



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: “Nuevas aproximaciones en
Nanomedicina contra bacterias multirresistentes II”**

Autor: Eduardo Alonso González

Fecha: Septiembre de 2020

Tutor: Fernando Herranz Rabanal

1 RESUMEN

Las nanopartículas orgánicas permiten la vehiculización y vectorización de una gran cantidad de principios activos, incrementando de forma notable su semivida plasmática, su especificidad tisular y su bioseguridad.

En este trabajo, y teniendo en cuenta la preocupación generada por la creciente resistencia a los antibióticos, se explicarán las características generales de las nanopartículas orgánicas, los tipos de nanopartículas orgánicas utilizadas actualmente, y se expondrán los avances más recientes registrados con cada una de ellas, en el campo de las infecciones bacterianas multirresistentes. Se estudiará la capacidad de los liposomas, nanopartículas poliméricas y micelas para vehicular y vectorizar antibióticos convencionales o sustancias antibióticas no convencionales a las zonas infectadas, y como ese proceso repercute en la supervivencia de las colonias bacterianas.

2 INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es, a día de hoy, una de las mayores amenazas para la salud, y las infecciones pulmonares son la tercera causa de muerte a nivel mundial ^{1,2}. Es urgente encontrar alternativas a los antibióticos convencionales para poder hacer frente a este problema, y, entre otras líneas de investigación, la nanotecnología parece mostrar resultados muy prometedores ³.

Su éxito radica en la gran variedad de nanopartículas poliméricas que pueden emplearse con fines terapéuticos, profilácticos o diagnósticos, en función del tamaño, morfología, composición y recubrimiento superficial de la molécula, ⁴ pudiendo ser ellas mismas las responsables del efecto esperado, o vehiculizando distintos principios activos a la zona deseada⁴.

2.1 Tamaño

El tamaño juega un papel importante a la hora de diseñar una formulación basada en nanopartículas, pues dependiendo de éste, la distribución y adhesión de las mismas, así como sus propiedades, variarán⁴⁻⁶:

- Las partículas con un tamaño superior a $1\mu\text{m}$ son frecuentemente opsonizadas y sufren un aclaramiento esplénico y hepático rápido e intenso, dando lugar a semividas plasmáticas muy bajas⁴.
- Aquellas con un tamaño entre 200nm - $1\mu\text{m}$ sufren un menor aclaramiento hepático. Si el tamaño es superior a 500nm son susceptibles de sufrir fagocitosis en algunos tejidos^{4,7}. Pueden activar el sistema del complemento, se eliminan principalmente por aclaramiento esplénico^{4,5} y su biodisponibilidad oral es muy baja⁶.
- El rango entre 100nm - 200nm es el que ofrece una mayor semivida plasmática. Es el tamaño ideal para formulaciones con tiempos de circulación prolongados, tienen una mejor biodisponibilidad oral, y son capaces de penetrar en algunas células mediante el uso de transportadores pasivos y procesos de endocitosis⁴⁻⁷.
- Entre los 10nm - 100nm se obtiene la mayor velocidad de distribución, biodisponibilidad oral e internalización celular⁴⁻⁷. Además, por debajo de los 50nm , las partículas son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica^{4,5}. Sin embargo, estas partículas pueden ser degradadas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), lo que, sumado a su rápida absorción celular, da lugar a una reducción drástica de su semivida plasmática⁴.
- Por debajo de los 10nm las partículas son demasiado pequeñas, y son rápidamente eliminadas por extravasación o aclaramiento renal^{4,5}.

A la hora de elegir un tamaño de partícula para la formulación, es necesario tener en cuenta que, a menor tamaño, mayores serán la absorción y velocidad de distribución. Por otro lado, también pueden variar la vía de eliminación y el proceso por el cual serán internalizadas en la célula.

2.2 Morfología

Al igual que el tamaño, la morfología de las nanopartículas afectará a la adhesión, absorción y distribución del sistema por el organismo⁴⁻⁷.

Las nanopartículas esféricas (Figura 1) son las más estudiadas, debido a sus propiedades ópticas, su facilidad para modificar su superficie y sus buenas propiedades de distribución, vectorización y absorción generales^{4,7}.

Sin embargo, las partículas asimétricas van ganando cada vez más importancia, pues poseen características únicas de distribución, vectorización, absorción, actividad terapéutica y

semivida plasmática. Poseen una mejor capacidad de autoensamblaje y, en ocasiones, pueden ser más efectivas que las esféricas para patologías o vías de administración concretas^{4,6,8}. Las formas discales (Figura 2) o de varilla (Figura 3) favorecen la absorción por vía oral⁶, y, especialmente las últimas, han destacado por su velocidad de absorción celular en el tratamiento de algunos tipos de cáncer^{4,7,8}. Por otro lado, los mecanismos de acción de estas partículas son también más complejos, por lo que es importante tener en cuenta la posible toxicidad que pueda producirse al utilizar un tipo de partícula u otro⁹.

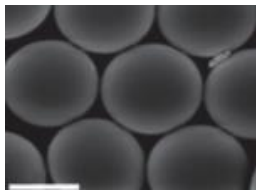


Figura 1: Nanopartícula esférica [4]

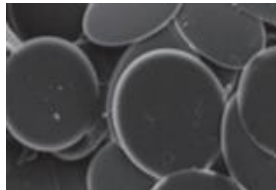


Figura 1: Nanopartícula en forma de disco [4]

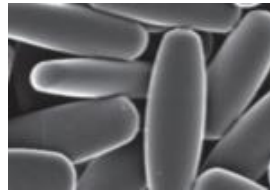


Figura 3: Nanopartícula en forma de varilla [4]

2.3 Recubrimiento Superficial

Otra de las ventajas de la nanotecnología es que ofrece la posibilidad de modificar la superficie de la molécula escogida recubriéndola con diferentes sustancias, alterando sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y su especificidad por la diana a la que se quiera dirigir la formulación^{3,4,14-17,6-13}. Algunos de los métodos para modificar la superficie de la partícula se realizan mediante los siguientes recubrimientos:

2.3.1 Polietilenglicol (PEG)

Muchas de las nanopartículas empleadas en medicina se encuentran cargadas a nivel superficial, lo que puede provocar la unión de proteínas plasmáticas u otras moléculas^{4,6,7,17}, formando la denominada “corona proteica” o “corona biomolecular”^{4,17-19}, que facilita su opsonización y eliminación por parte del SFM^{7,16}, dificulta su reconocimiento por la célula diana¹⁷ y es capaz de interactuar con otras superficies celulares, volviendo los efectos de la formulación impredecibles.

Al recubrir dicha partícula con PEG, un polímero muy hidrosoluble y no cargado^{4,7,17-19}, se neutralizan las cargas superficiales y se evita la adsorción de proteínas y la formación de la corona, de modo que se alarga la semivida plasmática. Sin embargo, el sistema inmune es capaz de producir anticuerpos frente a estas moléculas y, por consiguiente, cuando se produce una segunda administración, las partículas son rápidamente eliminadas por un proceso llamado “aclaramiento sanguíneo acelerado”^{17,18}. Además, las formulaciones PEGyladas tienden a

agregarse en medios con altas concentraciones de sal, aumentando su diámetro hidrodinámico y limitando su acceso a ciertas zonas, así como su excreción por vía renal^{9,19}.

2.3.2 Zwitteriones

Surgen para intentar cubrir las carencias asociadas al polietilenglicol. Son polielectrolitos que contienen grupos cargados tanto positiva como negativamente, resultando en una carga total neutra (Figura 4). Con estas superficies iónicas, se obtiene un recubrimiento con cargas balanceadas (potencial zeta prácticamente cero) que actúa de forma similar al obtenido por PEG, pero con una alta resistencia a amplios rangos de pH y medios con altas concentraciones de sal^{17,19}.

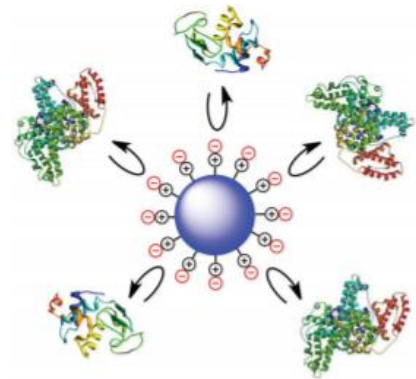


Figura 4: Nanopartícula con cubierta Zwitteriónica [19]

Los recubrimientos zwitteriónicos más estudiados actualmente pueden ser de bajo peso molecular, basados principalmente en aminoácidos, derivados de sulfobetaina y derivados fosfolipídicos, o de alto peso molecular basados en polímeros¹⁹. A pesar de ser muy prometedoras, la mayor parte de las formulaciones con recubrimiento zwitteriónico aún están en proceso de investigación.¹⁷⁻¹⁹.

2.3.3 Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico derivado de la quitina, compuesto por cadenas de N-acetil glucosamina y D-glucosamina, con numerosos grupos funcionales, que pueden ser modificados para numerosas aplicaciones²⁰. Se trata de un polímero especialmente versátil debido a su baja alergenicidad y toxicidad, y alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. De hecho, es el único polímero catiónico biodegradable utilizado en nanotecnología²⁰. Por otro lado, su capacidad para interactuar con las cargas negativas de la pared celular le confiere propiedades antimicrobianas propias. De esta manera, se da una fuerte interacción, facilitando -si lo hubiera- la penetración del principio activo en su interior^{11,20}. Además, el propio polisacárido es capaz de reaccionar con la cadena transportadora de electrones de la membrana celular de la bacteria, esencial para la formación de ATP. Por otro lado, el quitosano de bajo peso molecular es capaz de penetrar en la célula procarionota y unirse al ADN bacteriano, frenando la síntesis proteica, y provocando finalmente la muerte celular²⁰. La capacidad antimicrobiana de este polímero viene determinada por el tipo de quitosano utilizado, el grado de desacetilación y su peso molecular²⁰, aunque puede incrementarse en combinación con algunos compuestos inorgánicos a base de oro y hierro²⁰.

No obstante, el principal interés del quitosano radica en su capacidad para vehiculizar otros principios activos^{11,13,20-22}, especialmente aquellos que también posean actividad antimicrobiana. Este material ha mostrado afinidad por tejidos infectados, propiedades muco-adhesivas (probablemente relacionadas con la alta porosidad del polímero) y capacidad para incrementar la permeabilidad celular, inhibir bombas de eflujo y reducir la toxicidad y otros efectos adversos de los principios activos^{20,22}, además de numerosas posibilidades de liberación y liberación prolongada, como la difusión simple, por hinchamiento previo, o incluso erosión, de la matriz.²⁰

Su tamaño y superficie son a su vez fácilmente modificables,^{4,11,20,22} y esta particularidad, sumada a su baja toxicidad, sus escasos efectos adversos y demás características extraordinarias hacen del quitosano un excelente polímero para formulaciones antimicrobianas^{11,20}.

2.3.4 Materiales sensibles a condiciones externas

Muchas infecciones bacterianas provocan modificaciones de pH o de temperatura en los tejidos donde desarrollan la infección, que no se corresponden con los valores fisiológicos^{4,14-16}. Estas modificaciones en el entorno permiten incrementar la selectividad de la nanopartícula por el tejido infectado al recubrir su superficie con moléculas estables a valores de pH o de temperatura fisiológicos, pero sensibles a ciertas variaciones del medio^{4,8,16}. Un recubrimiento formado por variantes de fosfatidiletanolamina y cadenas insaturadas de acilo, que sean capaces de protonarse ante una bajada de pH, son capaces de desestructurar la bicapa lipídica que conforma la superficie de la nanopartícula, desestabilizándola y provocando la liberación del fármaco en la zona deseada¹⁶. De forma análoga a lo que sucede con el pH, pero utilizando los cambios de temperatura, podremos aumentar la selectividad de la formulación utilizando materiales que sufran algún tipo de cambio conformacional a una temperatura superior a la fisiológica^{4,16}.

2.3.5 Restos específicos

Otra vía de señalización sugiere el recubrimiento superficial de la nanopartícula con biomateriales que reconozcan receptores específicos del organismo, como la apoferritina, capaz de unirse al receptor de ferritina⁷, o la biotina, que favorece la absorción oral del fármaco gracias a su afinidad por los enterocitos⁶. La técnica de recubrir la partículas con restos específicos ofrece innumerables posibilidades, pero para su desarrollo se requieren muchísimos recursos y tiempo.

2.4 Material

Finalmente, se debe tener en cuenta el material utilizado para desarrollar la nanopartícula, pudiendo ser este inorgánico u orgánico. Las nanopartículas inorgánicas están formadas por compuestos metálicos, permiten el desarrollo de formulaciones de muy pequeño tamaño (inferiores a 100nm), pueden vehiculizar otras sustancias sin pérdidas y son capaces de ejercer efectos terapéuticos por sí mismas^{3,7,8,10,11,16,18,20}. Sin embargo, pueden acumularse en tejidos y su mecanismo de acción en ocasiones puede presentar actividad citotóxica tanto frente a células infecciosas como propias, y se precisan muchos recursos para disminuir la toxicidad de la formulación^{9,11}.

Por este motivo, y por presentar una mayor eficiencia en la vehiculización de principios activos¹¹, este trabajo se centrará principalmente en nanopartículas orgánicas.

3 OBJETIVOS

En este estudio se pretende:

- Divulgar información sobre el funcionamiento de los diferentes tipos de nanopartículas orgánicas.
- Demostrar la importancia de vehiculizar determinadas sustancias en medicina.
- Poner de manifiesto la importancia de las nanopartículas orgánicas en el ámbito de la vectorización y bioseguridad.
- Explicar los diferentes métodos por los que las nanopartículas orgánicas son capaces de presentar efectos antimicrobianos sobre bacterias multirresistentes.
- Exponer avances recientes frente a infecciones provocadas por bacterias multirresistentes utilizando como base nanopartículas orgánicas.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio ha sido realizado mediante búsquedas bibliográficas en diversas bases de datos online, destacando PubMed, Elsevier, Springer, ACSpublications, el catálogo Cisne de la UCM y la página web de la Organización Mundial de la Salud. Las búsquedas se realizaron bajo términos como “antimicrobial nanoparticles”, “stealth liposomes and multidrug resistant bacteria”, “organic nanoparticles and multidrug resistant bacteria”, “antimicrobial micelles”, “surface coated nanoparticles” y “nanoparticles targeting”, realizando especial hincapié en los estudios más recientes.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas orgánicas presentan un gran interés en la lucha frente a la creciente resistencia a los antibióticos por algunos tipos de microorganismos patógenos, debido principalmente a que permiten modificar la superficie de sus estructuras fácilmente, confiriéndoles selectividad frente a dianas concretas, capacidad para vehicular compuestos tanto lipófilos como hidrófilos, que van asociadas a una baja toxicidad y porque están conformadas principalmente por materiales biodegradables¹¹. Además, se ha demostrado que la probabilidad de desarrollar resistencias frente al tratamiento es mucho menor en formulaciones vehiculizadas por nanopartículas que en aquellas que contienen el principio activo libre. Dentro de las nanopartículas orgánicas se incluyen los liposomas, las nanopartículas poliméricas, las micelas poliméricas y las nanopartículas basadas en lípidos sólidos^{4,11}.

5.1 Liposomas

Los liposomas son vesículas lipídicas formadas a partir de una (unilamelares) o varias (multilamelares) bicapas cerradas concéntricamente alrededor de un espacio acuoso (Figuras 5 y 6)^{11,23-25}.

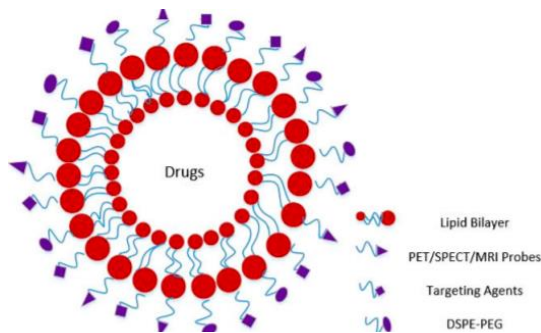


Figura 5: Liposoma funcionalizado unilamelar.[23]

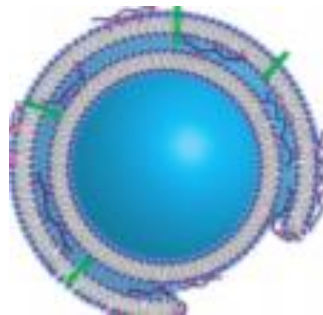


Figura 6: Síntesis de un Liposoma multilamelar [25]

Ofrecen un sistema de vehiculización especialmente atractivo, debido a su versatilidad a la hora de modificar su composición química, estructura, superficie y tamaño en el momento de su fabricación²³. Y si bien su principal inconveniente es que pueden producir la pérdida del principio activo tras un tiempo de almacenamiento prolongado, esto puede corregirse mediante la incorporación de colesterol en su estructura^{26,27}

El proceso de fabricación de liposomas se lleva a cabo sometiendo los componentes de la bicapa a técnicas de liofilización, hidratación o estrusión^{24,28}, aunque el surgimiento de técnicas de encapsulación por microfluidos parece mostrar datos muy prometedores, al permitir la producción de liposomas de tamaño reducido y en lotes muy homogéneos^{21,28-33}.

5.1.1 Liposomas utilizados para incrementar el efecto de antibióticos comunes

Uno de los sistemas utilizados para el tratamiento de bacterias multirresistentes consiste en aprovechar la capacidad de los liposomas para vehiculizar y vectorizar formulaciones, optimizando su distribución y aumentando su tiempo de circulación^{15,33}.

Se han desarrollado distintas formulaciones frente a *P.aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, basadas en la administración de liposomas cargados con antibióticos por vía inhalatoria^{33,34}, destacando principalmente los siguientes:

- Arikayce™: se trata de una formulación que encapsula amikacina acuosa en liposomas de 300nm. Se fabrican a partir de dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol, proporcionando una carga neutra a la superficie nanomolecular, que protege la amikacina, cargada positivamente, frente al ataque de los componentes del esputo, cargados negativamente. Además, la uniformidad y el pequeño tamaño de los liposomas permite a la formulación atravesar la biopelícula formada por *P.aeruginosa*, optimizando el efecto del antibiótico^{34,35}, todo ello sin que se incremente su toxicidad frente a la droga libre³³⁻³⁵. También podría tener aplicaciones en el tratamiento de infecciones no tuberculosas mycobacteriales³⁴.
- Lipoquin™ y Pulmaquin™: son formulaciones comercializadas del ciprofloxacino, encapsulado en liposomas cargados negativamente y recubiertos con PEG para su administración oral e intravenosa, capaces de atravesar la biopelícula formada por *P.aeruginosa* y penetrar en macrófagos infectados por *M.avium*^{33,34}. La única diferencia entre ambas formulaciones es que Pulmaquin™ contiene una segunda dosis de ciprofloxacino disuelta junto a los liposomas, de modo que se produce rápidamente un primer pico de concentración de antibiótico en el pulmón³⁴.

Al mismo tiempo que se emplean liposomas para optimizar la penetración y distribución de la formulación en el tejido infeccioso incrementando su efecto, se puede introducir un tercer elemento que potencie el efecto antibiótico¹⁷:

- La meningitis bacteriana es una enfermedad con una elevada mortalidad, que puede ser provocada por distintas cepas bacterianas, muchas de ellas resistentes a los antibióticos convencionales, como pueden ser *S.pneumoniae*, *E.coli* y *S.aureus*-meticilin-resistente(SAMR)³⁶. En 2017, Bartomeu et al.³⁶ desarrollaron una formulación a base de liposomas fusogénicos. Este término hace referencia a aquellos liposomas que contienen lípidos capaces de desestabilizar las membranas bacterianas en condiciones ambientales específicas, como el pH ácido, facilitando la perfusión de otras moléculas

al interior celular³⁶. En este estudio concreto, los liposomas fusogénicos expresaban en su superficie péptidos con acción penetrante celular, como los péptidos Tat₄₇₋₅₇, derivados de la proteína Tat del VIH y vehiculizaban meticilina, vancomicina o ampicilina frente a SAMR, *S.pneumoniae* o *E.coli* respectivamente. Al comprobar el resultado, se comprobó que todas las formulaciones a base de liposomas presentaban una menor toxicidad que aquellas en las que sólo se empleaba la droga libre. Además, en el caso de SAMR, se observó una reducción bacteriana del 96% cuando se empleaba la formulación basada en liposomas, frente a un 40% cuando se utilizaba meticilina libre. Sin embargo, no se registró un aumento de la actividad antimicrobiana en caso de *E.coli*.³⁶

- Las biopelículas protegen a numerosos microorganismos de los antibióticos, tanto por generar una barrera física difícil de penetrar^{15,33-35,37} como por la capacidad de inactivar el fármaco mediante enzimas, reacciones de quelación y bombas de eflujo³⁷. Estas biopelículas son zonas con una baja concentración de oxígeno, condición necesaria para que el patógeno lleve a cabo las reacciones de quelación y la síntesis proteica de las enzimas y bombas de flujo. A raíz de estos datos, Hu et al.³⁷ desarrollaron una formulación frente a *P.aeruginosa*, utilizando distintos antibióticos (aztreonam, ceftazidima y piperacilina-tazobactam) encapsulados en lip@PFH@O₂, un tipo de liposoma esférico, de 120nm de diámetro, con polaridad superficial positiva a pH ácido (pues favorece la penetración en la biopelícula) y cargado con perfluorohexano, un compuesto biocompatible y con excelente capacidad para almacenar oxígeno³⁷(Figura 7). Como resultado, la hipoxia en la biopelícula revirtió, aumentando así la efectividad del tratamiento debido a la disminución de las resistencias ante los distintos antibióticos³⁷.

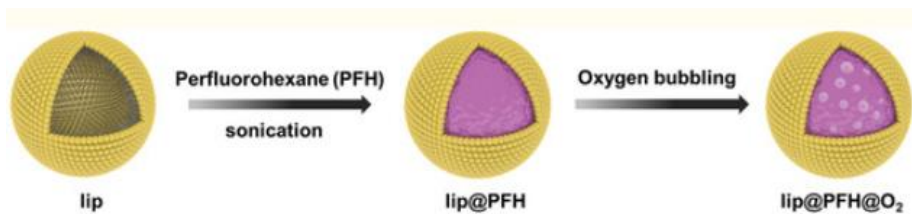


Figura 7: Proceso de carga y oxigenación de lip@PFH@O₂[35]

Muchas especies bacterianas logran evitar la terapia antimicrobiana mediante mecanismos de infección intracelulares, principalmente en el interior de los macrófagos, donde el antibiótico no puede penetrar correctamente. En la actualidad se han logrado numerosos avances en la

vectorización citosólica de fármacos mediante la utilización de liposomas^{3,7,10-12,30,33,34,38-40}, bien sea modificando su carga superficial^{10,20,39}, utilizando métodos de sensibilización ante ciertos valores de pH^{11,12,21,34,36} o mediante la utilización de restos específicos, como pueden ser la expresión de restos de manosa (macrófagos)³⁸, biotina (enterocitos)⁶ o ferritina (eritrocitos)⁷ con la intención de desencadenar un proceso de endocitosis o fagocitosis por la célula diana^{7,16}. Sin embargo, no todos los fármacos son capaces de abandonar el endosoma una vez éste se ha formado, como es el caso de los aminoglucósidos (incluidas la gentamicina y la estreptomicina) utilizados en las infecciones respiratorias producidas por *Francisella tularensis*. Para hacer frente a esta infección, Su et al.³⁸ lograron incorporar un copolímero a una formulación de estreptomicina encapsulada, a partir de 2 fragmentos. El primer fragmento expresaba restos de manosa, que favorecieron el reconocimiento y la internalización del liposoma por parte de los macrófagos alveolares³⁸. Una vez en el endosoma, se produjo una bajada del pH, y el segundo fragmento, un residuo sensible al pH, favoreció la difusión de la estreptomicina a través de la membrana, facilitando su llegada al citosol, donde actuó el principio activo antimicrobiano³⁸. Tanto la estructura del liposoma como el esquema de este proceso vienen representados en las figuras 8 y 9 respectivamente.

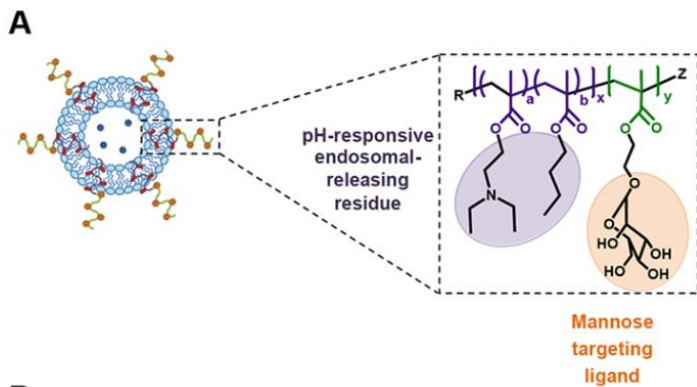


Figura 8: Liposoma y copolímero propuesto por Su et al. [38] frente a la *F.tularensis*

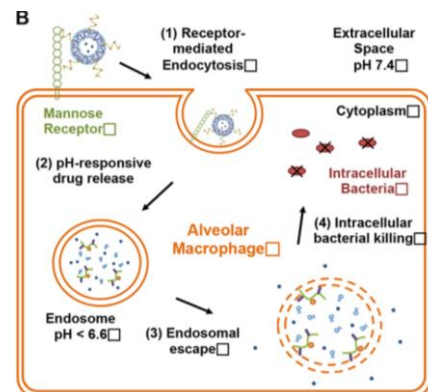


Figura 9: Esquema de actuación de la formulación propuesta por Su et al. [38] frente a la *F.tularensis*.

5.1.1 Liposomas utilizados en formulaciones no basadas en antibióticos comunes.

La capacidad de los liposomas para vehicular sustancias ha permitido que la comunidad científica vuelva a dirigir su atención hacia aquellas que por lo general habían quedado descartadas debido a su toxicidad, baja biodisponibilidad o especificidad.

La fagoterapia utiliza especies víricas de la familia de los bacteriófagos (descubiertos a principios del S.XX) para combatir infecciones bacterianas^{21,25,30,40-42}. Estas especies víricas se caracterizan por infectar de forma específica especies bacterianas concretas, multiplicándose

en su interior una vez infectadas y lisándolas con enzimas específicas para poder escapar e infectar nuevos hospedadores⁴⁰, todo ello mostrando unos niveles de toxicidad mínimos y sin apenas inducir resistencias^{21,41}. Sin embargo, tras la llegada de los antibióticos convencionales fueron cayendo en desuso debido a su baja biodisponibilidad y corta semivida plasmática⁴⁰. Tras el surgimiento de los liposomas y la crisis de los antibióticos, el interés por los bacteriófagos y sus lisinas ha vuelto a resurgir.

- El concepto “caballo de Troya” basa su estrategia en la encapsulación de fagos vivos en liposomas^{3,40}, y presenta un especial interés en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias intracelulares o con capacidad de sobrevivir y dispersarse en el interior de células eucariotas⁴⁰. En este experimento se valoraron diversas formas de administración de fagos específicos (fago libre, cepa infectada, cepa no patógena infectada y fago encapsulado en liposoma) frente a *M. tuberculosis*, *Chlamydia* y *S. aureus*⁴⁰. Los resultados desvelaron que los fagos encapsulados eran capaces de alcanzar e infectar a los objetivos de forma eficaz, sin apenas producir efectos adversos (p la cepas infectadas en ocasiones podían incrementar la virulencia de la infección)⁴⁰. Por otro lado, se reportó la dificultad de los fagos para ser encapsulados, debido a su tamaño y a la irregularidad de su superficie⁴⁰. En otros estudios se investiga la posibilidad de utilizar distintas cepas de bacteriófagos mediante técnicas de microfluidos, que permitirían obtener liposomas muy homogéneos y de cualquier tamaño³⁰.
- Si bien no tienen la posibilidad de reproducirse en el interior de las células infectadas, las enzimas líticas específicas, producidas por bacteriófagos, ejercen el mismo efecto citotóxico que el virus vivo, con el mismo perfil toxicológico y la misma especificidad. Se trata de unas moléculas muy prometedoras pues, al tener un tamaño menor, permiten una mejor encapsulación en el interior de los liposomas y ejercen un efecto más intenso.⁴² En un primer estudio, Bai et al.²⁶ desarrollaron una formulación de endolisina (N-acetilmuramonil-L-alanina amidasa) sintetizada por el fago BSP16 (BSP16_ORF33) y lisozima y las encapsularon en liposomas con un diámetro menor a 500nm y carga superficial positiva, para utilizarla frente a bacterias gram negativas.²⁶ Un año después, Portilla et al.⁴² encapsularon la endolisina antiestafilocócica “LysRODI”, codificada por el fago vB_SauM_phiIPLA-RODI, en liposomas sensibles a un pH inferior a 5,5. Los ensayos se realizaron sobre biopelículas formadas por

bacterias sésiles, y demostraron una buena capacidad antimicrobiana, incluso en cepas multirresistentes.⁴²

- La fagoterapia también ha despertado interés en el campo de la medicina veterinaria, donde ya ha comenzado a explotarse. A partir de un ensayo realizado por Colom et al.⁴³ se pretende desarrollar un nuevo método profiláctico mediante la encapsulación de fagos efectivos frente a *Salmonella. spp*, encapsulados en liposomas catiónicos con un tamaño de 400nm de diámetro, y por administración oral, y en el que se espera no aparezcan resistencias⁴³.

Con respecto al sistema inmune, se están llevando a cabo estudios sobre la capacidad de los liposomas para vehicular segundos mensajeros lipídicos capaces de estimularlo, como el ácido fosfatídico o fosfatidilinositol, que incrementan la respuesta bactericida fosfolipasa-dependiente de macrófagos y linfocitos broncoalveolares en pacientes con neumonía causada por bacterias multirresistentes²⁷.

Por otro lado, se contempla la posibilidad de aprovechar sus características adyuvantes en el transporte de antígenos proteicos o glicolipídicos para el desarrollo de vacunas, garantizando un reconocimiento rápido y específico por parte del leucocito²⁷, o incluso de utilización del propio liposoma, para encapsular y reducir el efecto nocivo de las exotoxinas secretadas por otras bacterias^{44,45}.

5.2 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas permiten una eficiente vehiculización de fármacos de todo tipo a la diana deseada dependiendo de su método de fabricación. Están formadas por una matriz polimérica sintética o natural¹¹, y es crucial definir y controlar las características de la síntesis, haciendo hincapié en el porcentaje de disolvente utilizado para definir el tamaño, y en el pH, que afectará a la liberación del principio activo¹¹. Igualmente relevantes son los diferentes mecanismos de integración de la matriz con drogas hidrofílicas o lipofílicas, como la química covalente o el atrapamiento por interacciones hidrofóbicas. Los polímeros sintéticos más utilizados son la polilactida (PLA), el ácido poly(lactic-co-glicólico)(PLGA, es el más utilizado), policaprolactonas (PCL) y poliacrilatos (PCA). Entre los naturales destacan el alginato, la albúmina y el quitosano, y especialmente este último, debido a sus propiedades mucoadhesivas y antimicrobianas¹¹.

Algunos de los avances más recientes muestran la eficacia de partículas de PLGA cargadas con gentamicina frente a *P.aeruginosa*⁴⁶.

La importancia de las nanopartículas en la vectorización de principios activos también queda patente en el estudio realizado por Sun et al.¹³, en el que se logran sintetizar partículas formadas por quitosano y ácido poly(γ -glutámico). Si bien algunas de las formulaciones superaban el micrómetro de diámetro, éstas transportaban óxido nítrico, un gas que a concentraciones de 200ppm demuestra efectos antimicrobianos sin resultar tóxico para el organismo, y LL-37, un péptido antimicrobiano capaz de estimular el sistema inmune, además de ejercer su propia actividad bactericida. Ambos componentes presentan baja toxicidad y generan un menor número de resistencias que los antibióticos convencionales¹³.

No obstante, existe un método para hacer frente a la crisis antimicrobiana sin necesidad de recurrir a la vehiculización de ningún tipo de principio activo ni utilizar una nanopartícula con efectos antimicrobianos propios. En el estudio de Hong et al.⁴⁷, se logró sintetizar una nanopartícula de ftalil-pululano a partir de pululano, un polisacárido de alto peso molecular, no digerible y fermentable por la microbiota intestinal. En el ensayo, la nanopartícula era internalizada por el probiótico *Lactobacillus plantarum*, obligándole a producir una leve respuesta estrés, que se traduciría en un incremento de la secreción de plantaricina, una bacteriocina que favorecería su actividad antimicrobiana frente a *E.coli* y *L.monocytogenes*^{3,47}.

Es interesante resaltar la idea de Zhang et al.⁴⁸ al proponer un sistema híbrido que combinaba un núcleo hidrofóbico, una superficie hidrófila y una monocapa lipídica entre el núcleo y la superficie (Figura 10). Esta molécula presentaba tanto las cualidades de los liposomas como las de las nanopartículas poliméricas corrientes, ofreciendo la posibilidad de modificar su tamaño, su carga superficial, un perfil de liberación constante, su estabilidad sérica, una buena capacidad de especificación tisular y un proceso sintético simple.⁴⁸

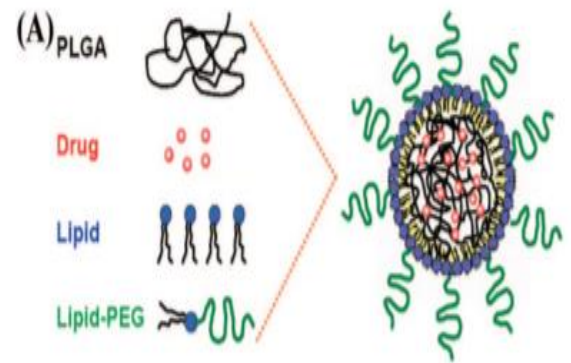


Figura 10: Partícula híbrida compuesta por Zhang et al. [47]

5.3 Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas son estructuras coloidales esféricas formadas por copolímeros anfifílicos como poly(butil metacrilato)(PBMA), polistireno (PLS), ácido poliláctico y óxido de polieno-polipropileno(PEO-PPO)^{4,11}. La estructura micelar se forma espontáneamente una

vez superada la concentración crítica micelar y la temperatura crítica de micelización¹¹. Una vez formada, la estructura se agrega y precipita, presentando un núcleo interno hidrófobo y sólido (si no fuese sólido, la liberación sería inmediata), que permite la incorporación de la droga, y el externo hidrófilo, que permite su solubilización en el medio. La vehiculización correcta del polímero dependerá de la densidad de la carga de la droga y de la longitud de la cadena del polímero.. Las micelas poliméricas presentan una baja toxicidad y el control del tamaño depende de la estructura química del polímero, no del método de preparación; además son partículas más sencillas y económicas¹¹ que los liposomas y las nanopartículas poliméricas. Yuan et al.⁴⁹ llevaron a cabo la síntesis de una formulación micelar a partir de PEO-PCL-PTBAM y superficie PEGilada, y consiguieron que las micelas mismas mostraran actividad antimicrobiana frente a *E.coli* y *S. aureus* debido a la presencia de aminas secundarias en el bloque de PTBAM,^{46,49}.

Uno de los ensayos más recientes, llevado a cabo por Tian et al.⁵⁰, propone un tipo de micela zwitterionica a base de poly(ϵ -caprolactona)-éster-poliaminocuaternario sensible a un pH ácido y autoensamblada con polietilenglicol-poly(ϵ -caprolactona) para formar la micela zwitteriónica (ZW-MSPMs) que facilite la eliminación de biopelículas estafilocócicas⁵⁰. En el medio ácido de la biopelícula, la superficie queda cargada positivamente por la conversión del éster poliaminocuaternario en un anillo lactónico, lo que permite a la micela penetrar y acumularse de forma específica en el interior de la biopelícula, donde interactuará fuertemente con sustancias extracelulares como eDNA o proteínas, dispersando la biopelícula y facilitando la acción de otros antibióticos como el ciprofloxacino⁵⁰

5.4 Nanopartículas basadas en lípidos sólidos

Son moléculas formadas a partir de lípidos sólidos a temperatura corporal, como el cetil-palmitato o sales de ácido mirístico, estabilizados con emulsificantes y co-emulsificantes como polisorbatos, poloxámeros, co-ésteres de ácidos grasos, lecitina y sales biliares.¹¹ El estado de los lípidos depende de las características del medio -(temperatura, pH ...), lo que ofrece un control mayor de la , eficacia y liberación que con otras nanopartículas.¹¹ La mayor parte de estos sistemas se encuentran en estado preclínico.

6 CONCLUSIONES

Las nanopartículas orgánicas abren un amplio abanico de posibilidades en la lucha frente a las bacterias multirresistentes. Mediante formulaciones basadas en liposomas, nanopartículas poliméricas y micelas se han detallado numerosos ensayos, algunos empleando antibióticos

convencionales y otras sustancias novedosas, capaces de hacer frente a infecciones provocadas por bacterias multirresistentes de distinto tipo. Estos ensayos, en los que se han utilizado, mecanismos de actuación y componentes diversos para sintetizar o recubrir las nanopartículas, ya sea con polietilenglicol, sustancias para modificar la membrana a determinados valores de pH, zwitteriones, o restos específicos como manosa o biotina, han arrojado resultados prometedores.

Por lo tanto, a la hora de plantear el desarrollo de nuevas fórmulas antimicrobianas, estos tipos de moléculas se convierten en excelentes candidatos debido a sus posibilidades de vectorización y su baja toxicidad. Los ensayos en el campo de las nanopartículas están siguiendo líneas de investigación muy variadas, con resultados excelentes. Resulta emocionante adentrarse en la evolución de los estudios, descubrir la aparición de más y más moléculas susceptibles de ser vehiculizadas, nuevos polímeros con los que modificar las características de las nanopartículas, o considerar la posibilidad de un ensayo clínico de nanopartículas basadas en lípidos sólidos. Sin duda, el potencial de evolución en este campo es inmenso y prometedor.

7 REFERENCIAS

1. O.M.S. Resistencia a los antibióticos. www.who.int. Published 2020. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos#:~:text=La resistencia a los antibióticos prolonga las estancias,mutan en respuesta al uso de estos fármacos](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos#:~:text=La%20resistencia%20a%20los%20antibioticos%20prolonga%20las%20estancias,mutan%20en%20respuesta%20al%20uso%20de%20estos%20f%C3%A1rmacos).
2. O.M.S. The top 10 causes of death. www.who.int. Published 2018. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
3. Kobayashi RKT, Nakazato G. Editorial: Nanotechnology for Antimicrobials. *Front Microbiol.* 2020;11(July):10-12. doi:10.3389/fmicb.2020.01421
4. Banik BL, Fattahi P, Brown JL. Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2016;8(2):271-299. doi:10.1002/wnan.1364
5. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine.* 2016;11(6):673-692. doi:10.2217/nnm.16.5
6. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J Control Release.* 2016;238:176-185.

- doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.051
7. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(SUPPL.1):51-63. doi:10.2147/IJN.S26592
 8. Torchilin VP. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers. *AAPS J*. 2007;9(2):128-147. doi:10.1208/aapsj0902015
 9. Zhang B, Sai Lung P, Zhao S, Chu Z, Chrzanowski W, Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-8. doi:10.1038/s41598-017-07588-9
 10. Almeida JPM, Chen AL, Foster A, Drezek R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;6(5):815-835. doi:10.2217/nnm.11.79
 11. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016;224:86-102. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.008
 12. Zhang HZ, Li XM, Gao FP, Liu LR, Zhou ZM, Zhang QQ. Preparation of folate-modified pullulan acetate nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Drug Deliv*. 2010;17(1):48-57. doi:10.3109/10717540903508979
 13. Sun Y, Liu Y, Liu W, Lu C, Wang L. Chitosan microparticles ionically cross-linked with poly(γ -glutamic acid) as antimicrobial peptides and nitric oxide delivery systems. *Biochem Eng J*. 2015;95:78-85. doi:10.1016/j.bej.2014.11.022
 14. Ducat E, Deprez J, Gillet A, et al. Nuclear delivery of a therapeutic peptide by long circulating pH-sensitive liposomes: Benefits over classical vesicles. *Int J Pharm*. 2011;420(2):319-332. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.034
 15. Obata Y, Tajima S, Takeoka S. Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo. *J Control Release*. 2010;142(2):267-276. doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.023
 16. Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):431-444. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.026
 17. De Oliveira JFA, Capeletti LB, Cardoso MB. Are antibiotic-functionalized nanoparticles a promising tool in antimicrobial therapies? *Nanomedicine*. 2017;12(23):2587-2590. doi:10.2217/nnm-2017-0273
 18. Tsukasa Mizuhara†, Daniel F. Moyano† and VMR. Using the Power of Organic

- Synthesis for Engineering the Interactions of Nanoparticles with Biological Systems. *Nano Today*. 2017;176(1):139-148. doi:doi:10.1016/j.nantod.2015.11.002.
19. García KP, Zarschler K, Barbaro L, et al. Zwitterionic-coated “stealth” nanoparticles for biomedical applications: Recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. *Small*. 2014;10(13):2516-2529. doi:10.1002/sml.201303540
 20. Rozman NAS, Yenn TW, Ring LC, Nee TW, Hasanolbasori MA, Abdullah SZ. Potential antimicrobial applications of chitosan nanoparticles (ChNP). *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29(7):1009-1013. doi:10.4014/jmb.1904.04065
 21. Sun Y, Liu Y, Liu W, et al. Encapsulation of the antistaphylococcal endolysin lysrodi in ph-sensitive liposomes. *Front Microbiol*. 2015;9(2):10-12. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.034
 22. Takeuchi H, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y. Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int J Pharm*. 2005;303(1-2):160-170. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.06.028
 23. Lamichhane N, Udayakumar TS, D’Souza WD, et al. Liposomes: Clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules*. 2018;23(2):1-17. doi:10.3390/molecules23020288
 24. De F, Químicas C, Ruano M, et al. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID TESIS DOCTORAL Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR. Published online 2013:359. <https://core.ac.uk/download/pdf/19719957.pdf>
 25. Zhang Y, Xuan S, Owoseni O, et al. Amphiphilic Polypeptoids Serve as the Connective Glue to Transform Liposomes into Multilamellar Structures with Closely Spaced Bilayers. *Langmuir*. 2017;33(11):2780-2789. doi:10.1021/acs.langmuir.6b04190
 26. Bai J, Yang E, Chang PS, Ryu S. Preparation and characterization of endolysin-containing liposomes and evaluation of their antimicrobial activities against gram-negative bacteria. *Enzyme Microb Technol*. 2019;128(April):40-48. doi:10.1016/j.enzmictec.2019.05.006
 27. Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:155.

- doi:10.3389/fimmu.2018.00155
28. Carugo D, Bottaro E, Owen J, Stride E, Nastruzzi C. Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. *Sci Rep.* 2016;6:1-15. doi:10.1038/srep25876
 29. Kell AJ, Stewart G, Ryan S, et al. Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of gram-positive and gram-negative bacteria. *ACS Nano.* 2008;2(9):1777-1788. doi:10.1021/nm700183g
 30. Jahn A, Vreeland WN, Gaitan M, Locascio LE. Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *J Am Chem Soc.* 2004;126(9):2674-2675. doi:10.1021/ja0318030
 31. Cinquerrui S, Mancuso F, Vladislavjevic GT, Bakker SE, Malik DJ. Nanoencapsulation of bacteriophages in liposomes prepared using microfluidic hydrodynamic flow focusing. *Front Microbiol.* 2018;9(SEP). doi:10.3389/fmicb.2018.02172
 32. Jahn A, Vreeland WN, Devoe DL, Locascio LE, Gaitan M. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir.* 2007;23(11):6289-6293. doi:10.1021/la070051a
 33. Jahn A, Stavis SM, Hong JS, Vreeland WN, Devoe DL, Gaitan M. Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. *ACS Nano.* 2010;4(4):2077-2087. doi:10.1021/nm901676x
 34. Baptista P V., McCusker MP, Carvalho A, et al. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria-"A Battle of the Titans". *Front Microbiol.* 2018;9(JUL):1-26. doi:10.3389/fmicb.2018.01441
 35. Bassetti M, Vena A, Russo A, Peghin M. Inhaled Liposomal Antimicrobial Delivery in Lung Infections. *Drugs.* 2020;(0123456789). doi:10.1007/s40265-020-01359-z
 36. Meers P, Neville M, Malinin V, et al. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(4):859-868. doi:10.1093/jac/dkn059
 37. Bartomeu Garcia C, Shi D, Webster TJ. Tat-functionalized liposomes for the treatment of meningitis: an in vitro study. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:3009-3021. doi:10.2147/IJN.S130125

38. Hu D, Zou L, Yu W, et al. Relief of Biofilm Hypoxia Using an Oxygen Nanocarrier: A New Paradigm for Enhanced Antibiotic Therapy. *Adv Sci (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.* 2020;7(12):2000398. doi:10.1002/advs.202000398
39. Vanić Ž, Rukavina Z, Manner S, et al. Azithromycin-liposomes as a novel approach for localized therapy of cervicovaginal bacterial infections. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:5957-5976. doi:10.2147/IJN.S211691
40. Nieth A, Verseux C, Römer W. A Question of Attire: Dressing Up Bacteriophage Therapy for the Battle Against Antibiotic-Resistant Intracellular Bacteria. *Springer Sci Rev.* 2015;3(1):1-11. doi:10.1007/s40362-014-0027-x
41. Su F-Y, Chen J, Son H-N, et al. Polymer-augmented liposomes enhancing antibiotic delivery against intracellular infections. *Biomater Sci.* 2018;6(7):1976-1985. doi:10.1039/c8bm00282g
42. Portilla S, Fernández L, Gutiérrez D, Rodríguez A, García P. Encapsulation of the antistaphylococcal endolysin lysrodi in pH-sensitive liposomes. *Antibiotics.* 2020;9(5):1-8. doi:10.3390/antibiotics9050242
43. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortés P, MasPOCH D, Llagostera M. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against Salmonella spp. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(14):4841-4849. doi:10.1128/AEM.00812-15
44. Henry BD, Neill DR, Becker KA, et al. Engineered liposomes sequester bacterial exotoxins and protect from severe invasive infections in mice. *Nat Biotechnol.* 2015;33(1):81-88. doi:10.1038/nbt.3037
45. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):239-251. doi:10.1016/S1473-3099(15)00466-1
46. Lakshminarayanan R, Ye E, Young DJ, Li Z, Loh XJ. Recent Advances in the Development of Antimicrobial Nanoparticles for Combating Resistant Pathogens. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(13):e1701400. doi:10.1002/adhm.201701400
47. Hong L, Kim WS, Lee SM, Kang SK, Choi YJ, Cho CS. Pullulan nanoparticles as prebiotics enhance the antibacterial properties of lactobacillus plantarum through the induction of mild stress in probiotics. *Front Microbiol.* 2019;10(FEB):1-12. doi:10.3389/fmicb.2019.00142

48. Zhang L, Chan JM, Gu FX, et al. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: A robust drug delivery platform. *ACS Nano*. 2008;2(8):1696-1702. doi:10.1021/nn800275r
49. Yuan W, Wei J, Lu H, Fan L, Du J. Water-dispersible and biodegradable polymer micelles with good antibacterial efficacy. *Chem Commun (Camb)*. 2012;48(54):6857-6859. doi:10.1039/c2cc31529g
50. Tian S, Su L, Liu Y, et al. Self-targeting, zwitterionic micellar dispersants enhance antibiotic killing of infectious biofilms-An intravital imaging study in mice. *Sci Adv*. 2020;6(33):eabb1112. doi:10.1126/sciadv.abb1112