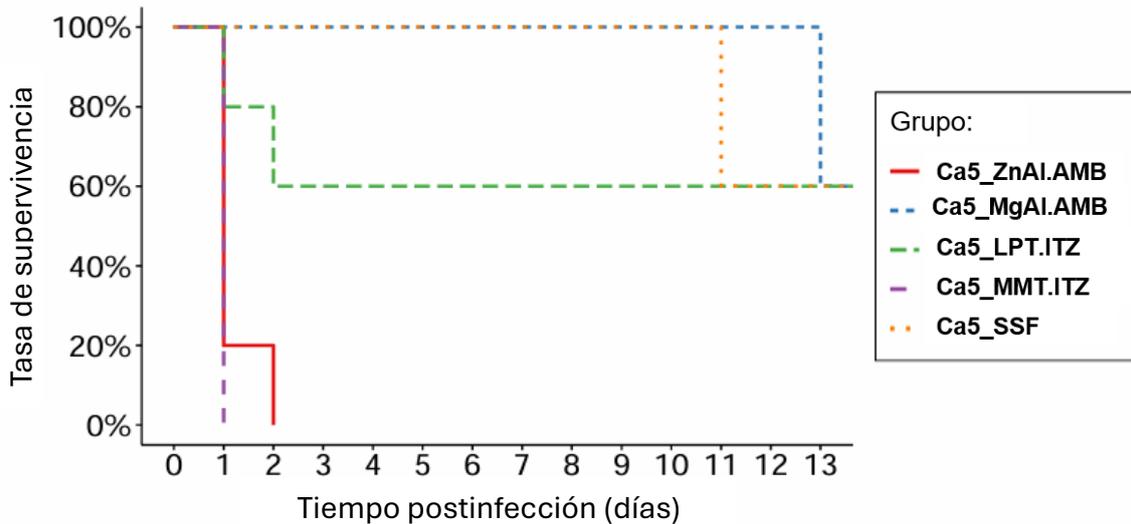
### ***Chaetomium atrobrunneum*.**



**Figura 24:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Chaetomium atrobrunneum* en concentración de  $10^3$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).



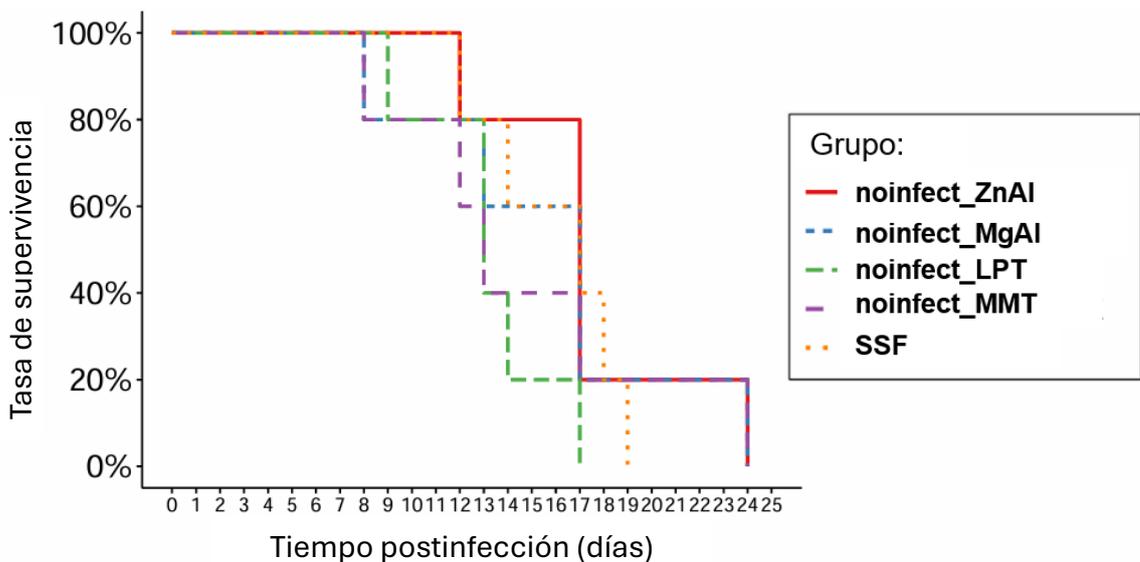
**Figura 25:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Chaetomium atrobrunneum* en concentración de  $10^4$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).



**Figura 26:** Curva de supervivencia de larvas infectadas con *Chaetomium atrobrunneum* en concentración de  $10^5$  propágulos/mL y tratadas con los cinco compuestos ensayados: Hidróxidos laminares con Anfotericina B con Zinc-Aluminio (ZnAl.AMB) y con Magnesio-Aluminio (MgAl.AMB); y arcillas (Laponita y Montmorillonita) con Itraconazol (LPT.ITZ y MMT.ITZ respectivamente). Se representa también el comportamiento del grupo control con suero salino fisiológico (SSF).

### 5.3 Ensayo de toxicidad.

Como se ha comentado con anterioridad, en paralelo a los ensayos de infección se comprobó experimentalmente la biocompatibilidad de los nanotransportadores utilizados en las construcciones. Comprobándose así la ausencia de toxicidad en todos los materiales empleados (Figura 27)



**Figura 27:** Curva de supervivencia de *G. mellonella* frente a los nanotransportadores en ausencia de antifúngico: Hidróxidos dobles laminares (ZnAl y MgAl). Arcillas: Laponita (LPT) y Montmorillonita (MMT). Suero salino fisiológico (SSF).

## 6. DISCUSIÓN

Existen diversas publicaciones en las que se evidencia la eficacia de antifúngicos como la anfotericina B o el itraconazol frente a hongos causantes de eumicetoma, especialmente *Madurella micetomatis* (Ahmed et al., 2004; Chandler et al., 2023). Sin embargo, actualmente es escasa la literatura disponible sobre sistemas de liberación controlada de antifúngicos en eumicetoma (Lalchandani et al., 2020), y más escasa aún es aquella donde los nanotransportadores son nanoarcillas e hidróxidos dobles laminares, lo que da un importante valor al estudio aquí presente.

En primer lugar, queda evidenciada la biocompatibilidad de las arcillas y de los hidróxidos dobles laminares utilizados en las construcciones. Tal como se muestra en la Figura 27, los nanotransportadores, por sí solos, no generan toxicidad apreciable, ya que la supervivencia de las larvas tratadas con estos nanomateriales es comparable a la del grupo control.

Los resultados obtenidos al estudiar la eficacia antifúngica de las distintas formulaciones híbridas evaluadas muestran diferencias claras tanto en función del fármaco utilizado como del tipo de nanotransportador y la especie fúngica enfrentada.

En cuanto a la eficacia en función del fármaco, las formulaciones funcionalizadas con itraconazol presentaron mayor capacidad de inhibición frente a las tres especies de hongos *in vitro* que la anfotericina. Esto confirma los resultados disponibles en la literatura, donde se describe que el itraconazol, pese a tener un espectro reducido, es más eficaz en la inhibición del desarrollo fúngico (Chandler et al., 2023). Este patrón se observó especialmente en los híbridos Lap-ITZ y Mmt-ITZ, que fueron los más eficaces frente a *A. flavus* y *S. thielavioides*, alcanzando halos de hasta 16 mm y 23,3 mm respectivamente. En el caso de *C. atrobrunneum*, Mmt-ITZ fue también la formulación más activa, con una inhibición de 16,5 mm.

Se observaron ciertos casos *in vitro* en los que las formulaciones al 50% presentaron igual o mayor inhibición que las del 100%, especialmente en Lap-ITZ frente a *A. flavus* y *S. thielavioides* (Figuras 13 y 15). Este fenómeno podría

deberse a una mayor difusión del producto al estar menos concentrado, por la propia disminución de la agregación del material en el medio.

En cuanto la eficacia según el tipo de nanotransportador, la formulación que dio la mayor supervivencia respecto al control en los ensayos *in vivo* fue claramente el híbrido Mmt-ITZ frente a *S. thielavioides*. Aunque la construcción Lap-ITZ también superó la supervivencia del grupo control en la mayoría de los casos.

Las formulaciones con anfotericina B mostraron una actividad *in vitro* variable. Algunas combinaciones, como Mmt-AmB y Sep-AmB-PC, fueron efectivas frente a *S. thielavioides* y *C. atrobrunneum*, mientras que otras, como Sep-AmB sin fosfocolina o Mmt-AmB, no mostraron inhibición frente a *A. flavus*. En cuanto a la actividad *in vivo*, los resultados no son concluyentes: ZnAl-AmB no mejora significativamente la supervivencia, y aunque MgAl-AmB muestra cierta eficacia en algunos casos, esta no es consistente.

En cuanto a los resultados obtenidos dependiendo de la especie fúngica evaluada, uno de los modelos experimentales *in vivo*, concretamente el de *A. flavus*, mostró limitaciones importantes en su reproducibilidad. La elevada mortalidad precoz, especialmente a concentraciones de  $10^4$  y  $10^5$  células/mL, impidió valorar con precisión la eficacia de los tratamientos. Esta alta mortalidad podría estar relacionada con la alta capacidad de esporulación y el rápido crecimiento característico de este hongo. Estas propiedades favorecerían una diseminación más agresiva dentro del organismo, superando la capacidad de respuesta inmune de *G. mellonella*.

En el modelo *in vivo* de *C. atrobrunneum*, la alta mortalidad al inocular  $10^5$  células/mL impidió valorar este modelo. Por lo tanto, se propone repetir los ensayos en condiciones más controladas y con ajustes en el diseño experimental para evaluar con mayor precisión la respuesta al tratamiento en esta especie.

Los ensayos *in vivo* con *S. thielavioides* mostraron una respuesta más favorable al tratamiento, especialmente con un inóculo de  $10^4$  células/mL, que permitió establecer una infección estable y evaluar diferencias entre grupos. En este modelo, todos los tratamientos prolongaron la supervivencia de las larvas, destacando las formulaciones LPT-ITZ, MMT-ITZ y MgAl-AmB, cuyas curvas de supervivencia se mantuvieron elevadas por más tiempo frente al grupo control.

Estos resultados sugieren que *S. thielavioides* podría ser más sensible a ciertas formulaciones antifúngicas o presentar una virulencia inicial menor, lo que facilita una mejor respuesta al tratamiento. Así, el inóculo de  $10^4$  células/mL representa un equilibrio óptimo para evaluar eficacia terapéutica, a diferencia de concentraciones más altas, que provocaron mortalidad temprana, o más bajas, que no generaron una infección suficientemente agresiva.

## 7. CONCLUSIONES

1. Los ensayos *in vitro* permitieron identificar formulaciones híbridas con actividad antifúngica relevante frente a las tres especies evaluadas.
2. Las construcciones funcionalizadas con itraconazol (Lap-ITZ y Mmt-ITZ) fueron, en general, las más eficaces *in vitro*.
3. Se observaron zonas de inhibición incluso a concentraciones del 50%, lo que en algunos casos se asoció con una mayor difusión del producto en el medio semisólido.
4. Las formulaciones de montmorillonita y sepiolita con anfotericina B, mostraron actividad antifúngica destacable *in vitro* frente a *S. thielavioides* y *C. atrobrunneum*.
5. La incorporación de fosfocolina en la formulación de sepiolita con AmB mejoró la eficacia frente a *S. thielavioides* y *C. atrobrunneum*.
6. *Subramaniula thielavioides* fue la especie más sensible en general, presentando los halos de inhibición más amplios entre todas las formulaciones evaluadas.
7. En los ensayos *in vivo* con *S. thielavioides*, se observó una mejora significativa en la supervivencia de las larvas tratadas, especialmente a una concentración de  $10^4$  células/mL, lo que sugiere que este modelo podría ser útil para evaluar la eficacia de tratamientos frente a esta especie.

8. El modelo de *G. mellonella* demostró ser adecuado como sistema de evaluación de la actividad de los nanocompuestos frente a agentes de micetoma

## 8. PROYECCIÓN FUTURA

1. Confirmación de los resultados *in vivo* y mejora del modelo para *A. flavus* y *C. atrobrunneum*
2. Transición hacia formulaciones basadas en hidrogeles: Una vez validadas las formulaciones antifúngicas basadas en arcillas y HDL, el siguiente paso lógico será su incorporación en matrices biopoliméricas para el desarrollo de hidrogeles inyectables. Estos sistemas permitirán una liberación localizada, gradual y sostenida del fármaco en la zona afectada, imitando mejor el tratamiento clínico del eumicetoma.
3. Evaluación de estrategias combinadas antifúngico–antifibrótico: Dada la naturaleza crónica y fibrótica del eumicetoma, se plantea la futura incorporación de agentes antifibróticos en los hidrogeles, para facilitar la penetración del antifúngico en el tejido y mejorar su eficacia.
4. Validación en modelos animales más complejos: Una vez completada la fase de optimización en *G. mellonella*, podría plantearse la validación de los sistemas en modelos más avanzados.
5. Ensayos clínicos previos a la aplicación en terapia humana.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., & Caramella, C. (2007). Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36(1-3), 22-36. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.015>

2. Ahmed, A. O. A., Van De Sande, W. W. J., Van Vianen, W., Van Belkum, A., Fahal, A. H., Verbrugh, H. A., & Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. (2004). In Vitro Susceptibilities of *Madurella mycetomatis* to Itraconazole and Amphotericin B Assessed by a Modified NCCLS Method and a Viability-Based 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenylamino)Carbonyl]-2 H—Tetrazolium Hydroxide (XTT) Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2742-2746.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2742-2746.2004>
3. Ahmed, A. O., Van Leeuwen, W., Fahal, A., Van De Sande, W., Verbrugh, H., & Van Belkum, A. (2004). Mycetoma caused by *Madurella mycetomatis*: A neglected infectious burden. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(9), 566-574.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01131-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01131-4)
4. CDC. (2024, junio 18). *Clinical Overview of Mycetoma*. Mycetoma.  
<https://www.cdc.gov/mycetoma/hcp/clinical-overview/index.html>
5. Chandler, D. J., Bonifaz, A., & Van De Sande, W. W. J. (2023). An update on the development of novel antifungal agents for eumycetoma. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1165273. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1165273>
6. *Cirugía en Turkana* (s. f.). Recuperado 13 de mayo de 2025, de <https://www.cirugiaenturkana.com/que-es-cirugia-en-turkana/>
7. Colom, M. F., Ferrer, C., Ekai, J. L., Ferrández, D., Ramírez, L., Gómez-Sánchez, N., Leting, S., & Hernández, C. (2023). First report on mycetoma in Turkana County—North-western Kenya. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(8), e0011327. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011327>
8. Cui, N., & Zhao, J. (2024). Application and evaluation of topical amphotericin B for the treatment of respiratory fungal infections. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09342-9>
9. Du, W., Gao, Y., Liu, L., Sai, S., & Ding, C. (2021). Striking Back against Fungal Infections: The Utilization of Nanosystems for Antifungal Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10104.  
<https://doi.org/10.3390/ijms221810104>

10. Jayrajsinh, S., Shankar, G., Agrawal, Y. K., & Bakre, L. (2017). Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39, 200-209. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.023>
11. Jung, H., Kim, H.-M., Choy, Y. B., Hwang, S.-J., & Choy, J.-H. (2008). Laponite-based nanohybrid for enhanced solubility and controlled release of itraconazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.008>
12. Kamali Sarvestani, H., Ahmadi, B., Gerami Shoar, M., Getso, M., Rafat, Z., Mahmoudi, S., Khansari, M., Salahshour, F., Fatahi, L., Salehi, M., & Ansari, S. (2022). Mycetoma due to *Aspergillus flavus* in a diabetic patient: Case report and literature review. *IDCases*, 29, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01585>
13. Kloezen, W., Van Helvert-van Poppel, M., Fahal, A. H., & Van De Sande, W. W. J. (2015). A *Madurella mycetomatis* Grain Model in *Galleria mellonella* Larvae. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003926. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003926>
14. Kuiper, L., & Ruijgrok, E. J. (2009). A Review on the Clinical Use of Inhaled Amphotericin B. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 22(3), 213-227. <https://doi.org/10.1089/jamp.2008.0715>
15. Lalchandani, R., Salvi, B. V., D'souza, P., & Gugnani, H. C. (2020). Successful Limb Salvage in a Case of Advanced Long-Standing Eumycetoma of the Foot Using Adjunctive Local Amphotericin B Delivery Through Bioabsorbable Beads. *Indian Journal of Orthopaedics*, 54(2), 224-227. <https://doi.org/10.1007/s43465-019-00031-3>
16. León-Vallejo, A. M., Velázquez-Herrera, F. D., Sampieri, Á., Landeta-Cortés, G., & Fetter, G. (2019). Study of layered double hydroxides as bactericidal materials against *Corynebacterium ammoniagenes*, a bacterium responsible for producing bad odors from human urine and skin infections. *Applied Clay Science*, 180, 105194. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105194>

17. Li, L., Sevciuc, A., & Rijn, P. van. (2023). Layered Double Hydroxides as an Intercalation System for Hydrophobic Molecules. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(24), 3145. <https://doi.org/10.3390/nano13243145>
18. Mhmoud, N. A., Santona, A., Fiamma, M., Siddig, E. E., Deligios, M., Bakhiet, S. M., Rubino, S., & Fahal, A. H. (2019). *Chaetomium atrobrunneum* causing human eumycetoma: The first report. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007276. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007276>
19. Nabipour, H., & Hu, Y. (2022). Layered zinc hydroxide as vehicle for drug delivery systems: A critical review. *Journal of Porous Materials*, 29(2), 341-356. <https://doi.org/10.1007/s10934-021-01171-4>
20. *Organización Mundial de la Salud: Enfermedades tropicales desatendidas.* (s. f.). Recuperado 13 de mayo de 2025, de <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>
21. *Organización Mundial de la Salud: Micetoma.* (s. f.). Recuperado 13 de mayo de 2025, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycetoma>
22. Park, H., Otte, A., & Park, K. (2022). Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release*, 342, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>
23. Roque, L., Molpeceres, J., Reis, C., Rijo, P., & Pinto Reis, C. (2017). Past, Recent Progresses and Future Perspectives of Nanotechnology Applied to Antifungal Agents. *Current Drug Metabolism*, 18(4), 280-290. <https://doi.org/10.2174/1389200218666170201152000>
24. Ruiz-Hitzky, E., Darder, M., Wicklein, B., Castro-Smirnov, F. A., & Aranda, P. (2019). Clay-Based Biohybrid Materials for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Clays and Clay Minerals*, 67(1), 44-58. <https://doi.org/10.1007/s42860-019-0005-0>
25. Serrano, I., Verdial, C., Tavares, L., & Oliveira, M. (2023). The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics*, 12(3), 505. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030505>

26. Tomás, H., Alves, C. S., & Rodrigues, J. (2018). Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2407-2420. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>
27. Wang, X., Mohammad, I. S., Fan, L., Zhao, Z., Nurunnabi, M., Sallam, M. A., Wu, J., Chen, Z., Yin, L., & He, W. (2021). Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(8), 2585-2604. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.04.010>
28. Welsh, O., Al-Abdely, H. M., Salinas-Carmona, M. C., & Fahal, A. H. (2014). Mycetoma Medical Therapy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), e3218. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003218>
29. Zein, H. A. M., Fahal, A. H., Mahgoub, E. S., Hassan, T. A. E., & Abdel-Rahman, M. E. (2012). Predictors of cure, amputation and follow-up dropout among patients with mycetoma seen at the Mycetoma Research Centre, University of Khartoum, Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(11), 639-644. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.07.003>

#### **AGRADECIMIENTOS:**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todo el equipo del laboratorio de Micología Médica de la Universidad Miguel Hernández por acogerme y darme la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación.

En especial quiero agradecer a mis tutoras, la Dra Kika Colom y la Dra Consuelo Ferrer, por su confianza, orientación y compromiso durante todo el desarrollo de este trabajo.

También me gustaría agradecer a Javier Puentes y Esther Sáez por su cercanía y por transmitirme, con paciencia y dedicación, los conocimientos y habilidades necesarios para el día a día del laboratorio.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia, novia, amigos y compañeros por haberme acompañado a lo largo de estos cuatro intensos años de carrera. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por estar presentes tanto en los momentos de incertidumbre como en los de celebración, y por ser siempre una fuente constante de ánimo y motivación.

Durante el transcurso de este proyecto, he sido beneficiario de la beca de Prácticas en Actividades de Fomento a la Investigación (PAFI), llevado a cabo en el laboratorio de Micología Médica situado en el campus de San Joan D'Alacant de la Universidad Miguel Hernández.

Los resultados del presente trabajo están aceptados para presentación en el congreso europeo de micología *12-Trends In Medical Mycology* bajo el título: "*Clay-Antifungal hybrids: new proposal for treatment of Eumycetoma and other localized mycosis*", del cual soy coautor. El congreso se celebrará en Bilbao del 19 al 22 de septiembre de 2025.

