



**FACULTAD
DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Biofilmes en heridas: nuevas estrategias moleculares
para la cicatrización y el tratamiento de infecciones.**

Autor: África López-Serrano Resino

Tutor: Carmina Rodríguez Fernández

Convocatoria: junio 2019

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
4.1. Tipos de heridas y su curación	5
4.2. Características de los biofilmes	8
4.3. Importancia de la Diabetes Mellitus y las heridas crónicas	9
4.4 Importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en las heridas crónicas producidas por biofilmes	10
4.5 Principales tratamientos de las heridas causadas por biofilmes	12
4.6 Estrategias novedosas para el tratamiento de heridas producidas por biofilmes ..	15
4.6.1. Péptidos antimicrobianos (AMP)	15
4.6.2. Nanopartículas	16
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

La repercusión clínica de los biofilmes en relación con la infección de las heridas crónicas y su difícil curación, constituye un campo de investigación relativamente nuevo. Poco se sabe sobre la presentación, el diagnóstico, las posibles implicaciones y las estrategias de manejo de los biofilmes en dichas patologías. Las heridas crónicas, en general, presentan la misma clínica que otras infecciones crónicas asociadas a biofilmes, que son particularmente resistentes a los antimicrobianos dada la estructura y la propia naturaleza polimicrobiana de los mismos. El concepto de *heridas basadas en biofilmes*, recientemente introducido, tiene como objetivo prevenir la formación de biopelículas en el tejido de las heridas, especialmente en úlceras por presión, úlceras del pie diabético y úlceras venosas en las extremidades inferiores. Los tratamientos de las heridas crónicas muchas veces son poco efectivos y suponen un gran coste económico para los centros sanitarios, debido a su larga duración, variedad de tratamientos y difícil curación. Se requieren terapias innovadoras para la óptima curación de dichas heridas y la eliminación de los biofilmes en las mismas. En este sentido, los péptidos antimicrobianos y las nanopartículas, suponen un avance terapéutico muy importante y prometedor.

En este Trabajo de Fin de Grado se revisan los aspectos relacionados con los tipos de heridas y el proceso de curación, las características de los biofilmes y su importancia en las heridas crónicas, especialmente las asociadas a diabetes mellitus y las producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, el tratamiento de las mismas y las nuevas estrategias terapéuticas.

Palabras clave: *heridas crónicas, biofilmes, Pseudomonas aeruginosa, tratamiento*

ABSTRACT

The clinical impact of biofilms in relation to the infection of chronic wounds and their difficult healing constitutes a relatively new field of research. Little is known about the presentation, diagnosis, possible implications and management strategies of biofilms in these pathologies. Chronic wounds, in general, present the same clinical symptoms as other chronic infections associated with biofilms, which are particularly resistant to antimicrobials due to the structure and their own poly-microbial nature. The concept of *wounds based on biofilms*, recently introduced, aims to prevent the formation of biofilms in the tissue of the wound, especially in pressure ulcers, diabetic foot ulcers and venous ulcers in the lower extremities. The treatments of chronic wounds are often ineffective and involve a great economic cost for health centers, due to its long duration, variety of treatments and difficult healing. Innovative therapies are required for the optimal healing of such wounds and the elimination of biofilms in them. In this sense, antimicrobial peptides and nanoparticles represent a very important and promising therapeutic advance.

In this Bachelor Thesis, the aspects related to the types of wounds and the healing process, the characteristics of biofilms and their importance in chronic wounds, especially those associated with diabetes mellitus and those produced by *Pseudomonas aeruginosa*, their treatment and the new therapeutic strategies are reviewed.

Key words: *chronic wounds, biofilms, Pseudomonas aeruginosa, treatment*

1. INTRODUCCIÓN

En personas con un sistema inmunitario deprimido, las heridas se asocian en mayor medida con la aparición de infecciones, lo que puede dar lugar a diversas complicaciones y a la cronificación de las heridas.

Las infecciones bacterianas se pueden producir en cualquier momento o etapa de la vida, y normalmente son controladas gracias al sistema inmunitario del enfermo. Pero hay ciertos factores, como, por ejemplo, enfermedades crónicas o roturas en la barrera de la piel, que pueden aumentar notablemente el riesgo de padecer una infección. En este caso, subrayamos las heridas crónicas como factor de riesgo claro de padecer infecciones en las mismas ⁽¹⁾.

Es importante tener en cuenta que los biofilmes o biopelículas son difíciles de diagnosticar clínicamente, ya que los métodos de cultivo estándar no son adecuados para poder evaluar la verdadera carga microbiana presente en el biofilme ⁽²⁾.

Para que la atención prestada por el personal sanitario sea más rentable, sería crucial que en investigación se consiguiera una manera de realizar una confirmación clínica de la presencia del biofilme en las heridas de manera instantánea, ya que se ha propuesto una evidencia visual de la formación de los mismos, pero no ha sido confirmada aún.

El estudio realizado por Hurlow *et al* determinó por microscopía electrónica de barrido (SEM) que el 75% de las heridas crónicas analizadas contenían biofilmes. Este resultado es la base para la sospecha de la presencia de los biofilmes en las heridas, para lograr una curación coste-efectiva ⁽³⁾.

Es decir, a pesar del tratamiento profiláctico con cirugía y antibioterapia, pueden producirse infecciones persistentes complejas. Es importante describir nuevos tratamientos experimentales, dirigidos específicamente a la eliminación de los biofilmes.

Hay que tener en cuenta por ello, que la mayoría de los enfoques de tratamiento no deberían ser singulares, sino multifacéticos y combinados, siendo la estrategia más efectiva para el tratamiento de estas complicadas infecciones, cada vez más comunes ⁽⁴⁾.

Las lesiones en las extremidades son unas de las más comunes y costosas. Se estiman gastos de 2 mil millones de dólares, debido a la asociación entre este tipo de lesiones y la elevada incidencia de tratamientos continuos y permanencias prolongadas en el hospital, lo que indica que pueden producirse complicaciones infecciosas fácilmente. Cuando hay infecciones, las tasas de fracaso son elevadas, lo que aumenta el coste, y puede conducir a una pérdida de función de dicha extremidad, aumentando aún más los costes por discapacidad del miembro afectado ⁽⁴⁾.

2. OBJETIVOS

- Analizar los tipos de heridas y el problema clínico que tienen los biofilmes en las heridas agudas y crónicas; así como la formación de los biofilmes en relación con las heridas.
- Estudiar los principales patógenos formadores de biofilmes en heridas, y los de mayor importancia en España.
- Describir las patologías relacionadas con los biofilmes: pie diabético, úlceras, heridas quirúrgicas.

- Proponer las posibles soluciones para disminuir o eliminar la aparición de biofilmes en las heridas.
- Considerar las nuevas estrategias moleculares para el control de biofilmes y la cicatrización de las heridas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La elaboración de este Trabajo Fin de Grado se ha realizado a partir de la revisión bibliográfica de diferentes fuentes tanto primarias, como secundarias o terciarias tales como las bases de datos:

- PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>),
- MedlinePlus (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>)
- Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>)
- Web of Science (<https://login.webofknowledge.com>)
- Scielo (<https://scielo.conicyt.cl/>)
- Bucea (<https://biblioteca.ucm.es>)
- Cisne (<https://biblioteca.ucm.es/cisne>)
- Google Académico (<https://scholar.google.es>)
- Elsevier (www.elsevier.com)

Las **palabras clave** de búsqueda fueron: *biofilmes, Pseudomonas aeruginosa, infecciones, heridas, antibióticos, wound healing, resistencias, biofilm chronic wound microbiology, microbial ecology, molecular diagnostics.*

Se consultaron documentos publicados por organismos oficiales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los fondos de la biblioteca de la Facultad de Farmacia, libros de Microbiología General y Clínica, además de Guías Especializadas.

Así mismo, se ha utilizado el buscador *Google Académico* y su versión en inglés, así como la herramienta BUCea que mediante una única consulta, busca simultáneamente en las múltiples bases de datos y colecciones electrónicas suscritas por la Biblioteca Complutense, así como los documentos incluidos en el catálogo Cisne, en el repositorio institucional *E-Prints* Complutense y en el portal de Revistas Científicas Complutenses.

La bibliografía sigue la Normativa **Vancouver** ⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tipos de heridas y su curación

Las heridas se consideran crónicas cuando no se han curado oportunamente después de 6 semanas de duración, a pesar de las intervenciones realizadas a tal efecto. Las intervenciones incluyen el tratamiento de la infección, desbridamiento de mantenimiento, compresión adecuada (úlceras venosas de la pierna), restauración arterial (úlceras isquémicas), atención adecuada e intervención con respecto a la lesión por presión (PI), descarga en las úlceras del pie relacionadas con la diabetes (DRFU) y el tratamiento de enfermedades sistémicas subyacentes⁽⁷⁾. Pese a que el tratamiento sea correcto, algunas de las heridas agudas no se curan rápida o fácilmente, debido a diversos factores, como la malnutrición, el tabaquismo, la obesidad, las drogas o el alcoholismo, entre otros, pudiendo derivar en heridas crónicas.

Además de estos factores, la infección por *biofilmes* quizás sea la principal causa que retrase la curación de las heridas, especialmente las crónicas (Figura 1)⁽⁸⁾. Se estima que un 60-80% de las heridas crónicas presentan biofilmes⁽²⁾.

En cambio, éstos rara vez aparecen en las heridas agudas, debido al entorno dinámico propio de la herida y la interacción entre las proteínas del huésped y las bacterias que la contaminan, que lleva a la rápida curación de las mismas. Por tanto, la presencia de biofilmes es una de las principales diferencias entre las heridas agudas y crónicas⁽²⁾.



Figura 1. Diversas heridas crónicas. (A) Úlcera arterial en el maleolo lateral. (B) Úlcera estásica venosa. (C) Úlcera del pie diabético. (D) Úlcera por presión⁽⁸⁾.

En general, las heridas cutáneas crónicas tienen la misma clínica que otras infecciones crónicas asociadas a biofilmes. Muchos de los problemas derivados de la gestión del tratamiento, es el mayor costo del mismo; particularmente en el caso de las *heridas basadas en biofilmes*. Este concepto, recientemente introducido, tiene como objetivo prevenir la formación de biopelículas en el tejido de la herida ⁽⁹⁾.

Por otra parte, tanto las heridas agudas como las crónicas se pueden diferenciar inmunohistológicamente, debido a las proteínas del sistema inmunitario características de cada una. Las crónicas parecen estar continuamente en la fase inflamatoria por la gran cantidad de neutrófilos presentes en las mismas, dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales libres y otros mediadores inflamatorios que aumentan el daño en el hospedador. Éstas presentan factores comunes, como son el aumento de citoquinas, de metaloproteasas de matriz (MMP), o actividad celular ⁽¹⁰⁾.

Las **heridas crónicas** tienen diversos orígenes, y según su patogenia pueden clasificarse en varios grupos:

- Las **úlceras venosas** en las piernas se forman por la insuficiencia venosa, dando lugar a hipertensión en los capilares (presión superior a 45 mmHg) y edemas, lo que conduce al desarrollo de una úlcera. El tratamiento por compresión en la pierna, suele ser eficaz para la curación.
- Las **úlceras en pie diabético** se desarrollan por cargas repetitivas en el pie neuropático e isquémico. El tratamiento es la restauración de la circulación sanguínea.
- Las **úlceras por presión** son causadas por una carga sostenida o repetitiva en zonas del cuerpo vulnerables. El tratamiento consiste en aliviar la presión de la zona afectada.

La **cicatrización** de las heridas es un proceso de reparación que consiste en regenerar el epitelio y la dermis con nuevo tejido, constituido sobre todo por colágeno. Se trata de un proceso dinámico y complejo, que consta de diferentes fases.

La **fase inflamatoria** en la que ocurre la limpieza de la herida, se forma un coágulo de fibrina y tiene lugar la hemostasia de la misma. Esta fase se divide en fase proliferativa y fase de remodelación. En la fase proliferativa se produce el tejido de granulación; y en la fase de remodelación se reordena el colágeno a lo largo de la piel cicatrizada.

El proceso de **curación** de las heridas agudas o quirúrgicas, tiene lugar en cuatro fases:

- Coagulación.
- Inflamación.
- Proliferación celular y reparación de la matriz.
- Epitelización y remodelación del tejido dañado.

Las heridas pueden curar de manera habitual, siguiendo las fases de curación mencionadas anteriormente; o pueden pasar a un estado inflamatorio continuo, dando lugar a una necrosis con una inflamación excesiva, que desencadena una gangrena y una colonización microbiana, como ocurre en las heridas crónicas, como, por ejemplo, en el pie diabético (Figura 2) ⁽¹¹⁾.

Cuanto más tiempo permanezca abierta una herida, mayor será el riesgo de que se infecte por diversos microorganismos, lo que a su vez aumenta el riesgo de formación de biofilmes. Debido a la fisiopatología subyacente del paciente y la naturaleza polimicrobiana del entorno de la herida y de los biofilmes, las heridas crónicas tienen un elevado riesgo de desarrollar infecciones ⁽¹²⁾.

Las heridas agudas y crónicas pueden diferenciarse inmunohistológicamente por el conjunto de proteínas del sistema inmunitario presentes en cada tipo. En las heridas **agudas**, hay una retroalimentación positiva de una respuesta humoral no específica durante la fase inflamatoria, y el tipo de células principales son los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los macrófagos y los linfocitos. En las heridas **crónicas**, existe una retroalimentación positiva de las MMP, que impide la cicatrización de la herida. Los **factores** responsables de la cronificación son MMP, TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-1(interleucina 1) e IFN- γ (interferón gamma) ⁽¹⁰⁾.

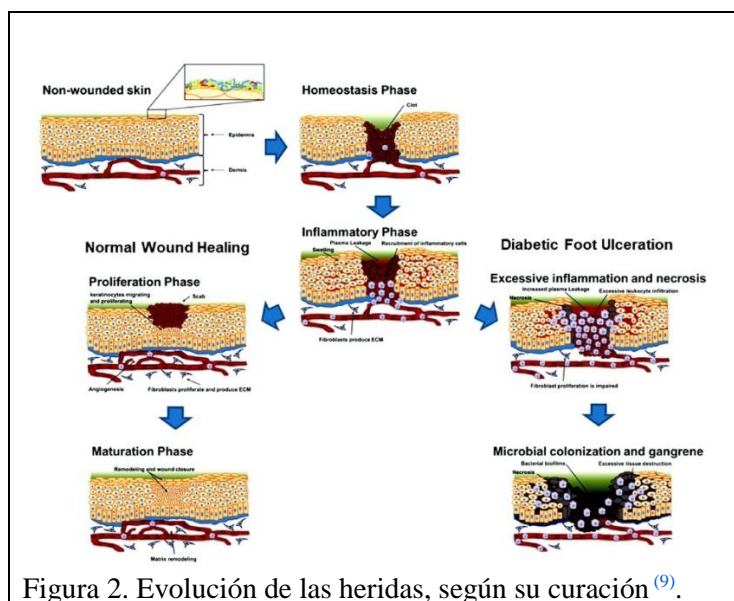


Figura 2. Evolución de las heridas, según su curación ⁽⁹⁾.

Los estudios realizados de heridas agudas *in vivo* muestran que los biofilmes tienen un impacto negativo en las heridas crónicas, ya que retrasan la curación de los tejidos dañados. Esto se debe a la inflamación persistente, la formación de tejido de granulación y la migración epitelial retardada, haciendo que los biofilmes sean la principal causa de la cronicidad de las heridas. Éstos se asocian a una proliferación aumentada de queratinocitos y son un reservorio de infecciones en las mismas (Figura 3) ⁽⁹⁾, tanto si se trata de biofilmes formados por una única especie bacteriana como polimicrobianos, siendo éstos más resistentes a los tratamientos ⁽¹³⁾.



Figura 3. Curación de una herida metatarsiana en 4 semanas, tras la eliminación del biofilme⁽⁹⁾.

4.2. Características de los biofilmes

Los microorganismos pueden adoptar diversos estados o formas de vida, según formen o no parte de un biofilme:

1. Estado **planctónico o libre**, en el que las bacterias se encuentran independientes.
2. Estado es **sésil**, en el cual las bacterias forman agregados.
3. Estado es **cuasi-sésil**, en el que existe una adhesión reversible o un estado de transición entre los dos primeros estados.

Los microorganismos planctónicos pueden encontrarse en una amplia variedad de medios líquidos o fluidos; pero los microorganismos suelen tender a estar unidos o adheridos unos a otros, formando colonias bacterianas y dando lugar a biofilmes⁽¹⁴⁾.

Los biofilmes son comunidades de microorganismos que se encuentran adheridos a una superficie, o formando agregados, que se encuentran rodeados por una **matriz extracelular**. La matriz extracelular, conocida como sustancia polimérica extracelular (**EPS**), está constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y glicoproteínas, aunque también por ácidos nucleicos (como el DNA, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*). En este estado, las bacterias son capaces de crear un ambiente destinado a su protección y resistencia. Se forman a través de diferentes etapas en las que las bacterias se van agregando y formando dicha matriz extracelular, englobándose en la misma para aumentar su resistencia a las condiciones ambientales (Figura 4)⁽¹²⁾.

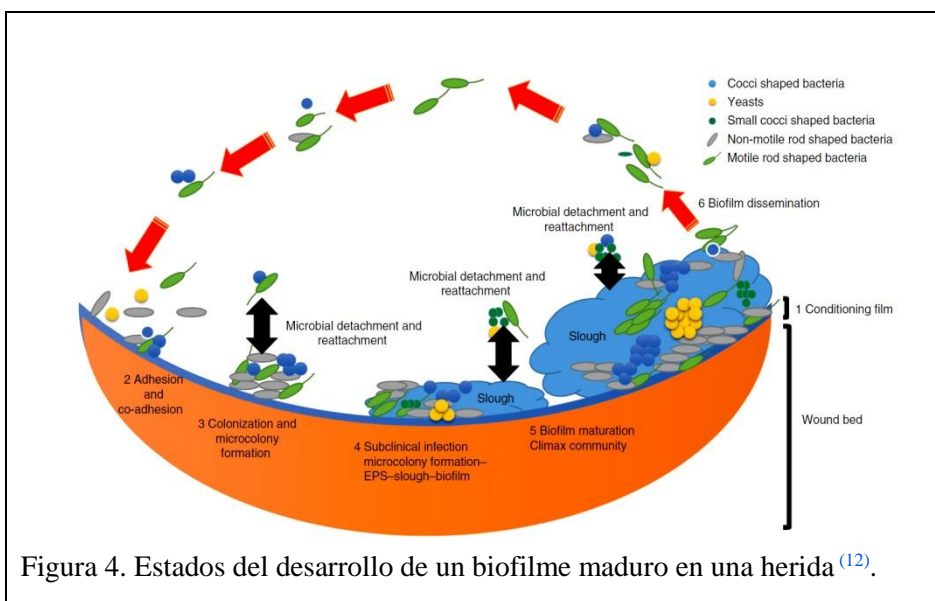


Figura 4. Estados del desarrollo de un biofilme maduro en una herida⁽¹²⁾.

Cada biofilme posee unas características determinadas, que lo hacen actuar como un organismo: posee canales de fluidos, responde a estímulos externos e internos, y muestra respuestas a los mismos. Por lo tanto, un biofilme *patógeno* constituye un verdadero reto para el sistema inmunitario del huésped y de los compuestos quimioterápicos. Pero también pueden ser biofilmes *benignos*, formados por bacterias comensales que conviven con el huésped y le proporcionan beneficios, como es la microbiota intestinal, que protege al organismo de posibles enfermedades e infecciones. No obstante, éstos pueden convertirse en patógenos como consecuencia de un cambio en la expresión génica produciendo enzimas líticas, cambios en el EPS, aumentando la proliferación bacteriana o la resistencia a los antimicrobianos. Esto hace que la respuesta inmunitaria del huésped se incremente notablemente y dé lugar contribuyendo a la inflamación crónica ⁽¹⁴⁾.

4.3. Importancia de la Diabetes Mellitus y las heridas crónicas

Una de las enfermedades más estrechamente relacionada con la aparición de heridas crónicas es la **Diabetes Mellitus (DM)**. Es la enfermedad endocrina más prevalente en todo el planeta, al menos un 10% de la población global adulta padece esta enfermedad. En estos pacientes, las heridas crónicas son muy frecuentes, debido a una respuesta inmunitaria deteriorada. Esto da lugar a graves infecciones que frecuentemente puede terminar en una amputación, sobretodo de los miembros inferiores. Cualquier lesión insignificante, en una persona diabética, puede dar lugar a una herida crónica muy difícil de curar, que incluso puede llevar a la muerte.

Las lesiones más comunes e importantes en diabéticos son las úlceras en los pies, lo que se denomina **úlceras de pie diabético (DFU)**. Son heridas muy difíciles de curar y suelen requerir hospitalización con tratamientos específicos más agresivos, e incluso la amputación en la mitad de los pacientes con este tipo de heridas ⁽¹¹⁾.

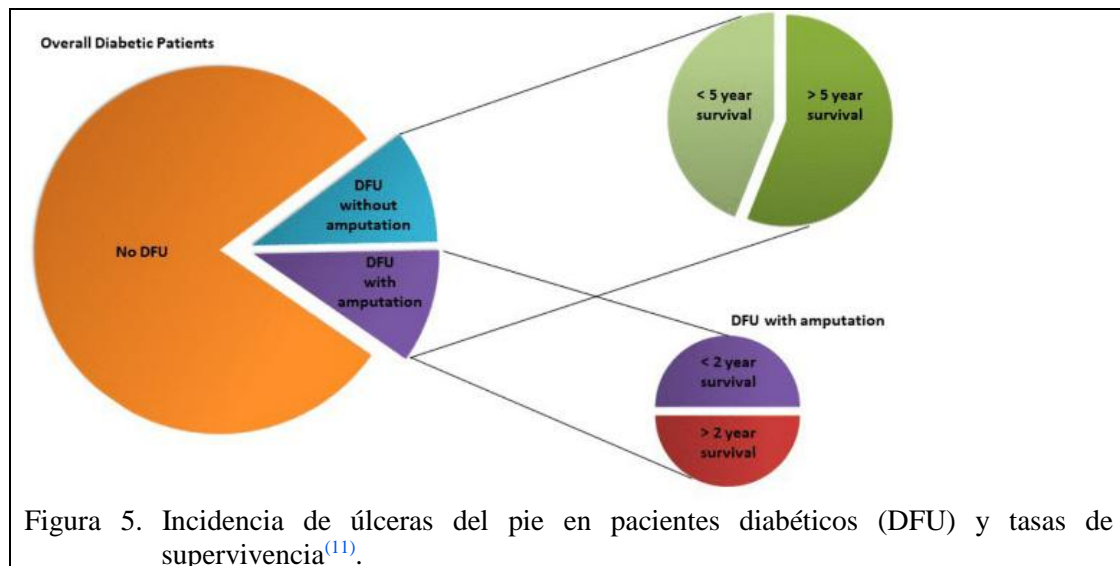


Figura 5. Incidencia de úlceras del pie en pacientes diabéticos (DFU) y tasas de supervivencia⁽¹¹⁾.

Aunque las úlceras de pie diabético (DFU) no tienen una elevada incidencia en los pacientes diabéticos, la mayoría de pacientes que sufren DFU tienen una probabilidad de supervivencia de 2 a 5 años, por lo que deben mantener unos cuidados periódicos en los pies (Figura 5) ⁽¹¹⁾.

Las DFU son habitualmente polimicrobianas, pudiendo formar parte diversos géneros: *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, y algunos de la familia *Enterobacteriaceae*. La especie predominante en bacterias Gram positivas es *Staphylococcus aureus*, y en Gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* ⁽¹⁵⁾.

4.4 Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa* en las heridas crónicas producidas por biofilmes

La resistencia producida en las infecciones producidas por biofilmes de *P. aeruginosa* es muy importante, principalmente infecciones urinarias y pulmonares ⁽¹⁶⁾.

El desarrollo de la resistencia antimicrobiana es muy importante en las infecciones causadas por biofilmes de esta bacteria, como las infecciones urinarias y del tracto pulmonar. En particular, las infecciones pulmonares que involucran biofilmes de *P. aeruginosa* generalmente se vuelven crónicas en pacientes con fibrosis quística a pesar del tratamiento antibiótico a largo plazo ⁽¹⁷⁾.

Parece ser que los biofilmes de *P. aeruginosa* retrasan la penetración y acción de los antibióticos aminoglucósidos, pero la penetración de fluoroquinolonas (ciprofloxacino, por ejemplo) se produce rápidamente.

Existen diferentes densidades de población bacteriana a lo largo del biofilm, y esto determina diferentes gradientes de disponibilidad de oxígeno y nutrientes en el mismo. Es decir, las bacterias situadas en la periferia del biofilm tienen un mayor acceso al oxígeno y nutrientes que las situadas en el interior. Por tanto, existe diferente actividad metabólica y heterogeneidad en la población microbiana.

Los antibióticos se suelen dirigir principalmente a las células metabólicamente activas, por lo que se cree que la heterogeneidad de la población también conduce a diferente susceptibilidad a los antibióticos.

Además, se ha postulado que las bacterias de crecimiento lento y las que no crecen contribuyen considerablemente a disminuir la susceptibilidad de los biofilmes a los agentes antimicrobianos.

La acción bactericida de los antibióticos beta-lactámicos frente a *P. aeruginosa* en biofilmes se ve afectada a tasas lentas de crecimiento, lo cual corrobora que dicha tasa presenta un importante papel en la mediación de la resistencia en las bacterias del biofilm.

La **disponibilidad de oxígeno** en un biofilme también es un punto interesante en la resistencia a los antimicrobianos, ya que se ha visto que, en ausencia del mismo, se reduce la actividad antimicrobiana de algunos antibióticos. Cabe destacar que se ha visto que *P. aeruginosa* es capaz de formar biofilmes en condiciones anaeróbicas estrictas, requiriéndose genes específicos para ello. Una restricción de oxígeno puede dar lugar a cambios fenotípicos y fisiológicos que aumentan la resistencia a los antibióticos en los biofilmes (Figura 6) ⁽¹⁷⁾.

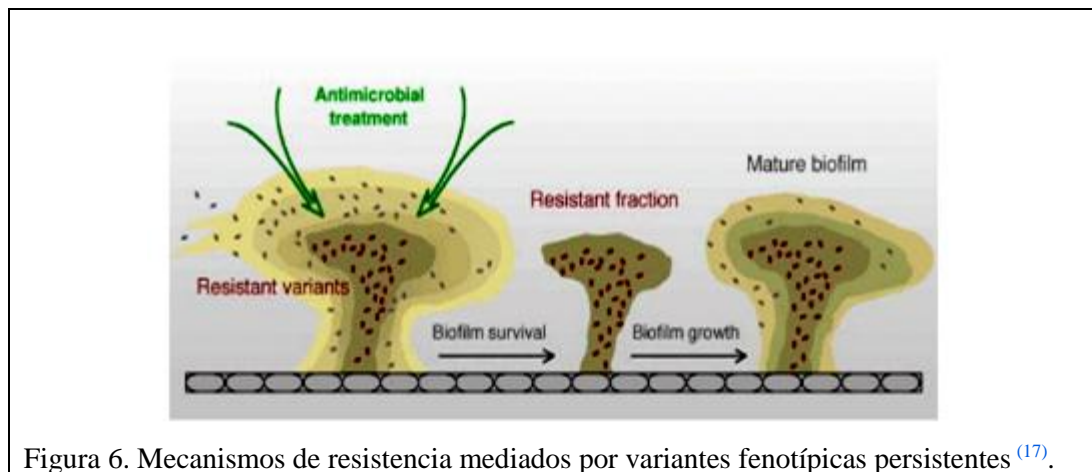


Figura 6. Mecanismos de resistencia mediados por variantes fenotípicas persistentes ⁽¹⁷⁾.

Además, una pequeña fracción de las variantes fenotípicas persistentes (en la figura aparecen como bacterias marrones) sobreviven al tratamiento antimicrobiano, y son capaces de comenzar el desarrollo del biofilme una vez la terapia se suspende ⁽¹⁷⁾.

Durante estadios tempranos del desarrollo del biofilme, ocurren cambios en la expresión génica para incrementar la resistencia del mismo. Cuando va madurando, aumenta la densidad celular y crea gradientes de disponibilidad de oxígeno y nutrientes, como ya se ha mencionado, y se activa el sistema *quorum sensing*.

Asimismo, las **condiciones ambientales** también inducen cambios fenotípicos que inducen mecanismos de resistencia del biofilme.

Se concluye, por tanto, que el estudio de los mecanismos de la resistencia de los biofilmes a los antibióticos es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos para erradicar los biofilmes ⁽¹⁷⁾.

La **fase de crecimiento** del biofilme se produce por la habilidad sinérgica de diferentes bacterias de colaborar juntas para adherirse a la matriz polimérica por *quorum sensing*. Este proceso es un mecanismo de regulación de la expresión génica en función de la densidad celular y regula distintas actividades fisiológicas, como la simbiosis, virulencia o formación de biofilmes.

Por otro lado, la **fase de desprendimiento** de la matriz del biofilme se considera pasiva por la erosión y el desbridamiento de la misma.

Se piensa que la habilidad de las bacterias en participar en *quorum sensing* puede estar relacionada con mutaciones en genes que causan que la bacteria se modifique a una bacteria formadora de biofilmes.

La concentración de **hierro** es importante, ya que se ha visto que bajas concentraciones del mismo inducen aproximadamente una cuarta parte de los genes relacionados con *quorum sensing*.

La mera presencia del biofilme produce un impedimento mecánico en los procesos de curación de la herida, como la contracción o epitelización. Por otro lado, también causa un impedimento en la regulación de las proteínas inflamatorias por afectar a la señalización intracelular de las mismas ⁽²⁾.

La presencia de tejido no viable en una herida crónica es una barrera que impide la curación efectiva de la misma.

Por tanto, remover dicho tejido facilita la curación y reduce posibles zonas de colonización de microorganismos, reduciendo el riesgo de infección y de formación de biofilmes. La técnica más conocida es el desbridamiento de heridas, proceso necesario para la curación de heridas.

El **tejido necrótico** es una barrera para la curación, ya que dicho tejido posee elevado número de neutrófilos y moléculas pro-inflamatorias como IL-8; comparado con una herida quirúrgica aguda, que tiene elevados niveles de factores de crecimiento como EGF (factor de crecimiento epidérmico).

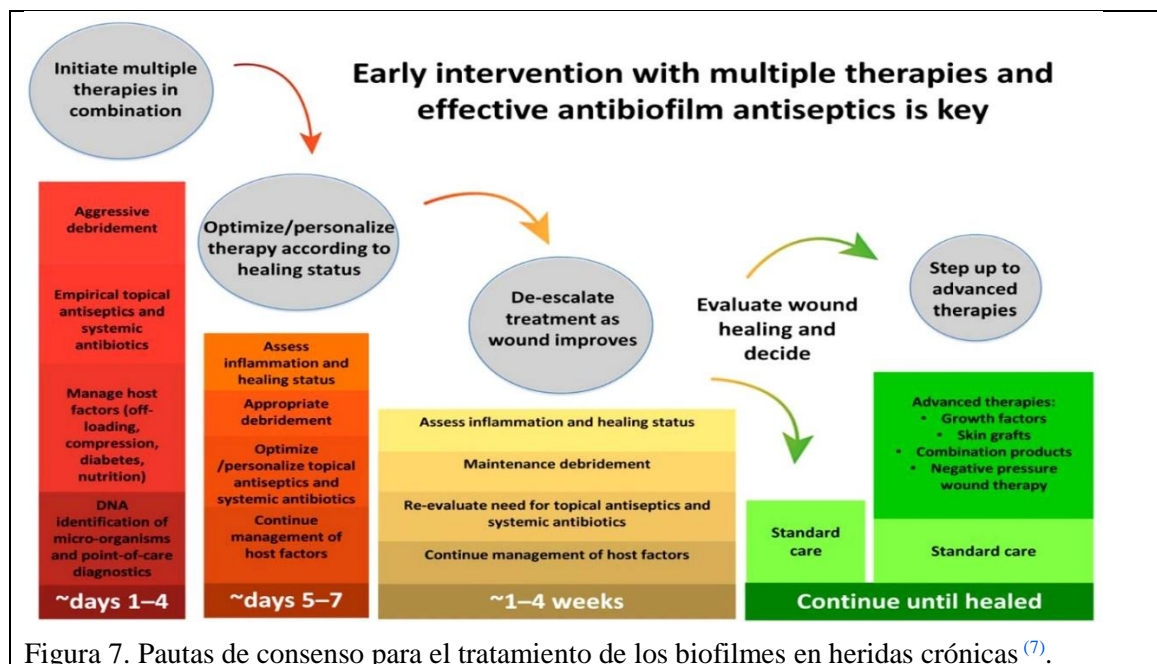
El **desbridamiento** de este tipo de tejido necrótico es vital para conseguir revertir la herida crónica en herida aguda, con una curación más factible.

Otro tipo de fenómeno que puede ocurrir en heridas crónicas es la formación del *esfacelo*, que es un tejido infectado de color amarillento compuesto fundamentalmente de fibrina, pus, leucocitos, células muertas y vivas, y microorganismos. Se encuentra en un estado de inflamación continuo, y es un ambiente muy favorable para la formación de biofilmes; de hecho, se puede considerar un biofilm macroscópico ⁽¹⁸⁾.

Como consecuencia, hay que tener en cuenta los diversos métodos o agentes utilizados para el tratamiento de heridas que contienen biofilmes.

4.5 Principales tratamientos de las heridas causadas por biofilmes

En 2017, el Panel Global de Expertos de Biofilmes en Heridas publicó una *Guía de Consenso* para la identificación y tratamiento de biofilmes en heridas crónicas de difícil curación⁽⁷⁾. Dicho documento pretende aclarar malentendidos sobre la importancia de los biofilmes en la práctica clínica, y propone un *tratamiento escalonado* para este tipo de heridas; según el cual, la intervención temprana con terapias múltiples y antisépticos antibiofilmes eficaces es la clave para el éxito de la curación (Figura 7) ⁽⁷⁾.



Los tratamientos principales para eliminar a los biofilmes se pueden separar en dos grupos: desbridamiento mecánico y desbridamiento químico; y antibioterapia.

El **desbridamiento mecánico** tiene por objetivo eliminar completamente el tejido necrótico y el biofilme en el lecho de la herida, pero dejando intacto el tejido sano. Se basa en alterar la anatomía de la herida, eliminando la piel y tejido muerto, incluyendo hueso y esfacelo.

Uno de los métodos mecánicos más utilizados es la **hidrocirugía**, que es selectiva del tejido y aplica agua estéril salina a presión en la herida. Además, provoca el desbridamiento completo del lecho de la herida, debido al corte y aspiración del tejido blando necrótico.

También son efectivos la estimulación por **radiofrecuencia** y **pulsos eléctricos**, que mejoraban la curación comparados con controles.

En cuanto al uso de **apósitos** en las heridas, controlan la humedad del lecho de la herida, y además la protegen de factores externos que pueden retrasar la curación de la misma.

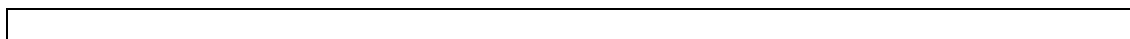
Una herida con exudado requiere un apósito que elimine la humedad, y una herida sin exudado requiere un apósito que retenga la humedad y minimice su secado. Por ejemplo, la presión negativa como tratamiento de heridas es efectiva para controlar la humedad en zonas de la herida con exudado.

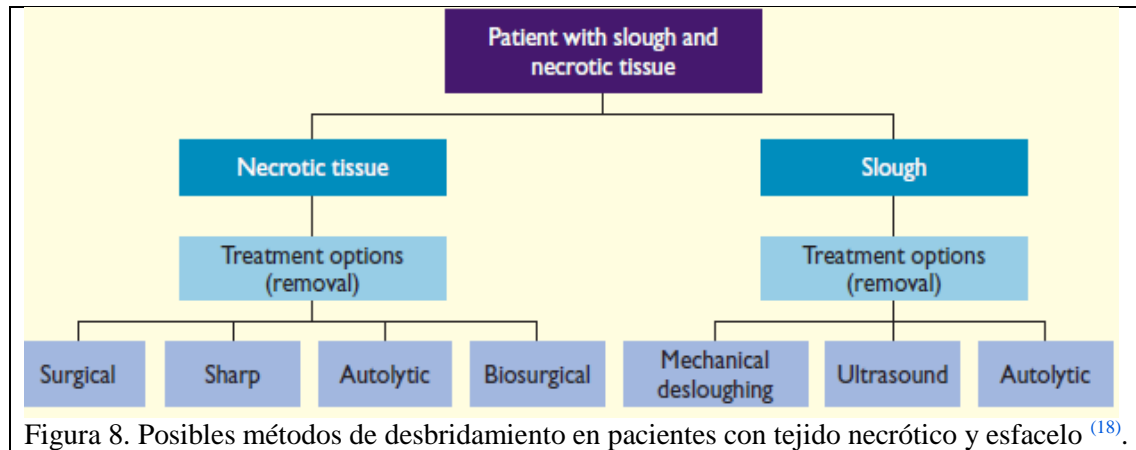
Otro tipo de cobertura de la herida es el uso de una **larva** denominada *Lucilia sericata*, que produce un desbridamiento específico en el tejido no viable, e inhibe las respuestas inflamatorias de los fagocitos, además de promover la reestructuración del tejido.

En cuanto al **desbridamiento químico**, existen diferentes tipos dentro del mismo:

- En primer lugar, el **desbridamiento autolítico** usa apósitos con sustancias que ayudan a que el organismo utilice su sistema inmunitario para eliminar los residuos de la herida. Son agentes que mantienen la herida húmeda, y ayudan a que la fagocitosis y el desbridamiento ocurran de forma natural. Algunos de estos agentes son hidrogeles, hidrocoloides o apósitos semioclusivos.
- En segundo lugar, el **desbridamiento enzimático**, que utiliza agentes químicos para ayudar al cuerpo a digerir el tejido necrótico.
- En tercer lugar, el **desbridamiento antimicrobiano** es muy variado, ya que hay agentes tópicos o apósitos impregnados. La plata iónica se utiliza por su interferencia con el sistema de transporte electrónico de la bacteria y las membranas plasmáticas. Pero en el uso de biofilmes requiere concentraciones de 10 a 100 veces mayores que en organismos simples. Otro agente utilizado es el yodo, que es muy efectivo frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y a otros patógenos. También se utilizan muchos otros, como la clorhexidina, polihexamida, triclosán o galio ⁽²⁾.

Para elegir el método de desbridamiento, sería adecuado tener en cuenta si se trata de tejido necrótico o de *esfacelo* (restos inflamatorios y necróticos de tejidos), que deben extirparse en procesos infecciosos e inflamatorios para facilitar la limpieza quirúrgica y la cicatrización., ya que tienen características diferentes y a cada tipo de herida requiere un tratamiento distinto (Figura 8) ⁽¹⁸⁾.





Por último, existe un tercer método que es la **antibioterapia**.

El tratamiento con antibióticos en heridas es controvertido. El uso clásico de antibióticos orales para heridas crónicas no es deseable dada su baja eficacia (25-30%), a no ser que haya infección local y sistémica. Por otro lado, si en la herida hay dolor, induración y bacteriemia, sí puede justificarse su uso.

Por otro lado, sí se utilizan normalmente antibióticos tópicos en biofilmes y heridas crónicas. Se ha demostrado que son útiles en el tratamiento antibacteriano; pero en biofilmes sin ningún tratamiento anterior -como el desbridamiento- no son eficaces. Esto ocurre porque los biofilmes son mil veces más resistentes que los microorganismos libres o planctónicos ⁽²⁾.

Un aspecto importante es la **resistencia a los antibióticos**.

La resistencia de los biofilmes a los antibióticos se puede explicar por tres motivos.

- En primer lugar, el **glicocálix** (sobre todo el alginato) impide mecánicamente el acceso de los antibióticos a las bacterias dentro del biofilme.
- En segundo lugar, las bacterias del biofilme suelen encontrarse en estado de **senescencia**, lo que hace que algunas actividades del antibiótico no tengan efecto alguno.
- En tercer lugar, si un antibiótico penetra en el biofilme, se puede **modificar su estructura** por el pH del biofilme y la biodisponibilidad del fármaco disminuye ⁽²⁾.

Además, las bacterias pueden ser resistentes a los antibióticos por diversos mecanismos, que se dividen en dos tipos ⁽¹⁹⁾:

- **Mecanismos intrínsecos:** propiedades innatas de una especie, suelen producirse por la ausencia de un lugar de acción del antibiótico, o diferencias en la pared celular.

La diferencia estructural de las bacterias Gram positivas y Gram negativas en su pared celular es muy importante para los mecanismos de resistencia. La membrana externa situada en las bacterias Gram negativas impide la entrada al interior de la bacteria de muchos antibióticos, lo que aumenta su grado de resistencia hacia los mismos.

La reducción de entrada de los antibióticos también está regulada por la exportación activa, como pueden ser bombas de flujo de múltiples fármacos.

- **Mecanismos extrínsecos:** son los adquiridos posteriormente, como las mutaciones o transferencia horizontal (mediada por plásmidos) o vertical (por otras bacterias) de material genético. Se pueden clasificar en tres tipos:
 - o En primer lugar, las bacterias pueden **mutar** para proteger o modificar la estructura de la diana del antibiótico. Por ejemplo, las fluoroquinolonas tienen como diana la ADN-girasa de las bacterias Gram negativas, y si se muta ese lugar de acción o se modifica, aumenta su resistencia.
 - o En segundo lugar, las bacterias pueden fabricar distintas **enzimas**, para inactivar el antibiótico y no realice su mecanismo.
 - o En tercer lugar, se puede reducir la **permeabilidad** de la pared celular al inhibir la producción de porinas para disminuir los puntos de acceso al interior de la célula, impidiendo así la entrada del antibiótico ⁽¹⁹⁾.

4.6 Estrategias novedosas para el tratamiento de las heridas producidas por biofilmes

Dada la elevada resistencia de numerosos microorganismos patógenos a los antibióticos, se plantea un problema para la curación de heridas crónicas. Por ello, se está avanzando en la investigación de alternativas terapéuticas innovadoras para erradicar la formación de biofilmes, como los péptidos antimicrobianos o las nanopartículas.

4.6.1. Péptidos antimicrobianos (AMP)

Las infecciones de la piel y tejidos blandos se producen principalmente por los patógenos **ESKAPE**: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp., las bacterias más resistentes y recalcitrantes a los antibióticos, hoy en día.

Actualmente, se ha producido un aumento significativo de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos administrados por vía tópica, por lo que se ha centrado la investigación en los péptidos antimicrobianos (AMP).

Los AMP se consideran una buena opción innovadora, ya que realizan **diversas acciones**:

- Amplio espectro antimicrobiano.
- Bajas tasas de resistencia.
- Actividad inmunomoduladora.
- Actividades que aceleran la curación de las heridas: angiogénesis, proliferación y migración celular.

Los AMP endógenos están formados a partir de pro-péptidos inmaduros, que para ser biológicamente activos y maduros se tienen que escindir proteolíticamente. Por ejemplo, dos de los AMP mejor caracterizados en humanos (catelicidina LL-37 y las defensinas) se fabrican a partir de diferentes células (macrófagos, neutrófilos, queratinocitos y otras).

Los AMP son componentes conservados del sistema inmunitario innato de especies, desde las menos a las más evolucionadas.

Se conocen diversos péptidos naturales que, a pesar de su variabilidad estructural, comparten determinadas características básicas que determinan su mecanismo de acción.

Casi todos los AMP tienen un pequeño tamaño (12-50 aminoácidos) y una carga neta positiva, además de la mitad de residuos hidrofóbicos, que permiten que se pliegue en una conformación anfifílica cuando interactúan con las membranas bacterianas.

Esta estructura es primordial para su mecanismo, porque la interacción electrostática producida al inicio entre los péptidos catiónicos y la membrana bacteriana aniónica no es suficiente para realizar su actividad antibiótica.

Además, se necesita que se inserte en la membrana lipídica bacteriana, dando lugar a la formación de canales iónicos, poros transmembrana o ruptura de la membrana bacteriana. Es decir, los AMP deben cumplir una serie de parámetros que determinan su actividad por vía tópica frente a los biofilmes (Figura 9) ⁽²⁰⁾.

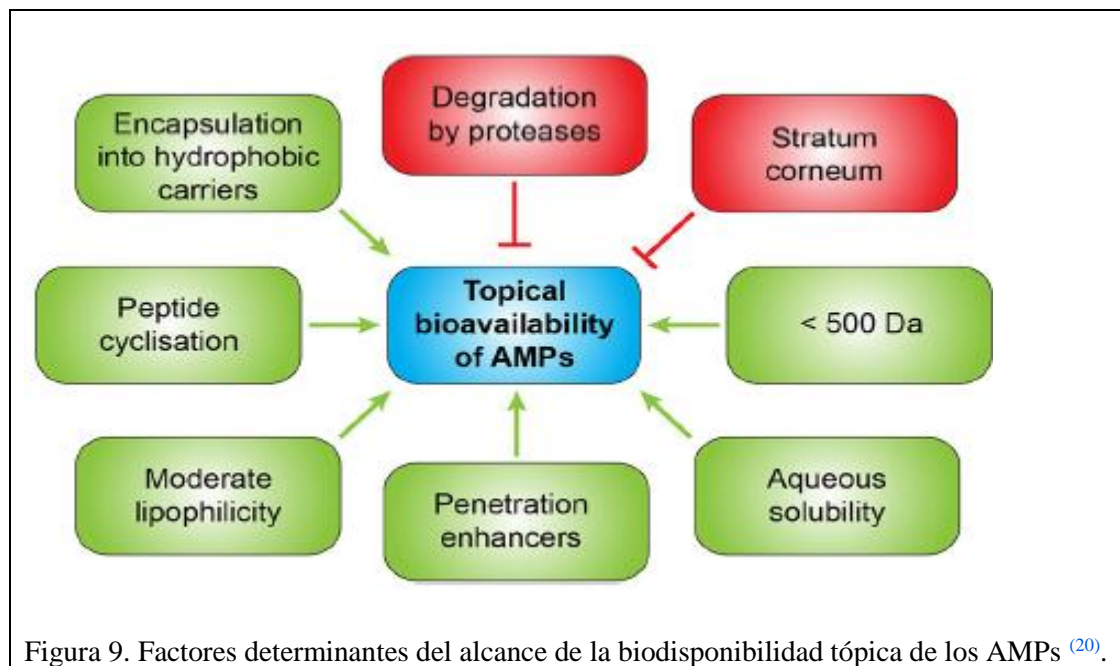


Figura 9. Factores determinantes del alcance de la biodisponibilidad tópica de los AMPs ⁽²⁰⁾.

Generalmente, una mayor carga positiva facilita la interacción de los AMP con la pared bacteriana, pero por otro lado aumenta la actividad hemolítica. Por tanto, si se disminuye la hidrofobicidad de los AMP se puede disminuir la actividad hemolítica.

Para el tratamiento de las heridas infectadas, los AMP deben ser poco citotóxicos y tener un amplio espectro de acción, además de ayudar a la cicatrización de la herida y ser estables en el entorno del hospedador, con elevadas concentraciones de sales y en presencia de proteasas del hospedador.

Por ejemplo, las heridas de la piel causadas por *Staphylococcus aureus* cursan con una inflamación excesiva, por lo que agravan la infección. Para combatir esto, los AMP tienen propiedades antiinflamatorias, que son beneficiosas para la curación de heridas crónicas y heridas con difícil curación, como úlceras de pie diabético ⁽²⁰⁾.

4.6.2. Nanopartículas

Uno de los campos de investigación en auge en Nanomedicina, como alternativa a la antibioterapia clásica y dirigida a la disminución de las multirresistencias bacterianas, es la utilización de metales y óxidos metálicos incluidos en nanomateriales por su actividad

antibacteriana (21); y el desarrollo de nanopartículas de antibióticos y metales, particularmente activas frente a biofilmes (22).

Los nanomateriales metálicos desencadenan la liberación de iones de metales pesados que se intercalan entre las bases de los ácidos nucleicos, dañan las proteínas celulares, interrumpen la señalización celular, generan radicales libres y previenen la formación de biofilmes (Figura 10) (21).

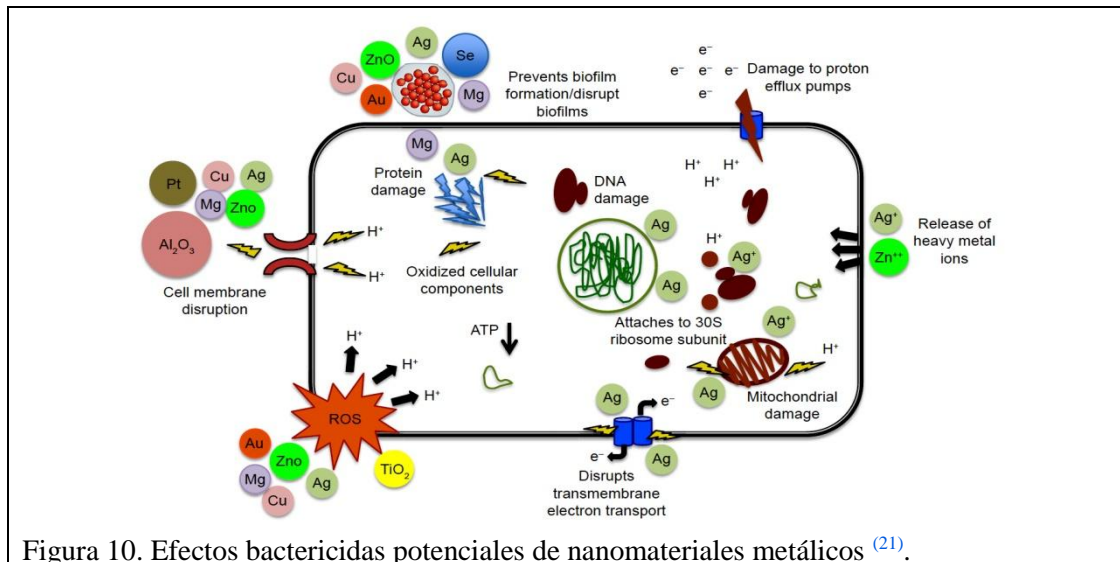


Figura 10. Efectos bactericidas potenciales de nanomateriales metálicos (21).

En cuanto a la difícil curación de las heridas crónicas relacionadas con biofilmes y bacterias intracelulares, se investigó el uso de nanopartículas de oro “decoradas” con fosfatidilcolina, y cargadas con gentamicina (GPA NP) (Figura 11) (22).

Se generaron GPA NP que mantuvieron su actividad antibiótica contra las bacterias libres individuales, pero eran más efectivos contra los biofilmes e inhibían el crecimiento de microorganismos patógenos en los mismos.

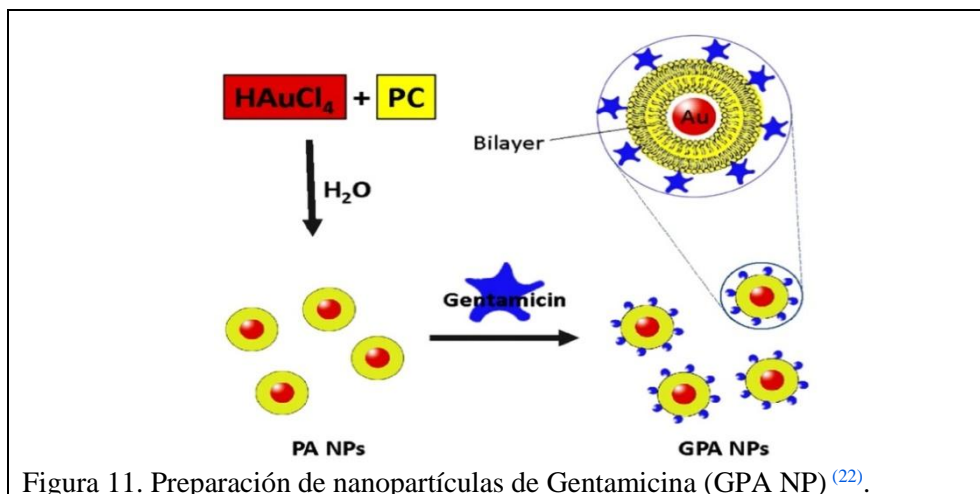


Figura 11. Preparación de nanopartículas de Gentamicina (GPA NP) (22).

Debido a los problemas graves que provocan los biofilmes, es necesario mejorar los tratamientos y la capacidad de penetración de los antibióticos al interior del biofilme. Por ejemplo, el uso de los nanomateriales para suministrar de forma eficaz los antibióticos es un tipo de tratamiento bien documentado actualmente, eficaz frente a biofilmes de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Las infecciones producidas por bacterias intracelulares dan lugar a enfermedades graves, como la tuberculosis. De hecho, de cada tres tratamientos con antibióticos, dos son ineficaces. Por ejemplo, las fluoroquinolonas y los macrólidos entran bien en las células, pero se retienen poco tiempo en el interior de las mismas; y por otro lado, los β -lactámicos entran con dificultad por ser hidrófilos.

Cabe destacar la función de los macrófagos en el sistema inmunitario contra las bacterias en una infección, por lo que son una diana apropiada para estos patógenos. Además, éstos fagocitan las nanopartículas (NP), por lo que son un buen vector para administración de los antibióticos contra las bacterias intracelulares⁽²²⁾.

5. CONCLUSIONES

1. El desarrollo de biofilmes en heridas y dispositivos quirúrgicos son de gran importancia clínica y sanitaria, ya que se encuentran implicados en un gran porcentaje de infecciones microbianas.
2. Los biofilmes dan lugar por diversos mecanismos a una elevada resistencia a los antibióticos, lo que conlleva a la búsqueda de tratamientos alternativos y novedosos, como las nanopartículas o los péptidos antimicrobianos.
3. La Diabetes Mellitus es una enfermedad muy prevalente, y conlleva un especial cuidado con las heridas, ya que suelen cronificar, como el pie diabético.
4. Los biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* tienen gran importancia clínica, ya que son multirresistentes a los antimicrobianos y requieren de un tratamiento complejo para su eliminación.
5. Los tratamientos convencionales frente a los biofilmes, como pueden ser el desbridamiento o la antibioterapia, suelen ser más eficaces en conjunto que individualmente frente a los biofilmes. Uso de terapias combinadas.
6. El uso de terapias innovadoras como los péptidos antimicrobianos o las nanopartículas, suponen un avance muy importante en la curación de las heridas crónicas, así como la eliminación de los biofilmes en las mismas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kamaruzzaman NF, Tan LP, Mat Yazid KA, *et al.* Targeting the Bacterial Protective Armour; Challenges and Novel Strategies in the Treatment of Microbial Biofilm. *Materials* (Basel, Switzerland). 2018; 11 (9).
2. Black CE, Costerton JW. Current Concepts Regarding the Effect of Wound Microbial Ecology and Biofilms on Wound Healing. *Surg Clin N Am* 2010; 90:1147–1160.
3. Hurlow J, Blanz E, Gaddy JA. Clinical investigation of biofilm in non-healing wounds by high resolution microscopy techniques. *Journal of wound care*. 2016; 25 (9): 11-22.
4. Blanchette KA, Wenke JC. Current therapies in treatment and prevention of fracture wound biofilms: why a multifaceted approach is essential for resolving persistent infections. *Journal of bone and joint infection*. 2018; 3 (2): 50-67.

5. Patrias K, Wendling D (Technical editor). Citing Medicine (2nd edition). The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers. Bethesda: National Library of Medicine (US); 2007.
6. ICMJE. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. April 2010.
7. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, Leaper DJ, McBain AJ, *et al.* Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound repair regen.* 2017; 25 (5): 744-757.
8. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2008; 58 (2): 185-206.
9. Wolcott R. Economic aspects of biofilm-based wound care in diabetic foot ulcers. *Journal of wound care.* 2015; 24 (5): 189-90.
10. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen Pø, Madsen KG, *et al.* Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound repair regen.* 2008; 16 (1): 2-10.
11. Pereira SG, Moura J, Carvalho E, Empadinhas N. Microbiota of chronic diabetic wounds: ecology, impact and potential for innovative treatment strategies. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1791.
12. Percival SL. Importance of biofilm formation in surgical infection. *The British Journal of Surgery.* 2017; 104 (2): 85-94.
13. Rajpaul K. Biofilm in wound care. *British journal of community nursing.* 2015. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2015.20.Sup3.S6>
14. Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and Wounds: An Overview of the evidence. *Adv Wound Care.* 2015; 4 (7):373-381
15. Santos R, Veiga AS, Tavares L, Castanho M, Oliveira M. Bacterial Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Potential alternative therapeutics. 2016. DOI: 10.5772/63085
16. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health.* 2017; 10 (4): 369-378.
17. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and infection.* 2003; 5 (13): 1213-1219.
18. Percival SL, Suleman L. Slough and biofilm: removal barriers to wound healing by desloughing. *Journal of wound care.* 2015; 24 (11): 498, 500-3, 506-10.
19. Hughes G, Webber MA. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *British Journal of Pharmacology.* 2017; 174 (14): 2237-2246.
20. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G (2018). Antimicrobial Peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology.* 2019; 9: 281.
21. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International journal of nanomedicine.* 2017; 12: 8211-8225.
22. Mu H, Tang J, Liu Q, Sun C, *et al.* Potent antibacterial nanoparticles against biofilm and intracellular bacteria. *Scientific reports.* 2016; 18877.