



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: SISTEMAS MULTIPARTICULARES
PARA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS EN EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

Autor: María Martínez Fernández

Fecha: Junio 2019

Tutor: Ana María Fernández Carballido

Contenido

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	4
TRATAMIENTO CONVENCIONAL DE LA TUBERCULOSIS.....	5
SISTEMAS PARA VECTORIZACIÓN DE FARMACOS A MACROFÁGOS	5
MICROPARTÍCULAS	6
METODOS DE ELABORACIÓN DE MICROPARTICULAS	6
NANOPARTÍCULAS	8
METODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTICULAS.....	9
MICROPARTÍCULAS VERSUS NANOPARTÍCULAS PARA VECTORIZACIÓN A MACROFAGOS.....	10
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
CONCLUSIÓN.....	18
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo multirresistente. Gran parte de estas resistencias se deben a las formas intracelulares del microorganismo presentes en los macrófagos, las cuáles actúan como reservorio. Se ha demostrado que el uso de micro y nanopartículas vectorizadas a macrófagos alveolares mejora tanto el tratamiento como la supervivencia de los pacientes, debido a que, actúan frente al reservorio de esta patología.

Además, se ha demostrado que el tratamiento en monoterapia de este microorganismo, además de no ser efectivo, aumenta la aparición de resistencias.

Esta revisión reúne una serie de artículos, cuyo objetivo es demostrar que la utilización de micro y nanopartículas cargadas con diferentes fármacos, en comparación con los tratamientos convencionales, aumenta tanto la curación microbiológica como la supervivencia de los pacientes, además de disminuir los efectos secundarios de estas terapias.

Palabras clave: macrófagos; nanopartículas; micropartículas; *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is a multidrug resistant organism. This resistance is mainly due to the intracellular forms presented in macrophages, which act as a reservoir. It has been proved that the use of micro and nanoparticles vectored to alveolar macrophages enhances both the treatment and survival of patients. This happens because they act upon this pathology's reservoir.

In addition, it has been proved that the monotherapy of these microorganisms is not just ineffective, but may increase resistance outbreak.

This review constitutes a gathering of different articles on the matter. The intention behind this is to prove that both microbiological cure and patients' survival are increased with the use of micro and nanoparticles loaded with various drugs, in comparison with the standard treatments. Moreover, this decreases the side effects produced in these kinds of therapies.

Key words: macrophages; nanoparticles; microparticles; *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La tuberculosis es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. Está producida por *Mycobacterium tuberculosis*. Pese a que existe tratamiento con antibióticos y vacunas frente al microorganismo, sigue siendo una importante causa de mortalidad y morbilidad, lo cual, en gran parte se debe a que aproximadamente un 25% de la población a nivel mundial es portadora del microorganismo, ya que, aunque éste se encuentre en estado latente, se puede transmitir. Además el riesgo de que una infección latente revierta, así como el riesgo de contagio, aumenta mucho en individuos inmunodeprimidos. [Khan et al, 2019]

En la infección producida por *Mycobacterium tuberculosis* las primeras células hospedadoras son los macrófagos alveolares, los cuales son tipo 1. En la mayor parte de los individuos, estas células inmunes actúan como reservorio del microorganismo, y no originan una infección, es decir, queda en estado latente gracias a la respuesta inmune del individuo. Pero, cuando algún acontecimiento

compromete el correcto funcionamiento del sistema inmune, el microorganismo es capaz de propagarse y dar lugar al desarrollo de la patología, la cual presenta un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad. Además, mientras el microorganismo permanezca en estado latente el individuo es portador de la enfermedad, de manera que, es capaz de transmitirla a individuos más sensibles. [Singh et al, 2015]

El gran problema del tratamiento de esta patología reside en que las formas del microorganismo que permanecen en el interior de los macrófagos alveolares son muy resistentes y actúan como reservorio, debido a que, los tratamientos convencionales con antibióticos apenas consiguen llegar al interior de los mismos y destruir al patógeno, además de presentar resistencia. Por ello, se están desarrollando terapias alternativas con micropartículas y nanopartículas vectorizadas a macrófagos alveolares, con el fin de que el antibiótico penetre al interior del macrófago y destruya el reservorio del microorganismo. [Andreu et al, 2019]

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

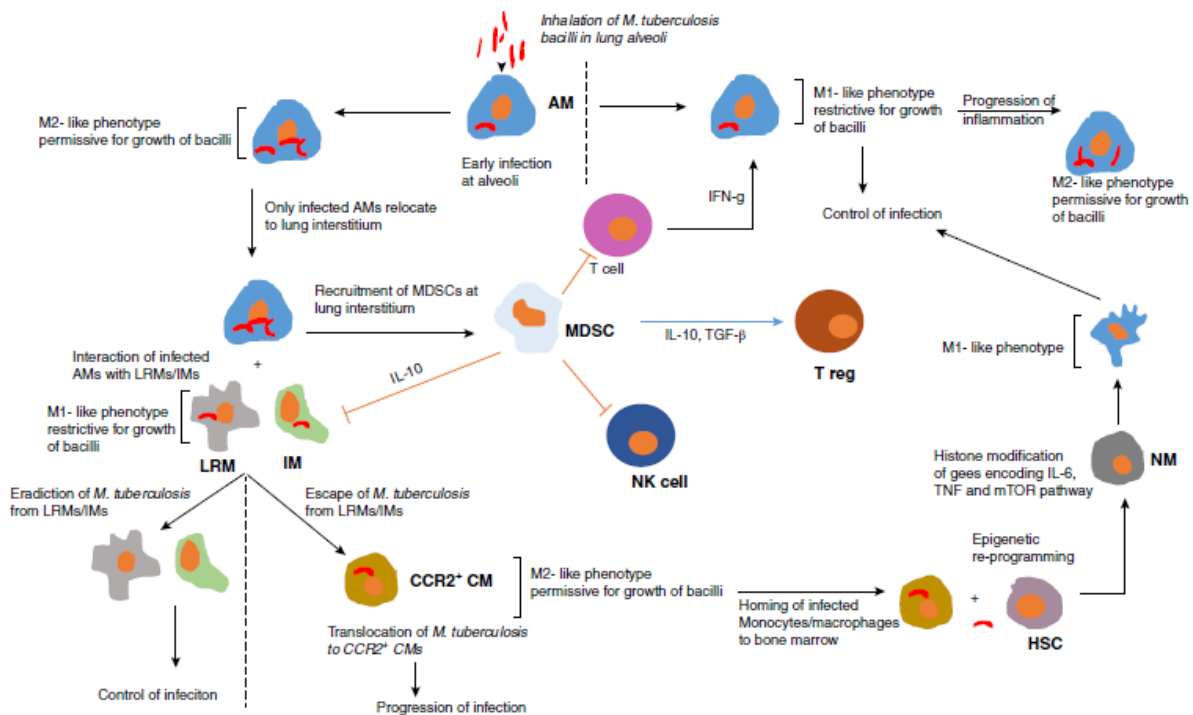


Figura 1: representación esquemática de los macrófagos y otras células de la inmunidad innata en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. (Khan A, Singh VK, Hunter RL, Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis *J Leukoc Biol.* 2019;1-8).

Mycobacterium tuberculosis accede al hospedador mediante inhalación. En primer lugar infecta a los macrófagos alveolares (AM). Tras esto puede haber dos posibilidades:

1. Las células T de la inmunidad innata responden a la infección liberando IFN-γ, el cual favorece que el macrófago adquiera el fenotipo M1, lo que dificulta el crecimiento y la propagación del microorganismo, y, de esta forma, se controla la infección, ya que, éste queda en un estado latente. Aunque, si la inflamación progresa puede progresar a un fenotipo M2.
2. Si la inflamación progresa o el individuo está inmunosuprimido el macrófago puede adquirir el fenotipo M2, el cual es más favorable al crecimiento del microorganismo.

El macrófago M2 infectado se traslada al intersticio pulmonar, allí, interacciona con:

- Los macrófagos pulmonares residentes (LRMs).
- Los macrófagos intersticiales (IMs).

Estas poblaciones de macrófagos revierten a un fenotipo M1 el cual, como se ha mencionado anteriormente, dificulta el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, *Mycobacterium tuberculosis* ha adquirido mecanismos para evadir la respuesta de ambos macrófagos e infectar a los monocitos CCR2+, los cuales, presentan un fenotipo similar a los macrófagos M2, de tal modo que favorecen la progresión de la infección. De estas células, el microorganismo es capaz de infectar a las células madre hematopoyéticas (HSC), éstas son capaces de realizar modificaciones epigenéticas en los macrófagos (modifican las histonas de genes que codifican para IL-6, TNF y mTOR), de tal forma que, generan monocitos mas reactivos (NM) y favorecen el fenotipo M1, volviendo a controlar la infección. [Khan et al, 2019]

TRATAMIENTO CONVENCIONAL DE LA TUBERCULOSIS

En el tratamiento convencional de la tuberculosis se deben distinguir **dos tipos de fármacos:**

- a) **Fármacos de primera línea:** a este grupo pertenecen la rifampicina, la isoniazida, la pirazinamida y el etambutol.
- b) **Fármacos de segunda línea:** a este grupo pertenecen la estreptomycinina y otros aminoglicósidos, las fluoroquinolonas, la cicloserina, la etionamida, el ácido p-aminosalicílico (PAS)...

[Andreu et al, 2019]

La terapia convencional consiste en dos fases:

1. **Primera fase o terapia intensiva:** su objetivo es eliminar la mayor cantidad de microorganismo posible. Se realiza con antibióticos de primera línea frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Normalmente se utilizan cuatro de ellos durante 2-3 meses. Lo más común es la utilización de Rifampicina + isoniazida + pirazinamida + etambutol.
2. **Segunda fase o terapia de mantenimiento o terapia de continuación:** Su objetivo es eliminar el reservorio del microorganismo, el cual reside en los macrófagos alveolares, y, también, va dirigido frente a microorganismos resistentes al tratamiento de la fase anterior. Normalmente se utilizan dos de ellos durante 4-6 meses. Se deben administrar todos los días o tres veces por semana. Lo más común es la utilización de rifampicina + isoniazida.

Si aparecen resistencias se debe sustituir el fármaco afectado por fármacos de segunda línea.

El principal problema de este tratamiento es que cada vez hay más:

- **Cepas resistentes a rifampicina (RR-TB)**
- **Cepas multirresistentes (MDR-TB):** Resistentes a rifampicina e isoniazida.
- **Cepas extremadamente multirresistentes (XDR-TB):** Resistentes a rifampicina, isoniazida y fármacos de segunda línea (fluoroquinolona).

[Patil et al, 2018]

SISTEMAS PARA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS A MACROFÁGOS

Existen diferentes sistemas farmacéuticos que permiten el acceso del fármaco directamente a los macrófagos, entre ellos encontramos los siguientes:

MICROPARTÍCULAS

Las micropartículas (MPs) son sólidos cuyo tamaño oscila entre los 1-1000 μm , aunque no suelen alcanzar un tamaño tan grande. Para que sean reconocidas por los macrófagos deben presentar un tamaño comprendido entre 1 y 6 μm .

Según su estructura interna pueden ser de dos tipos:

- **Reservorio:** presentan una cubierta y el principio activo se encuentra en el interior de un reservorio. Se denominan microcápsulas.
- **Matricial:** presentan una matriz polimérica en la cual se encuentra disuelto o disperso el principio activo. Se denominan microesferas.

[Urbanick et al, 2019]

MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE MICROPARTÍCULAS

Las **micropartículas se pueden obtener por diferentes métodos**, los principales son:

- a) **Emulsión simple por evaporación o difusión del solvente:** principalmente para principios activos hidrosolubles.
- b) **Doble emulsión por evaporación o difusión del solvente:** principalmente para principios activos hidrofílicos.
- c) **Spray drying:** método utilizado en los artículos que incluye esta revisión.

Método de emulsión simple por evaporación o difusión del solvente, consta de varias etapas:

1. **En primer lugar se añade el principio activo a una fase orgánica:** Normalmente esta fase suele ser diclorometano o etanol+cloroformo en el que se disuelve el polímero ácido poliláctico o glicólico (PLGA). Se debe agitar y mezclar hasta que el principio activo quede disuelto o disperso en la fase oleosa.
2. **En segundo lugar se debe preparar la fase acuosa:** La cual suele estar formada por agua u otro compuesto hidrófilo. A esta fase se añade el agente tensioactivo, responsable de la formación y estabilidad de la emulsión.
3. **Formación de la emulsión:** se añade la fase acuosa sobre la fase oleosa, siempre en constante agitación. Se debe agitar y mezclar mediante un agitador tipo palas que gira alrededor de 20.000 rpm, velocidad necesaria para que se formen las micropartículas. Una vez que el proceso haya finalizado, se obtendrá una emulsión de fase externa acuosa (O/A), en la cual queda encapsulado el principio activo.
4. **Evaporación del solvente:** una vez mezcladas ambas fases y formada la emulsión O/A, se procede a la evaporación del solvente. Se eligen aquellos disolventes que presenten un punto de ebullición bajo, con el fin de facilitar este proceso y no desestabilizar la emulsión anteriormente formada.
5. **Separación y purificación de las micropartículas:** las partículas poliméricas son separadas por centrifugación o filtración, tras este proceso se procede al secado de las micropartículas.

[Mishra et al, 2011]

Método de emulsión doble por evaporación o difusión del solvente, consta de 4 etapas:

1. **Emulsificación primaria:** el principio activo se encuentra disperso o disuelto en el seno de una fase acuosa, la cual se introduce dentro de una fase orgánica que contiene el polímero.

Ambas fases se agitan con el fin de que se forma una emulsión simple de fase externa oleosa (A/O), en la cual, el principio activo se encontrará en el interior de las gotículas junto con el agua, rodeados por el disolvente orgánico.

2. **Re-emulsificación:** la emulsión anteriormente formada se añade a un segundo disolvente orgánico, el cual, a su vez, contiene un agente tensioactivo. De esta forma se obtiene una doble emulsión de fase externa acuosa (A/O/A), en la cual, el principio activo se encuentra en el interior de las gotículas junto con los dos disolventes orgánicos, rodeados por la fase acuosa.
3. **Purificación:** el disolvente orgánico se elimina mediante evaporación o extracción induciendo la solidificación de las partículas.
4. **Separación y purificación de las micropartículas:** las partículas poliméricas son colectadas por centrifugación o filtración, tras este proceso se procede al secado de las micropartículas.

[González et al, 2016]

Spray drying (atomización): hay dos fases principales:

1. **Formación de la emulsión:**
 - a) **Formación de la fase acuosa:** suele estar formada por agua, otro compuesto hidrófilo, como el PVA, y el principio activo. Se agita a hasta la completa dispersión o disolución del principio activo en el seno de la fase acuosa.
 - b) **Formación de la fase oleosa:** suele estar formada por disolventes orgánicos como el diclorometano. El polimero empleado para la encapsulación (como puede ser el PLGA), se disuelve mediante agitación hasta obtiene una mezcla homogénea.
 - c) **Formación de la emulsión:** se incorpora la fase acuosa sobre la fase oleosa. Se agita con un equipo homogenizador de alta velocidad, el cual, gira a aproximadamente 8.000rpm. De esta forma se obtiene una emulsión de fase externa oleosa (A/O).
2. **Equipo Spray dryer:** la emulsión se introduce en el equipo con el fin de realizar un secado por atomización de tal forma que se obtengan las micropartículas. La emulsión se hace circular por el equipo, y rápidamente, es calentada por el aire y, tras esto, nebulizada por medio de aire comprimido en la cámara de secado del equipo. Gracias a la aplicación de vacío, las gotas secadas en dicha cámara y el disolvente evaporado pasan a la zona del ciclón. Por gravedad, las micropartículas caen y se recolectan en el vaso recolector, situado al final del ciclón. Las micropartículas deberán de pasar por un filtro o boquilla, de tal forma que, solo pasarán aquellas que tengan el tamaño adecuado. El disolvente se elimina en la zona del ciclón, hacia el exterior, gracias a la bomba aspiradora. Los parámetros que se suelen controlar en un equipo de Spray dryer son:
 - a) Temperatura de entrada del aire.
 - b) Potencia de aspiración.
 - c) Bombeo de la muestra.
 - d) Diámetro de la boquilla.

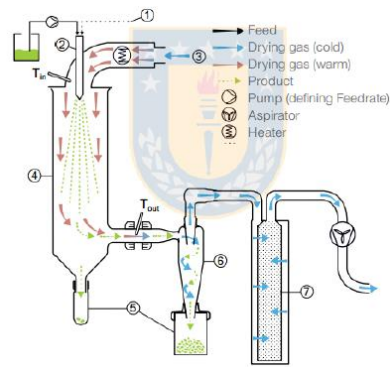


Figura 2: Esquema del Equipo Mini Spray Dryer B-290 y sus distintos componentes: 1) Ingreso del gas, 2)Boquilla de nebulización, 3)Gas de secado, 4) Cámara de secado, 5) Vasos recolectores, 6) Ciclón, 7) Filtro. (Jose Andres Villagra cusevich. Desarrollo de un sistema microparticulado para la administración oral de un antígeno contra *Piscirickettsia salmonis*. 2015;24).

[Sharma et al, 2007]

Las características finales de las micropartícula dependerán de una serie de parámetros que hay que considerar para su elaboración como son:

- Volumen y concentración del principio activo en la fase acuosa.
- Concentración del polímero en la fase orgánica.
- Tipo de polímero.
- Tiempo y velocidad de emulsificación.
- Tipo y cantidad de tensioactivo.

Las **características** finales más importantes que hay que estudiar incluyen:

- **Eficiencia de la encapsulación:** determina la cantidad de principio activo encapsulada con respecto a la cantidad inicial, por lo tanto, es un indicador de las pérdidas de principio activo durante el proceso de encapsulación.
- **Contenido de principio activo:** proporción de principio activo contenido en el interior de la micropartícula con respecto a la masa total de la misma. La micropartícula debe contener una concentración terapéutica de principio activo adecuada.
- **Tamaño de partícula:** debe ser el adecuado para que sean reconocidas por los macrófagos alveolares, por ello, deben presentar un tamaño de entre 1-6 μ m.
- **Estudios de cesión del farmaco** a partir de las MPs. El sistema deben liberar concentraciones de principio activo superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) durante el mayor tiempo posible.

NANOPARTÍCULAS

Las **nanopartículas** (NPs) son sistemas coloidales de tamaño inferior a una micra (1-1000 nm) y, generalmente, de naturaleza polimérica. **Según su estructura interna** pueden ser de dos tipos:

- **Reservorio:** presentan una cubierta y el principio activo se encuentra en el interior de un reservorio.
- **Matricial:** presentan una matriz polimérica en la cual se encuentra disuelto o disperso el principio activo.

Las nanopartículas se acumulan, principalmente, a nivel de hígado, pulmones y bazo, debido a su pequeño tamaño, se pueden funcionalizar.

[Singh et al, 2015]

MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Las **nanopartículas se pueden obtener por diferentes métodos**, los principales son:

- a) **Emulsión simple por evaporación o difusión del solvente:**
- b) **Nanoprecipitación:**

Método de emulsión simple por evaporación o difusión del solvente: el método es similar al explicado en la elaboración de micropartículas, la diferencia reside en que, en este caso, el tamaño de partícula que se desea obtener es menor, por lo que, la energía de agitación necesaria es mayor. Por ello, el sistema tipo palas no es válido y es necesario utilizar un equipo de ultrasonidos.

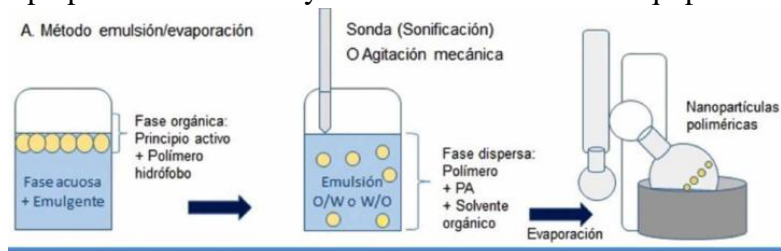


Figura 3: Esquema del proceso de elaboración de nanopartículas por el método de emulsión simple por evaporación o difusión del solvente. (Urrejola, M. C.; Soto, I. v.; Zumarán, C. C.; Peñaloza, J. P.; Álvarez, b.; Fuentevilla, I. & Haidar, Z. S. polymeric nanoparticle systems ii: structure, elaboration methods, characteristics, properties, biofunctionalization and self-assembly layer by layer technologies. *int. j. morphol.*, 36(4):1463-1471, 2018).

[Urrejola et all, 2018]

Método de nanoprecipitación, consta de varias etapas:

1. **En primer lugar el principio activo y el polímero se disuelven en el seno de una fase orgánica:** normalmente se disuelven en acetona junto con el polímero debe ser hidrófobo.
2. **En segundo lugar se debe preparar la fase acuosa:** formada, normalmente por tensioactivo como el PVA.
3. **En tercer lugar se debe añadir la fase acuosa sobre la fase oleosa:** se debe añadir en continua agitación para conseguir una mezcla homogénea y por goteo..
4. **Evaporación del disolvente orgánico:** éste debe tener un punto de ebullición bajo con el fin de aplicar temperaturas bajas que permitan la completa eliminación del disolvente sin alterar la estructura de las nanopartículas. Generalmente se realiza a vacío.
5. Una vez eliminado todo el disolvente orgánico se obtendrán las **nanopartículas**, las cuales se encuentran **en suspensión en una solución acuosa**.
6. Separación por ultracentrifugación y secado por liofilización

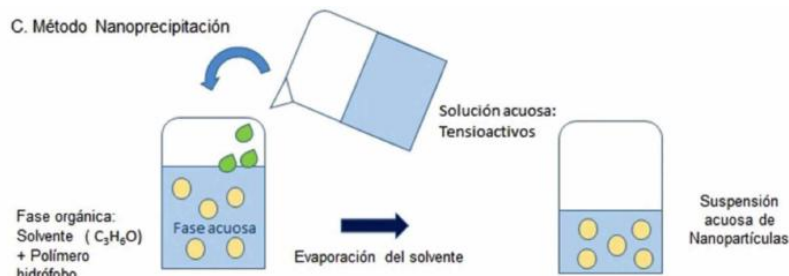


Figura 4: Esquema del proceso de elaboración de nanopartículas por el método de emulsión simple por evaporación o difusión del solvente. (Urrejola, M. C.; Soto, I. v.; Zumarán, C. C.; Peñaloza, J. P.; Álvarez, b.; Fuentevilla, I. & Haidar, Z. S. polymeric nanoparticle systems ii: structure, elaboration methods, characteristics, properties, biofunctionalization and self-assembly layer by layer technologies. *int. j. morphol.*, 36(4):1463-1471, 2018).

[Urrejola et all, 2018]

MICROPARTÍCULAS VERSUS NANOPARTÍCULAS PARA VECTORIZACIÓN A MACROFAGOS

Las dos diferencias mas importantes son:

- a) Las **micropartículas** no necesitan un proceso de funcionalización, ya que, cuando el tamaño es adecuado, 1-6 μm , son reconocidas y fagocitadas directamente por los macrófagos (**vectorización pasiva**); Sin embargo, debido al pequeño tamaño de las **nanopartículas**, no son reconocidas directamente por los macrófagos y, por lo tanto, no son fagocitadas, es por ello que es necesario funcionalizarlas con ligandos que sean reconocidos por receptores presentes en la superficie de los macrófagos (**vectorización activa**) y, consecuentemente, este proceso encarece su elaboración.
- b) Las **micropartículas** permiten una **mayor carga de principio activo** en su interior que las nanopartículas; Además, con las primeras, se consigue, con mayor facilidad, obtener un sistema de liberación sostenida de fármaco en el tiempo. Ambas características de las **micropartículas permiten una administración de dosis más espaciada en el tiempo**, sin embargo, con las nanopartículas se necesita mayor número de administraciones.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre diferentes tipos de sistemas, nanopartículas y micropartículas, que permitan la vectorización de antituberculosos a macrófagos, con el fin de mejorar las terapias utilizadas habitualmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de esta revisión bibliográfica se hizo una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos como Pubmed, Journal of Leucy Biology (JLB), ScienceDirect, Journal of antimicrobial chemotherapy, Medline, Google Académico, Bucea; Utilizando palabras clave como "micropartículas", "nanopartículas", "Tuberculosis", *Mycobacterium tuberculosis*", tanto en castellano como en inglés.

Para ello, en primer lugar, se realizó una revisión general de la tuberculosis. A continuación, una búsqueda bibliográfica sobre algunos de los sistemas más habituales para vectorización de fármacos: nanopartículas y micropartículas. Posteriormente, se seleccionaron los estudios que resultaron más prometedores y se compararon los resultados. **Para seleccionar los artículos más relevantes se han tenido en cuenta los siguientes aspectos:**

- Que el sistema sea capaz de evitar la degradación del principio activo.
- Que el sistema sea capaz de aumentar la eficacia del principio activo, lo cual permite una reducción de la dosis.
- Que el sistema sea capaz de evitar la aparición de resistencias.
- Que el sistema sea capaz de prolongar la duración de los efectos, ya que, estas técnicas permiten obtener sistemas de liberación controlada.
- Que el sistema sea capaz de aumentar el intervalo de dosificación.
- Que el sistema sea capaz de reducir los efectos secundarios, ya que, al vectorizar, se pretende que la totalidad del fármaco se libere en el lugar de acción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los artículos incluidos en esa revisión tratan de demostrar que los fármacos vectorizados a macrófagos, cuando se administran en el interior de micropartículas o nanopartículas, son más eficaces que si se administraran mediante una terapia convencional, y, por lo tanto, mediante estos recursos tecnológicos, se persigue alcanzar el reservorio de *Mycobacterium tuberculosis* en los macrófagos alveolares, con el fin de disminuir tanto el número de portadores del microorganismo como la incidencia de la enfermedad.

Varios autores como [Wofford et al, 2019], [Guo et al, 2019],[Urbanick et al, 2019], [Pavan et al, 2007], destacando a [Sharma et al, 2007] propusieron una estrategia para conseguir estos objetivos, mediante la administración de micropartículas cargadas con isoniazida y rifampicina para su administración por vía inhalatoria. Ambos fármacos son antimicrobianos y su finalidad es **activar los mecanismos bactericidas propios de los macrófagos alveolares**. Para elaborar estas micropartículas se utilizó la técnica de Spray-drying:

- **Formación de la fase orgánica:** se disuelven la rifampicina y el ácido poliláctico (PLA), el cual se utiliza para aumentar la viscosidad, en diclorometano (DCM).
- **Formación de la fase acuosa:** se disuelve la isoniazida en metanol.
- **Formación de la emulsión:** se adiciona la fase acuosa sobre la orgánica, siempre en constante agitación, obteniéndose una emulsión de fase externa oleosa (A/O).
- **Equipo spray-drying:** la emulsión se introduce en dicho equipo para realizar un secado por atomización y, de esta manera, obtener las micropartículas cargadas con rifampicina e isoniazida.

Evaluación in vivo:

Todos los estudios se llevaron a cabo en líneas de ratones clon J774. Para evaluar la **eficacia del tratamiento** se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- a) **Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS):** un aumento de estos marcadores es indicativo de una disminución del citocromo C, el cual participa en el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto se debe a que las micropartículas inducen la activación de la NADPH oxidasa, proceso dependiente de calcio. Si aumentan las ROS es señal de muerte bacteriana, y, por lo tanto, el tratamiento es efectivo. Estas ROS se evalúan mediante citometría de flujo:
- b) **Determinación de Intermedios reactivos de nitrógeno (RNI):** un aumento de estos marcadores es indicativo de daño bacteriano, luego, también lo es de eficacia terapéutica. Se evalúan mediante el reactivo de Griess.
- c) **Producción de citoquinas:** son indicativas de un aumento de la respuesta inflamatoria, por lo tanto, indican eficacia terapéutica. Se evalúan las siguientes citoquinas: TNF- α , Interferón- γ (IFN- γ) y las interleucinas 10 y 12 (IL-10 e IL-12). Se evalúan mediante la técnica de ELISA.

Las micropartículas fagocitadas por los macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, inducen la producción de óxido nítrico (NO), el cual es el responsable de la producción de ROS, principalmente el anión superóxido (O₂⁻), de RNI y de citoquinas pro-inflamatorias.

Para **evaluar la producción de óxido nítrico** se realizó un estudio con ratones de experimentación a los cuales se les inocularon macrófagos alveolares infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, a

excepción del grupo patrón que no fue infectado con el microorganismo, a partir de este punto se realizaron diferentes tratamientos:

- U+MP:** ratones inoculados con células no infectadas por el microorganismo y tratados con micropartículas. **Grupo control negativo.**
- Inf:** ratones inoculados con células infectadas por el microorganismo atenuado pero sin tratamiento adicional. **Grupo control positivo.**
- Inf+D:** ratones inoculados con células infectadas por el microorganismo en tratamiento oral con los fármacos en disolución.
- Inf+MP:** ratones inoculados con células infectadas por el microorganismo en tratamiento inhalatorio con las micropartículas cargadas de fármaco con la misma dosis que el tratamiento oral.

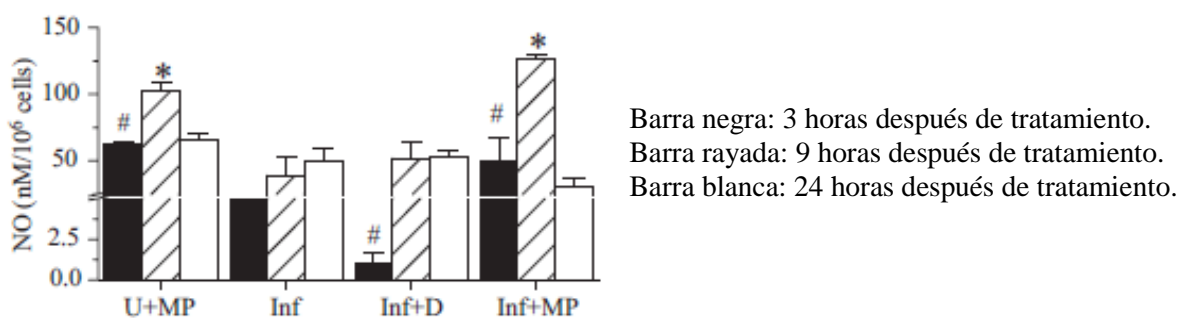


Figura 5: NO producido por los macrófagos alveolares. (Rolee Sharma¹, Pavan Muttill¹, Awadh Bihari Yadav¹, Srikanta Kumar Rath², Virendra Kumar Bajpai³, Uthirappan Mani⁴ and Amit Misra¹. Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, 59, 499–506, 2007)

Como se demuestra en la figura 5, aquellos animales tratados mediante una disolución de isoniazida+rifampicina apenas aumentaban la producción de NO, luego, el tratamiento terapéutico presenta una efectividad baja y no conseguirá eliminar el reservorio del microorganismo; Sin embargo, en aquellos animales tratados con micropartículas, aumentaba considerablemente la producción de NO, luego, la terapia presentaba mayor efectividad y, por lo tanto, habría mayor probabilidad de eliminar el reservorio del microorganismo.

Para la **evaluación de la producción de citoquinas** se llevo a cabo una comparación de los niveles normales de las mismas con los niveles producidos por los anteriores grupos:

- **Aquellos inoculados con el microorganismo atenuado pero sin tratamiento** presentan regulación a la alta de TNF- α , IFN- γ e IL-10.
- **Aquellos inoculados con el microorganismo y con tratamiento oral** presentan regulación a la baja de TNF- α , IFN- γ e IL-10.
- **Aquellos inoculados con el microorganismo y en tratamiento con micropartículas** presentan un aumento en la producción de IL-12 y TNF- α , y una producción similar al grupo inoculado con el microorganismo atenuado de IL-10 e IFN- γ .

A la vista de los resultados, cabe destacar que, la fagocitosis de las micropartículas por parte de los macrófagos alveolares induce una respuesta más potente y efectiva frente al microorganismo que la respuesta producida por la terapia oral, luego, mediante el tratamiento con micropartículas inhaladas, la probabilidad de éxito terapéutico es mayor.

[Lemmer et al, 2015] realizaron un estudio empleando **nanopartículas de PLGA cargadas con isoniazida y funcionalizadas con ácidos micólicos (MA)**. Los ácidos micólicos son el componente mayoritario de la envoltura externa de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, y, además, juegan un papel importante en la virulencia del microorganismo, ya que, promueven una respuesta celular de tipo Th1, además, presentan elevada afinidad por el colesterol. La hipótesis que se plantea es la siguiente:

- Los ácidos micólicos de las PLGA-nanopartículas reaccionan con los anticuerpos anti-MA generados por el organismo en el lugar de la infección. Esta unión facilita la fagocitosis por parte de los macrófagos infectados y por los circundantes no infectados.
- La membrana de los fagosomas presente en los macrófagos, en los cuales se encuentra alojado el microorganismo, es rica en colesterol. Los ácidos micólicos presentan elevada afinidad por el colesterol, esto facilita que las nanopartículas sean fagocitadas y liberen los principios activos en el lugar de acción.

Para realizar este estudio las **PLGA-nanopartículas se obtuvieron** por el método de emulsión doble por evaporación o difusión del solvente:

1. **Formación de la fase orgánica:** para ello se disuelve PLGA en diclorometano.
2. **Formación de la fase acuosa:** para ello se disuelve la isoniazida en agua y PBS, el cual actúa como tampón.
3. **Formación de la emulsión:** se añade la fase acuosa sobre la orgánica en continua agitación. Para ello se utiliza un equipo de ultrasonidos, el cual, gira a 5000rpm. Transcurridos 3 minutos se obtiene una emulsión de fase externa oleosa (A/O).
4. **Re-emulsificación:** la emulsión anteriormente formada se añade sobre otra fase orgánica, la cual esta formada por el ácido micólico disuelto en diclorometano. Se agita con un equipo de ultrasonidos a 8000rpm durante 7 minutos y posteriormente a 5000rpm durante, aproximadamente, 10-12 horas. Tras esto, se obtiene una doble emulsión de fase externa acuosa (A/O/A).
5. **Purificación:** el diclorometano se elimina por evaporación, gracias al calor generado durante la centrifugación.
6. **Separación y purificación de las micropartículas:** se realiza mediante liofilización.

Los estudios realizados en cultivos celulares, ratones y cobayas demuestran que, gracias a la funcionalización con ácidos micólicos, la cantidad de fármaco necesaria para el tratamiento es menor, ya que, las nanopartículas liberan el fármaco en la diana terapéutica, esto disminuye la probabilidad de efectos secundarios sistémicos. Además, se comprueba que las nanopartículas funcionalizadas presentan una mayor fagocitosis que aquellas que no lo están, esto permite liberar mayor cantidad de fármaco en el foco de infección.

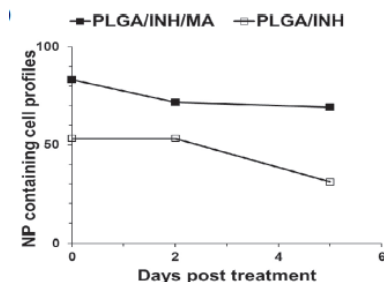


Figura 6: crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* tras el tratamiento con nanopartículas cargadas con isoniazida, con ácidos micólicos y sin ellos. (Lemmer Y., Kalombo L., Pietersen RD., Jones AT., Semete B., Van S., Ramalapa B., Stoltz AC., Baker B., Verschoor JA., Swai HS., de Chastellier C. Mycolic acids, a promising mycobacterial ligand for targeting of nanoencapsulated drugs in tuberculosis. 211, 94–104, 2015.)

Con respecto a la localización dentro del fagosoma, las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar, una vez fagocitadas por los macrófagos, permanecen un tiempo similar en el interior de los fagosomas.

Además, los estudios in vivo demostraron que las MA-PLGA-nanopartículas cargadas con isoniazida han mostrado una liberación sostenida del fármaco durante varios días, lo cual, permite reducir la frecuencia de administración del tratamiento. También, al alcanzar la concentración mínima inhibitoria en el lugar de acción, consiguen impedir el crecimiento y multiplicación de *Mycobacterium tuberculosis*, luego, la probabilidad de éxito terapéutico es mayor.

[Vanesa Andreu et al, 2019] realizan un estudio empleando **nanopartículas de PLGA cargadas con rifampicina encapsuladas en micropartículas de Eudragit L**. Esta técnica se realiza con el fin de poder utilizar la vía oral, debido a que, es la menos invasiva y la más aceptada por la población. El principal inconveniente de la **rifampicina es que es inestable a pH ácido**, luego, si se administrará por vía oral se degradaría y la eficacia terapéutica disminuiría. Al introducir el fármaco en el interior de las nanopartículas se protege al mismo del pH ácido del estómago y, consecuentemente, se aumenta su biodisponibilidad.

También se deben tener en cuenta los **problemas** que presentan las **nanopartículas**:

- Son inestables en medio ácido:** para solventar este inconveniente las nanopartículas se encuentran, a su vez, encapsuladas en el interior de una micropartícula. Esta última presenta una cubierta gastrorresistente (formada por Eudragit L), de tal forma que, permite que no se degraden las nanopartículas cargadas con el fármaco en el estómago. Una vez en el intestino, debido al pH más básico de éste, el Eudragit L se disuelve y la nanopartícula queda libre.
- Absorción:** se absorben mediante difusión facilitada o simple, pero, para ello, deben presentar un tamaño adecuado. Además del tamaño, para facilitar la absorción, se elabora un formulación mucoadhesiva, de tal forma que, las nanopartículas permanecen más tiempo en contacto con el epitelio intestinal y, por lo tanto, aumentan su probabilidad de absorción.
- Funcionalización:** debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas no son reconocidas por los macrófagos alveolares, luego, en su membrana, deben llevar un ligando que les permita dirigirse y ser reconocidas por los macrófagos alveolares. En este estudio, debido al elevado peso molecular del PLGA utilizado, no fue necesario funcionalizar.

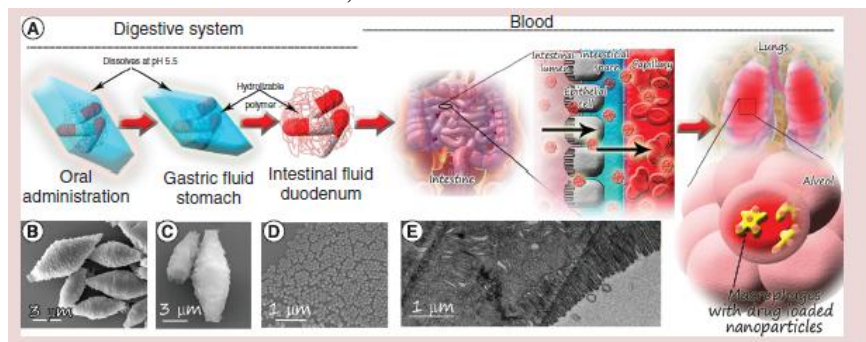


Figura 7: modelo de liberación del fármaco. (Vanesa Andreu^{‡,1}, Ane Larrea^{‡,1,2}, Pablo Rodriguez Fernandez^{‡,3,4,5,6}, Salvador Alfaró¹, Begon[~] a Gracia^{4,7}, Ainhoa Luc[´]ia^{4,7}, Laura Uso[´] n^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**},^{1,2}, Jos[´]e Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,2019)

Para la **elaboración de nanopartículas** se elige **PLGA**, debido a que, su biodegradabilidad y biocompatibilidad son conocidas, y también se utiliza **ácido plurónico** como surfactante.

Para la **elaboración de micropartículas** se utiliza **Eudragit®L 100-55**: es un copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo aniónico. Presenta grupos carboxilo que permanecen ionizados a $\text{pH} \geq 5,5$, lo cual ofrece protección frente al medio ácido del estómago. Pero, es soluble a pH duodenal, disolviéndose y liberando la nanopartícula.

La **elaboración** de esta forma tecnológica se realizó mediante el siguiente protocolo:

1) Elaboración de las nanopartículas: mediante el método de emulsión simple por evaporación o difusión del solvente. Para ello se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Elaboración de la fase orgánica:** se disuelven el polímero de PLGA, la rifampicina y el ácido plurónico en acetato de etilo.
- Elaboración de la fase acuosa:** formada por agua.
- Formación de la emulsión:** se añade la fase acuosa sobre la fase orgánica en constante agitación. El sistema de agitación utilizado es un equipo de ultrasonidos que gira a 600rpm. El proceso dura, aproximadamente, 3 horas. Una vez que finaliza el proceso se obtiene una emulsión de fase externa oleosa (A/O).
- Eliminación del acetato de etilo:** el disolvente se evapora gracias al calor generado por el equipo de ultrasonidos.

2) Elaboración de las micropartículas: mediante el método de emulsión doble por evaporación o difusión del solvente. Para ello se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Elaboración de la fase acuosa:** formada por las nanopartículas anteriormente formadas y agua.
- Elaboración de la fase orgánica:** formada por Eudragit L disuelto en etanol.
- Formación de la emulsión:** se añade la fase acuosa sobre la fase orgánica en constante agitación. El sistema de agitación utilizado es un equipo de ultrasonidos. Al finalizar el proceso de agitación se obtendrá una emulsión de fase externa oleosa (A/O).
- Re-emulsificación:** la emulsión anteriormente formada se añade a un segundo disolvente orgánico, en este caso correspondería al colato de sodio, en continua agitación. De esta forma se obtiene una doble emulsión de fase externa acuosa (A/O/A), en la cual, el principio activo se encuentra en el interior de las gotículas junto con los dos disolventes orgánicos, rodeados de la fase acuosa.
- Purificación:** el disolvente orgánico se elimina gracias al calor generado por el equipo de ultrasonidos, el cual gira a 600rpm. El proceso dura, aproximadamente, 3 horas
- Separación y purificación de las micropartículas:** las partículas poliméricas son colectadas por centrifugación o filtración, tras este proceso se procede al secado de las micropartículas, las cuales contienen en su interior las PLGA-nanopartículas cargadas de rifampicina.

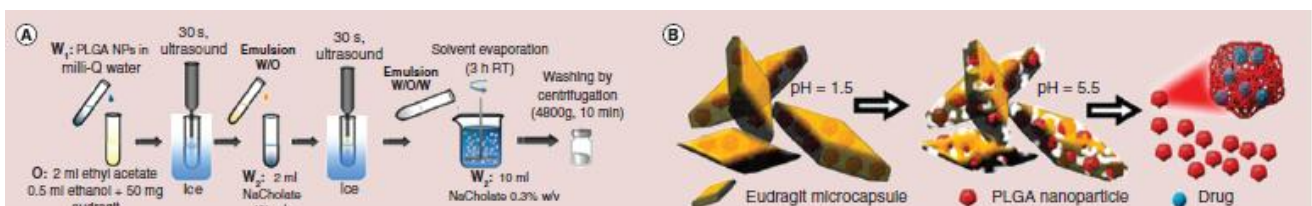


Figura 8: elaboración y liberación de las PLGA-nanopartículas cargadas con rifampicina. (Vanessa Andreu^{‡,1}, Ane Larrea^{‡,1,2}, Pablo Rodríguez Fernández^{‡,3,4,5,6}, Salvador Alfaro¹, Begon[~] a Gracia^{4,7}, Ainhoa Lucía^{4,7}, Laura Uso^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina

Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**},^{1,2}, Jos é Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,²⁰¹⁹)

En este trabajo se realizaron varios estudios:

1) Degradación de rifampicina en medio ácido: este estudio se realizó en base a que *Mycobacterium tuberculosis* reside en un compartimento ácido (el pH de los macrófagos oscila entre 4,5-6), luego, se deben establecer con minucioso cuidado las condiciones de elaboración y concentración de rifampicina, con el fin de que ésta no se degrade. Se comprobó que la rifampicina, una vez liberada de la micropartícula, en el medio ácido se degradaba, presentando una vida media de 12 horas. Para llevar a cabo dicho estudio se realizó un cultivo de las micropartículas en medio ácido (pH=4,5) durante 25 días, comprobándose la cantidad de rifampicina detectada procedente las micropartículas, la cual, se compara con la actividad de rifampicina de una solución control. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Table 1. Bioassay-based quantification of rifampicin released from poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles, in comparison with the amount detected from a free solution of rifampicin.

pH	Days	% Rif detected from Rif-loaded NPs	% activity of a control Rif solution
4.5	3	40.3	98.1
	7	10.1	39.9
	14	<6.0	6.0
	25	<6.0	<6.0

NP: Nanoparticle; Rif: Rifampicin.

Tabla 1: actividad de rifampicina en medio ácido. (Vanesa Andreu[‡],¹, Ane Larrea[‡],^{1,2}, Pablo Rodriguez Fernandez[‡],^{3,4,5,6}, Salvador Alfaro¹, Begoñ a Gracia^{4,7}, Ainhoa Luc ía^{4,7}, Laura Usó n^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**},^{1,2}, Jos é Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,²⁰¹⁹.)

En primer lugar cabe destacar que, en el caso de las micropartículas-PLGA-nanopartículas, se detectó menor cantidad de rifampicina. Esto posiblemente se deba a los productos de degradación del PLGA, el ácido láctico y el ácido glicólico, que aumentan las condiciones ácidas del medio y, por lo tanto, la degradación de la rifampicina.

En segundo lugar cabe destacar que, tras dos semanas, en ambos casos, se detecta menos de un 6% de actividad, esto indica que la velocidad de degradación del antibiótico aumenta en medio ácido.

2) Impacto de las PLGA-micropartículas-nanopartículas en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*: para llevar a cabo dicho estudio se utilizaron micropartículas cargadas con rifampicina y micropartículas vacías, obteniéndose los siguientes resultados:

- a) Las micropartículas vacías produjeron un ligero retraso en el crecimiento del microorganismo, esto se debe a que el PLGA presenta propiedades intrínsecas frente a *Mycobacterium tuberculosis*; A su vez, también se demostró que, aquellas micropartículas cargadas con una concentración subinhibitoria de rifampicina producían un retraso en el crecimiento ligeramente mayor que la misma cantidad de micropartículas sin fármaco:

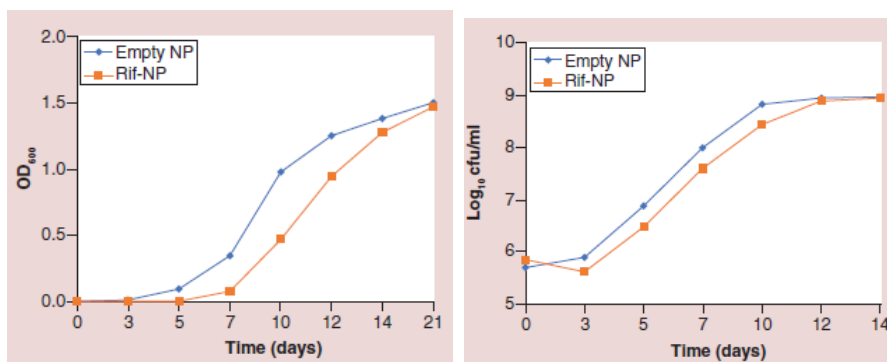


Figura 9: Número de microorganismos viables en función de los diferentes tratamientos. (Vanesa Andreu^{‡,1}, Ane Larrea^{‡,1,2}, Pablo Rodríguez Fernández^{‡,3,4,5,6}, Salvador Alfaro¹, Begon[~] a Gracia^{4,7}, Ainhoa Luc^{ía4,7}, Laura Uso[´] n^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**1,2}, Jos[´]e Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,2019)

- b) Estimación de la actividad antibacteriana de las PLGA-micropartículas-nanopartículas cargadas con rifampicina: para estudiar el comportamiento en condiciones similares a las humanas se realizó un estudio de cinética de eliminación temporal a pH 4,5. Como muestra la siguiente gráfica, las micropartículas cargadas con rifampicina y la rifampicina en disolución presentan similar actividad antimicrobiana, y, la actividad frente al microorganismo presentada por las micropartículas sin rifampicina se debe al PLGA:

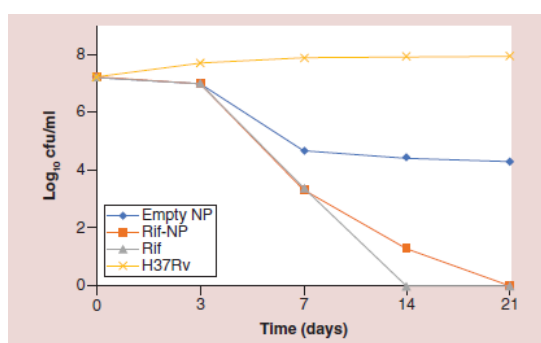


Figura 10: Actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos. (Vanesa Andreu^{‡,1}, Ane Larrea^{‡,1,2}, Pablo Rodríguez Fernández^{‡,3,4,5,6}, Salvador Alfaro¹, Begon[~] a Gracia^{4,7}, Ainhoa Luc^{ía4,7}, Laura Uso[´] n^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**1,2}, Jos[´]e Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,2019)

Para la **evaluación de la viabilidad bacteriana y el efecto citotóxico** del tratamiento se realizó un estudio con rifampicina cargada en las nanopartículas y rifampicina en disolución, utilizándose para ello dos líneas celulares diferentes:

- TC7 Caco2:** estas células se seleccionaron, debido a que, son las más usadas en modelos in vitro para estudiar el transporte intestinal de fármacos de administración oral.
- MH-S macrófagos alveolares:** se eligieron debido a que estas células son la diana terapéutica del tratamiento en estudio.

Las **células TC7 Caco2** se utilizaron para simular el transporte y absorción intestinal que tendrían in vivo las micropartículas. Los resultados probaron que las células epiteliales intestinales son capaces de absorber las nanopartículas cargadas con rifampicina mediante una difusión pasiva o facilitada.

B TC7 Caco2 epithelial monolayer

Rifampicin concentration, ppm		µg Rifampicin / mm ² h	% transport
Apical side	Basolateral side		
65	4,20	0,0015	6.5
130	7,97	0,0028	6.1
260	12,94	0,0046	5.0

Tabla 2: permeabilidad de las células TC7 Caco2 a las nanopartículas cargadas con rifampicina. (Vanesa Andreu^{‡,1}, Ane Larrea^{‡,1,2}, Pablo Rodríguez Fernández^{‡,3,4,5,6}, Salvador Alfaro¹, Begon[~] a Gracia^{4,7}, Ainhoa Luc^ía^{4,7}, Laura Uso[´]n^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**},^{1,2}, Jos[´]e Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,2019.)

Los **MH-S macrófagos alveolares** se utilizaron para estudiar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* bajo el tratamiento de nanopartículas cargadas con rifampicina a diferentes concentraciones (4 y 24µg/ml). Los resultados probaron que ambas concentraciones inhibían el crecimiento del microorganismos con mayor eficacia que la rifampicina en disolución. Además, en la formulación de 24µg/ml, se observa un efecto sinérgico entre la actividad antibacteriana de la rifampicina y el PLGA, sin embargo, este efecto no se observa en la formulación de 4µg/ml debido a la baja concentración de PLGA.

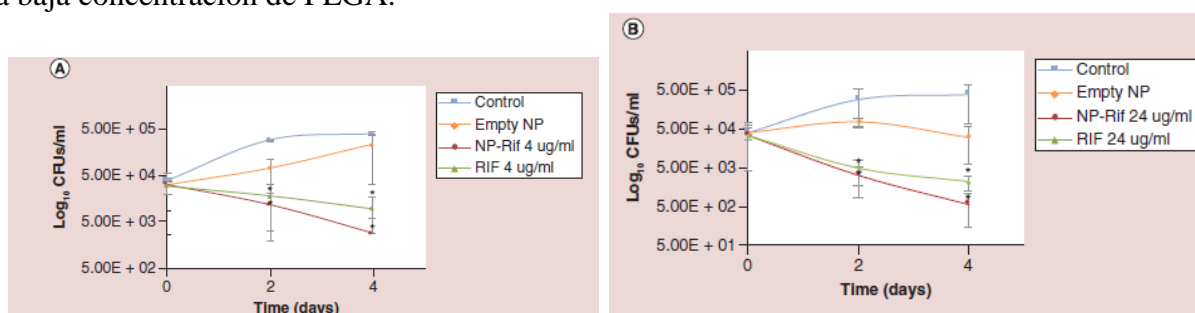


Tabla 3: viabilidad de *Mycobacterium tuberculosis* frente a difrentes tratamientos de rifampicina. (Vanesa Andreu^{‡,1}, Ane Larrea^{‡,1,2}, Pablo Rodríguez Fernández^{‡,3,4,5,6}, Salvador Alfaro¹, Begon[~] a Gracia^{4,7}, Ainhoa Luc^ía^{4,7}, Laura Uso[´]n^{1,2}, Andromeda Celeste Gomez^{3,4,5,6}, Gracia Mendoza¹, Alicia Lacoma^{3,4,5}, Jose Dominguez^{3,4,5}, Cristina Prat^{3,4,5}, Victor Sebastian^{**},^{1,2}, Jos[´]e Antonio Ainsa^{4,7} & Manuel Arruebo. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*,2019.)

CONCLUSIÓN

La incidencia de la tuberculosis es elevada y continua aumentando en los últimos años. La morbilidad y mortalidad de la enfermedad, son altas, sobre todo, si esta patología va asociadas a otras inmunodeficiencias como el VIH. Además, Las resistencias dificultan encontrar tratamientos efectivos frente al microorganismo.

Las **micropartículas de PLGA** mejoran ligeramente la eficacia terapéutica al conseguir el acceso del fármaco a la diana terapéutica del estudio. Sin embargo, no presentan una eficacia bactericida significativamente superior a la de la terapia convencional; Las **nanopartículas recubiertas de Eudragit L** presentan la ventaja de administrarse por vía oral, lo cual, facilita una mayor aceptación por parte de la población; Aunque, como en el caso de las micropartículas, la eficacia bactericida es similar a la del tratamiento convencional, además de que, estos sistemas presentan un coste económico mayor que las micropartículas. Por otro lado, las **MA-PLGA-nanopartículas** cargadas con isoniazida demostraron una eficacia bactericida superior a los tratamientos convencionales.

Aunque las estrategias parezcan adecuadas, se deben realizar más estudios con el fin de mejorar los resultados y conseguir una concentración de antibiótico a nivel alveolar suficiente como para erradicar el reservorio del microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu V., Larrea A., Rodriguez P., Alfaro S., Gracia B., Lucía A., Usón L., Gomez AC., Mendoza G., Lacoma A., Dominguez J., Prat C., Sebastian V., Ainsa JA., Arruebo M. Matryoshka-type gastro-resistant microparticles for the oral treatment of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nanomedicine*. 1:1-20. 2018.
2. Beste DJV., Laing E., Bonde B, Avignone C., Bushell ME., McFadden JJ. Transcriptomic analysis identifies growth rate modulation as a component of the Adaptation of *Mycobacteria* to survival inside the macrophage. *Journal Bacteriol*. 189:3969-3976. 2007.
3. Chen, G., Tian, F., Li, C., Zhang, Y., Weng, Z., Zhang, Y., Peng, R., Wang, Q. In vivo real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging. *Biomaterials*. 53:265-73. 2015.
4. Dube D., Agrawal GP., Vyas SP. Tuberculosis: from molecular pathogenesis to effective drug carrier design. *Drug Discovery Today*. 17: 760–773. 2012.
5. Guo A., Durymanov M., Permyakova A., Sene S., Serre C., Reineke J. Metal Organic Framework (MOF) Particles as Potential Bacteria-Mimicking Delivery Systems for Infectious Diseases: Characterization and Cellular Internalization in Alveolar Macrophages. *Pharm Res*. 1: 36-53. 2019.
6. Guo M., Wu F., Hu G., Chen L., Xu J., Xu P., Wang X., Li Y., Liu S., Zhang S., Huang Q., Fan J., Lv Z., Zhou M., Duan L., Liao T., Yang G., Tang K., Liu B., Liao X., Tao X., Jin Y. Autologous tumor cell-derived microparticle-based targeted chemotherapy in lung cancer patients with malignant pleural effusion. *Science translational medicine*. 11:1-15.2019.
7. Horita Y., Takii T., Yagi T., Ogawa K., Fujiwara N., Inagaki E., Kremer L., Sato Y., Kuroishi R., Lee Y., Makino T., Mizukami H., Hasegawa T., Yamamoto R., Onozakia K. Antitubercular Activity of Disulfiram, an Antialcoholism Drug, against Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56:1-6.2012
8. Hsuan C., Yu L., Pei W., Pei L., Li W. Length effect of methoxy poly(ethylene oxide)-b-[poly (caprolactone)-g-poly(methacrylic acid)] copolymers on cisplatin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 156: 243-253. 2017.
9. Jaspert S., Piel G., Delattre L. Solid lipid microparticles: formulation, preparation characterization, drug release and applications- a review. *Expert Opin Drug Deliv*. 2: 1-12. 2005.
10. Khan A., Kumar V., Hunter R., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *Journal of Leukocy-Biology*. 1:1-8. 2019.
11. Kisich KO., Gelperina S., Higgins MP., Wilson S., Shipulo E., Oganessian E., Heifets L. Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Pharmaceutics*. 345: 154–162. 2007.
12. Lemmer Y., Kalombo L., Dean R., Jones A., Semete B., Van S., Ramalapa B., Stoltz A., Baker B., Verschoor JA., Swai H., de Chastellier C. Mycolic acids, a promising mycobacterial ligand for

- targeting of nanoencapsulated drugs in tuberculosis. *Journal of Controlled Release*. 211:94-104.2015.
13. McKiernan PJ., Lynch P., Ramsey JM., Cryan SA., Greene CM. Knockdown of Gene Expression in Macrophages by microRNA Mimic-Containing Poly (Lactic-co-glycolic Acid) Microparticles. *MDPI*. 133: 1-13. 2018.
 14. Mishra PK., Palma M., Buechel B., Moore J., Davra V., Chu N., Millman A., Hallab NJ., Kanneganti TD., Birge RB., Behrens EM., Rivera A., Beebe KS., Benevenia J., Gause WC. Sterile particle-induced inflammation is mediated by macrophages releasing IL-33 through a Bruton's tyrosine kinase-dependent pathway. *Nature materials*. 1: 1-15. 2019.
 15. Moraes JA., Frony AC., Barcellos P., Menezes M., Barbosa TB., Farias C., Boisson C., Barja C. Downregulation of Microparticle Release and Pro-Inflammatory Properties of Activated Human Polymorphonuclear Neutrophils by LMW Fucoidan. *Journal of innate immunity*. 1:1-17. 2018.
 16. Muttill P., Kaur J., Kumar K., Bihari A., Sharma R., Misra A. Inhalable microparticles containing large payload of anti-tuberculosis drugs. *Science Direct*. 32:140-150. 2007.
 17. Noorlander C., Kooi M., Oomen A., Park MV., Vandebriel R., Geertsma R. Horizon scan of nanomedicinal products. *Nanomedicine* 10. 10: 1599–1608. 2015.
 18. Nosenko M., Moysenovich A., Zvartsev R., Arkhipova A., Zhdanova A., Agapov I., Vasilieva T., Bogush V., Debabov V., Nedospasov S., Moisenovich M., Drutskaya M. Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis. *Frontiers in Immunology*. 9:1-11. 2018.
 19. Nyaku A., Kelly S., Taiwo. Long-Acting Antiretrovirals: Where Are We now?. *Curr HIV/AIDS Rep*. 1:1-9. 2017.
 20. Okuda Y., Fukumoto M., Horie T., Oku H., Takai S., Nakanishi T., Matsuzaki K., Tsujimoto H., Ikeda T., Periocular injection of candesartan-PLGAmicroparticles inhibits laser-induced experimental choroidal neovascularization. *Clinical Ophthalmology*. 13:87-93. 2019.
 21. Paone S., Baxter A., Hulett M., Poon I. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1:1-14. 2018.
 22. Patil K., BagadeS., Bonde S., Sharma S., Saraogi G. Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis: Challenges and opportunities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 99: 735-745. 2018.
 23. Semete B., Booyesen L., Lemmer Y., Kalombo L., Katata L., Verschoor J., Swai HS. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems, *Nanomedicine* 6: 662–671. 2010.
 24. Sharma M., Sharma V., Panda AK., Majumdar DK. Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery. *Yakugaku Zasshi*. 131(5):697-709. 2011.

25. Sharma R., Muttill P., Bihari A., Kumar S., Kumar V., Mani U., Misra A. Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59:499-506. 2007.
26. Shin D., Christie C., Ju D., Kumar R., Molina S., Berg K., Krasieva TB., Madsen SJ., Hirschberg H. Photochemical internalization enhanced macrophage delivered chemotherapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 21: 156-162. 2018.
27. Singh J., Garg T., Rath G., Goyal A. Advances in nanotechnology-based carrier systems for targeted delivery of bioactive drug molecules with special emphasis on immunotherapy in drug resistant tuberculosis – a critical review. *Drug Delivery*. 1:1-24. 2015.
28. Urbaniak T., Machová D., Janoušková O., Musiał W. Microparticles of Lamivudine—Poly-Caprolactone Conjugate for Drug Delivery via Internalization by Macrophages. *MDPI*. 24:1-14. 2019.
29. Verschoor JA., Baird MS., Grooten J. Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of Mycobacterium tuberculosis. *Progress in Lipid Research*. 51: 325–339. 2012.
30. Wofford K., Cullen D., Spiller K., Modulation of macrophage phenotype via phagocytosis of drug-loaded microparticles. *Journal Biomed Mater Res. Part A*: 1-12. 2019.