

Uso de nanopartículas poliméricas para la eliminación de biopelículas bacterianas

Pedro Jesús García Murillo

Resumen—Las infecciones por bacterias formadoras de biopelículas, como *Pseudomonas aeruginosa*, son una de las principales amenazas para pacientes hospitalizados y una de las causas más importantes de la aparición de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y de fibrosis quística. La relevancia de estas infecciones es mayor debido a la resistencia otorgada por la biopelícula frente a los antibióticos convencionales. Esto hace necesario el desarrollo de nuevas terapias y tratamientos frente a este tipo de microorganismos en la lucha contra las enfermedades infecciosas modernas. En este artículo veremos cómo podemos utilizar nanopartículas poliméricas de ácido poli (láctico-co-glicólico) como nueva herramienta frente a estas bacterias y a la biopelícula bacteriana como nueva diana para el tratamiento de estas enfermedades.

Palabras Claves— Biopelícula, Ciprofloxacino, DNasa I, Fibrosis quística, PLGA.



1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales en el mundo y se suele asociar a pacientes de fibrosis quística y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), siendo en estos pacientes la principal causa de morbilidad y mortalidad [1], [2].

La aparición de una infección crónica por *Pseudomonas* se debe a la formación por parte de este microorganismo de una estructura denominada biopelícula, constituida por agrupaciones de bacterias adheridas a una superficie y embebidas en una matriz polimérica [3]. Estas bacterias tienen más probabilidades de resistir a los tratamientos con antibióticos debido a que el fármaco no es capaz de difundir a través de la biopelícula [4]. Además, las bacterias en biopelículas presentan una fisiología diferente a la de células planctónicas, como por ejemplo, una tasa metabólica más baja, disminuyendo la eficacia de los antibióticos y aumentando las posibilidades de que aparezcan cepas resistentes a los antibióticos disponibles, lo que exige el desarrollo de nuevas líneas terapéuticas [5], [6].

Nuevos dispositivos, como las nanopartículas poliméricas, han sido estudiados para el tratamiento de infecciones bacterianas por su capacidad de encapsular y liberar sustancias de forma sostenida [7].

2. IMPORTANCIA DE LAS BIOPELÍCULAS

El crecimiento en biopelículas de los microorganismos ha sido ampliamente estudiado y, en particular, en *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infección broncopulmonar. La matriz de la biopelícula está compuesta principalmente por proteínas, cadenas de polisacáridos y ADN extracelular (eADN) [8].

Esta estructura confiere una resistencia a las bacterias frente a antimicrobianos, permitiendo que se produzcan episodios recurrentes tras el tratamiento debido a una

erradicación incompleta de la infección. Esta resistencia se produce por varias causas: a) la barrera de difusión que proporciona resistencia a la penetración de los antimicrobianos a través de la matriz de la biopelícula, b) el lento crecimiento de las bacterias en las biopelículas por la limitación de nutrientes que dificulta la acción de los antimicrobianos y c) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de fenotipos que favorecen el desarrollo de mutantes resistentes [8].

Por ello, se ha empezado a pensar que, además de la célula bacteriana, la matriz de la biopelícula puede ser una posible diana para el tratamiento de infecciones de bacterias formadoras de biopelículas, ya que la sustancia extracelular de la biopelícula se encuentra muy expuesta y a menudo presenta una estructura porosa [9], [10].

Algunos estudios recientes han demostrado que el eADN es clave para la formación, estabilidad estructural y patogenicidad de la biopelícula, al actuar como agente de reticulación de la matriz y como quelante de los agentes antimicrobianos catiónicos, lo que puede provocar la aparición de resistencias a los antibióticos [10]. Es por ello que se ha producido un incremento de los tratamientos con desoxirribonucleasa (DNasa), en forma de aerosoles, donde se ha observado que la administración conjunta de DNasa mejora la actividad de algunos antibióticos reduciendo la formación de biopelículas [11].

Estas son algunas de las causas por las cuales se están estudiando nuevos dispositivos capaces, no sólo de controlar la liberación de antibiótico, sino también de interactuar con la biopelícula con el objetivo de dañar de manera directa la matriz extracelular, y en particular su eADN, en el tratamiento de infecciones persistentes, como las asociadas a fibrosis quística.

3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Entre las nuevas estrategias para el tratamiento de infecciones bacterianas bajo estudio, tenemos a las nanopartículas poliméricas (NPs) biodegradables constituidas

por ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), con el fin de usarlas como vehículos de administración de fármacos. Esto se debe a que estas nanopartículas permiten la encapsulación de varios compuestos con distintas propiedades químicas y físicas y a que el perfil de degradación del PLGA puede ajustarse variando la relación entre ácido láctico y glicólico, lo que permite controlar la liberación del fármaco cargado [12]. Además, el PLGA ya ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para varios dispositivos biomédicos, lo que facilita la llegada a la práctica clínica de estas NPs de PLGA cargadas con un fármaco.

Por este motivo, se han llevado a cabo ensayos en los que se han estudiado NPs de PLGA cargadas con ciprofloxacino (CPX), un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas, y recubiertas con DNasa I, con el propósito de combinar una liberación controlada del fármaco con la capacidad de destruir la matriz de la biopelícula [13]. Al mismo tiempo, se sintetizaron otras NPs con distintas composiciones para comparar sus propiedades físicas, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1
COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LAS DISTINTAS NPs

	PLGA-CPX	PLGA-PL-CPX	PLGA-PL-DNasa I	PLGA-PL-CPX-DNasa I
Recubrimiento	-	Poli-lisina	Poli-lisina DNasa I	Poli-lisina DNasa I
Actividad DNasa I ($\mu\text{g ADN/mg NPs/h}$)	-	-	32.0	26.2
%op/p de CPX	0.26	0.24	-	0.17
Tamaño (nm)	213.6	272.5	265.0	251.9
Índice de polidispersión	0.085	0.101	0.099	0.122
Potencial Zeta (mV)	-12.9 ± 11.20	$+33.5 \pm 5.99$	$+30.8 \pm 0.70$	$+28.9 \pm 1.43$

En los ensayos de liberación in vitro del CPX encapsulado en las NPs, se comprobó cómo después de la primera hora, se liberaba entre el 40 y el 50% de la carga total de CPX de todas las NPs pero que posteriormente no se comportaban de la misma manera, ya que aquellas que no estaban recubiertas con poli-lisina (PL) liberaban su contenido total de fármaco al cabo de 12h mientras que las NPs que estaban recubiertas con PL y con PL-DNasa I, mostraron una liberación más controlada y constante del fármaco restante, habiendo liberado a las 12h respectivamente el 60 y el 80% del contenido de CPX (Figura 1) [13].

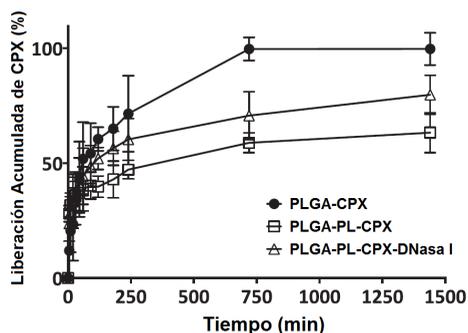


Fig. 1. Porcentaje de CPX liberado respecto al tiempo [13].

También se ha estudiado la actividad antibacteriana de estas NPs cargadas con CPX frente a *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizando como control CPX no encapsulado, que sugirieron una buena actividad antibacteriana de las NPs frente a *P. aeruginosa*. En base a los resultados, se estudió la capacidad de las NPs para inhibir la formación de biopelículas mediante el uso de "peg lids" y, como puede verse en la Figura 2a, para concentraciones tan bajas de CPX cargado como 0.0156 $\mu\text{g/ml}$, la formación de la biopelícula disminuyó en más del 80%, llegando a valores del 100% a concentraciones de CPX mayores de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ [13].

En otro ensayo se estudió la actividad anti-biopelícula de las diferentes NPs cargadas con CPX frente a biopelículas de *P. aeruginosa* formadas tras 48h, usando de nuevo "peg lids", donde todas las NPs mostraron una inhibición de más del 50% de la biopelícula en las concentraciones más altas de CPX (0.5 $\mu\text{g/ml}$) pero pudo observarse una disminución drástica de la biopelícula del 95% a concentraciones de CPX de 0.0078 $\mu\text{g/ml}$ al usar NPs de PLGA recubiertas con PL y DNasa I, mostrando así la mejor actividad anti-biopelícula, tal y como se observa en la Figura 2b.

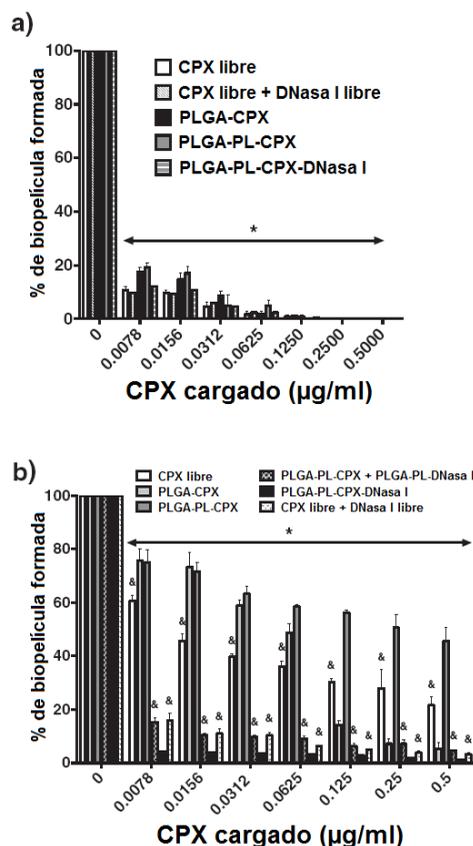


Fig. 2. (a) Representación del porcentaje de biopelícula formada en presencia de concentraciones variables de CPX encapsulado. (b) Representación del porcentaje de biopelícula no destruida en presencia de concentraciones variables de CPX encapsulado [13].

A estos estudios se le sumaron estudios de citotoxicidad, que indicaron ausencia de efecto citotóxico de todas las NPs utilizadas, y un estudio de la capacidad de elimi-

nación de biopelícula formada tras 48h con administraciones repetidas de NPs cargadas con CPX (1 dosis/día, durante tres días consecutivos). En este último, se observó que la actividad anti-biopelícula más alta la presentaban las NPs de PLGA-PL-CPX-DNasa I, las cuales eran capaces de eliminar más del 95% de la biopelícula en el segundo día de tratamiento a concentraciones de CPX de 0.0156 µg/ml, llegando incluso a eliminar el 99,8% de la biopelícula a concentraciones de CPX de 0.25 µg/ml [13].

4. CONCLUSIONES

Como se puede observar por los distintos resultados obtenidos tras los diversos estudios con NPs de PLGA cargadas con CPX y recubiertas con PL y DNasa I, parece ser que podríamos estar hablando de la próxima generación de fármacos empleados para el tratamiento de este tipo de infecciones, ya que estos son muy prometedores. Sin embargo, aún queda camino por recorrer para llegar a esa meta, ya que aún es necesario refinar los parámetros de fabricación de estas NPs para mejorar la eficiencia de la encapsulación de CPX, además de realizar las validaciones en modelos in vivo necesarias. Aún así estas NPs podrían representar un gran paso hacia adelante en el tratamiento de infecciones por bacterias formadoras de biopelículas.

REFERENCIAS

[1] J.B. Lyczak, C.L. Cannon and G.B. Pier, "Lung infections associated with cystic fibrosis," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 2, pp. 194-222, Apr 2002, doi:10.1128/CMR.15.2.194-222.2002.

[2] K. Ito and P.J. Barnes, "COPD as a disease of accelerated lung aging," *Chest*, vol. 135, no. 1, pp. 173-180, Jan 2009, doi:10.1378/chest.08-1419.

[3] M.R. Parsek and P.K. Singh, "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 677-701, Oct 2003, doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090720.

[4] J.W. Costerton, P.S. Stewart and E.P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, May 1999, doi:10.1126/science.284.5418.1318.

[5] P.S. Stewart and M.J. Franklín, "Physiological heterogeneity in biofilms," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, pp. 199-210, Mar 2008, doi:10.1038/nrmicro1838.

[6] B. Spellberg, R. Guidos, D. Gilbert, J. Bradley, H.W. Boucher, W.M. Scheld, J.G. Bartlett, J. Edwards Jr. and Infectious Diseases Society of America, "The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 2, pp. 155-164, Jan 2008, doi:10.1086/524891.

[7] R. Kalluru, F. Fenaroli, D. Westmoreland, L. Ulanova, A. Maleki, N. Roos, M. Paulsen, Madsen, G. Koster, W. Egge-Jacobsen, S. Wilson, H. Roberg-Larsen, G.K. Khuller, A. Singh, B. Nyström and G. Griffiths, "Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phagolysosomes," *Journal of Cell Science*, vol. 126, no. 14, pp. 3043-3054, May 2013, doi:10.1242/jcs.121814.

[8] R. Cantón, A. Fernández, E. Gómez, R. Del Campo and M.A.

Meseguer, "Infección bronquial crónica: el problema de *Pseudomonas aeruginosa*," *Arch. Bronconeumol.*, vol. 47, no. 6, pp. 8-13, Jun 2011, doi:10.1016/S0300-2896(11)70029-1.

[9] E.S. Gloag, L. Turnbull, A. Huang, P. Valotton, H. Wang, L.M. Nolan, L. Mililli, C. Hunt, J. Lu, S.R. Osvath, L.G. Monahan, R. Cavaliere, I.G. Charles, M.P. Wand, M.L. Gee, R. Prabhakar and C.B. Whitchurch, "Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 110, no. 28, pp. 11541-11546, Jul 2013, doi:10.1073/pnas.1218898110.

[10] M. Okshevsky and R.L. Meyer, "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms," *Critical Reviews in Microbiology*, vol.41, no. 3, pp. 341-352, 2015, doi:10.3109/1040841X.2013.841639.

[11] M. Alipour, Z.E. Suntres, A.Omri, "Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 64, no. 2, pp. 317-325, Jul 2009, doi: 10.1093/jac/dkp165.

[12] F. Mohamed and C.F. van der Walle, "Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 1, pp. 71-87, Jan 2008, doi:10.1002/jps.21082.

[13] A. Baelo, R. Levato, E. Julián, A. Crespo, J. Astola, J. Gavaldà, E. Engel, M.A. Mateos-Timoneda and E. Torrents, "Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections," *Journal of Controlled Release*, vol.209, pp. 150-158, Jul 2015, doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.028



Pedro Jesús García Murillo recibió el Grado en Farmacia por la Universidad de Sevilla en 2015 y un curso certificado por el MIT sobre "Ensayos para el estudio de los mecanismos de replicación y reparación del ADN". Actualmente está realizando el primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.