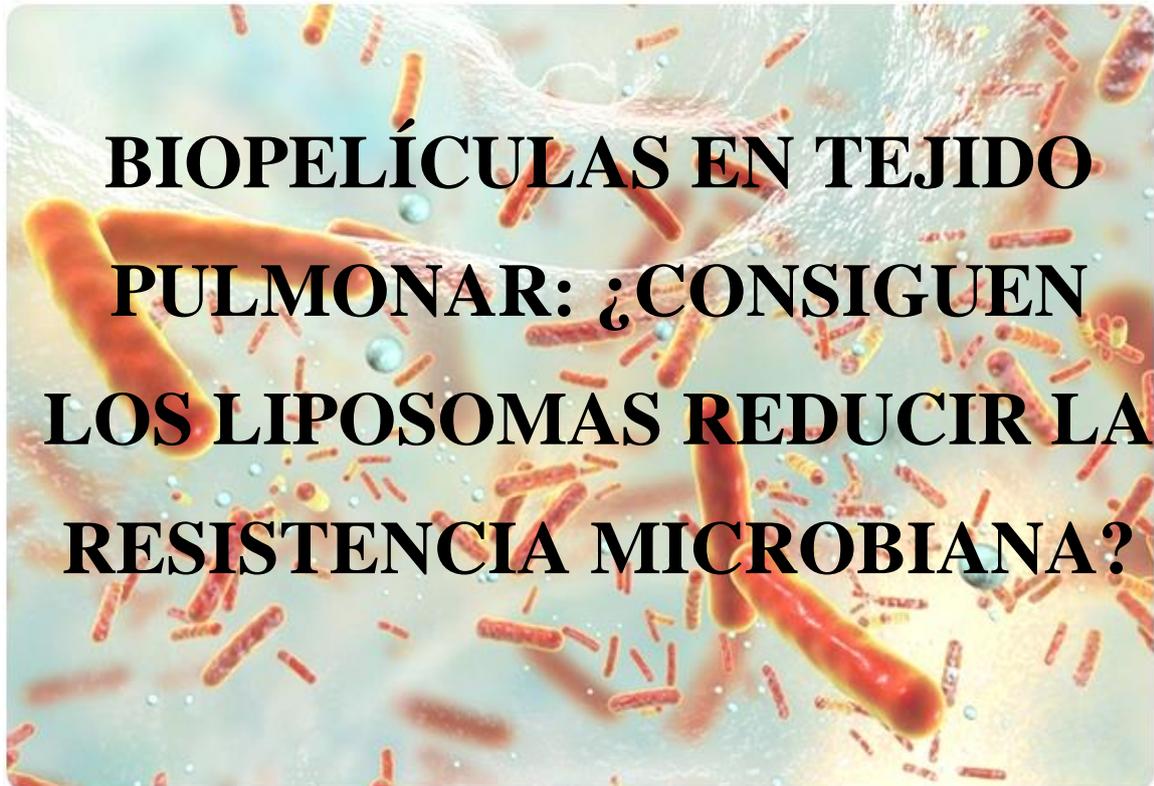




FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Laura Martos Carrasco



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA**

**Máster de Especialización Profesional en Farmacia. Especialidad en Industria
Farmacéutica**

**Biopelículas en tejido pulmonar: ¿Consiguen los
liposomas reducir la resistencia microbiana?**

Trabajo Fin de Máster

Autora: Laura Martos Carrasco

Tutora: María Luisa González Rodríguez

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Sevilla, julio 2020



MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Profesora del Departamento de FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA de la Universidad de Sevilla,

INFORMA, que el presente trabajo titulado BIOPELÍCULAS EN TEJIDO PULMONAR: ¿CONSIGUEN LOS LIPOSOMAS REDUCIR LA RESISTENCIA MICROBIANA? ha sido realizado bajo mi tutorización y asesoramiento, dentro del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica durante el curso académico 2019/20, constituyendo la memoria que presenta la Lda. LAURA MARTOS CARRASCO como Trabajo Fin de Máster del Máster en Especialización Profesional en Farmacia, especialidad Industria Farmacéutica y que cumple los requisitos necesarios para ser presentado como Trabajo Fin de Máster.

Y para que conste, a los efectos oportunos, se expide el presente informe en Sevilla, a 4 de julio de 2020

Fdo.: MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

Vº Bº

Fdo.: MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Directora del Departamento

RESUMEN

Con motivo del auge de los avances actuales para tratar la resistencia a antibióticos, en este estudio se destacará aquella generada por la población de bacterias que se agrupan en forma de biopelículas. Esta formación es una de las principales causas de resistencia a antibióticos, debido a que se ve impedida la acción antimicrobiana de los fármacos. En esta revisión, se ha hecho hincapié en el estudio de formulaciones liposomales dirigidas a afecciones pulmonares (siendo la fibrosis quística la de mayor interés) como posible estrategia clave para resolver este problema. Para ello se han indagado distintas fuentes para recopilar datos y deducciones relevantes, buscando en distintas bases de datos con las siguientes palabras claves: *biofilm*, *liposome*, *cystic fibrosis*, *nanomedicine*, *nanoparticles*, en tesis, trabajos fin de grado, etc, con el fin de encontrar un tratamiento efectivo o una terapia exitosa para el acceso y posterior actuación de antimicrobianos en biopelículas bacterianas, para favorecer así la erradicación de esta. Tras la recogida de datos, se han estudiado y analizado diferentes resultados obtenidos de formulaciones de liposomas desde convencionales, fluidosomas a liposomas modificados o liposomas de superficie modificada. Así mismo, se han destacado algunas formulaciones ya comercializadas y sus datos esperanzadores. Se ha demostrado cómo la encapsulación del fármaco en vesículas liposomales favorece enormemente el objetivo planteado frente a la administración de fármacos libres ya que se ha manifestado una mayor penetración, eficacia, permanencia en tejido pulmonar y menor incidencia de efectos adversos. A pesar de que hoy día la resistencia antimicrobiana no tiene cura, podría ser que estas formulaciones fueran la clave para tratar este problema; seguir en esta línea puede ser una gran ventaja para combatir esa gran preocupación que prevalece actualmente en crecimiento.

PALABRAS CLAVE: *biopelícula*, *liposoma*, *fibrosis quística* y *nanomedicina*, *nanopartículas*.

ABSTRACT

As current advances in treating antibiotic resistance are rising, this study will highlight the resistance generated by those bacteria population grouped in the form of biofilms. One of the main causes of antibiotic resistance is that antimicrobial action of drugs is prevented. In particular the one in which this bibliographic review has been based. In this review, it has been accentuated the study of liposome formulations addressed to lung diseases (arousing cystic fibrosis of greater interest) as potential key strategy to solve this problem. To that end, many sources have been investigated to collect relevant data and conclusions by searching in different data bases the following key words: *biofilm, liposome, cystic fibrosis, nanomedicine, nanoparticles*; as well as it has been investigated in thesis and end of degree projects, with the aim of finding an effective treatment or a successful therapy to the approach and subsequent action of antimicrobial in bacterial biofilms, thus promoting their eradication. After collecting the data, the results obtained from liposome formulations, through conventional, fluidosomes to modified liposomes or modified surface liposome, have been studied and analyzed. Furthermore, it has been stressed some formulations already commercialized and their encouraging data. It has been proved how drug encapsulation in liposomal blisters contribute greatly to the stated objective against free drug administration, since it has been noticed a greater penetration, effectiveness, permanence in lung tissue and a lower incidence in ill effects. Despite the fact that nowadays antimicrobial resistance has no cure, these formulations may be crucial to treat this problem; following this line of studies could be a big advantage to address that concern which continues to increase.

KEY WORD: *biofilm, liposome, cystic fibrosis, nanomedicine and nanoparticles*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática de las enfermedades infecciosas	1
1.2. Infecciones a nivel respiratorio	2
1.3. Biopelículas: características y formación	4
1.4. Deposición de biopelículas en el tejido pulmonar.....	8
1.5. Erradicación de la biopelícula.....	10
1.6. Sistemas nanoparticulares y biopelículas a nivel pulmonar.....	12
2. OBJETIVO	15
3. METODOLOGÍA	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Efecto de la formulación y propiedades fisicoquímicas de los liposomas sobre la biopelícula	18
4.2. Influencia del tipo de liposomas en la erradicación de las biopelículas	21
4.2.1 Liposomas convencionales.....	21
4.2.2. Liposomas fusogénicos	27
4.2.3. Liposomas modificados	29
4.2.4. Liposomas de superficie modificada	32
4.2.5. Formulaciones comercializadas de liposomas.....	43
5. CONCLUSIONES	47
6. BIBLIOGRAFÍA	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática de las enfermedades infecciosas

Durante el siglo pasado, enfermedades infecciosas como la difteria, tuberculosis, cólera o coqueluche, entre otras, eran causadas por bacterias que se encontraban dotadas de mecanismos patogénicos específicos. Con estas características, los antibióticos y vacunas desarrollados para estos gérmenes lograban una notable eficacia en su control. En la actualidad, estas bacterias han sido desplazadas por microorganismos ubicuos, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden, en muchos casos, pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. De hecho, diversas publicaciones señalan que, al menos el 65% de todos los procesos infecciosos bacterianos humanos podrían involucrar la presencia de biopelículas (Nazar, 2007).

En los últimos años, debido a su prevalencia abrumadora, las biopelículas han sido reconocidas progresivamente como factores muy importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal, neumonía por *Pseudomonas* en fibrosis quística (FQ), cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis y prostatitis crónica (Melo and Fernández, 2015). Asimismo, se ha demostrado que las biopelículas bacterianas pueden estar presentes en una gran variedad de dispositivos médicos implantables, pudiendo provocar infecciones asociadas, como la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales (Feldman et al., 1999); además, se han descrito en catéteres urinarios, sigmoidoscopios y lentes de contacto, como describe Nazar en su artículo. La formación de biopelículas constituye también un problema serio en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos y prótesis ortopédicas ya que, una vez infectadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver con antibioterapia.

Desde los años 70 se ha venido documentando la acumulación bacteriana en tubos endotraqueales en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). La presencia de biopelículas formadas por bacterias Gram negativas en estos tubos se ha relacionado con neumonía intrahospitalaria, presumiblemente por diseminación mecánica durante la aspiración (Nazar, 2007).

1.2. Infecciones a nivel respiratorio

El establecimiento de la colonización por determinados microorganismos en las vías respiratorias constituye un factor de riesgo para desarrollar infecciones en esta región del organismo. Como etapa previa a dicha colonización, se establece la modificación de la microbiota de la orofaringe, ya sea de tipo cualitativo, con la presencia de especies más invasivas o resistentes, o bien de tipo cuantitativo, con el incremento de la carga bacteriana colonizadora, o bien una combinación de ambos (Gomes-Fernandes et al., 2017).

El proceso de colonización puede ocurrir hasta en un 60% de los pacientes afectados, y tiene lugar generalmente durante la hospitalización prolongada y en situaciones de tratamiento antibiótico, también a nivel ambulatorio. La neumonía adquirida en el hospital (NAH) y la neumonía asociada a la ventilación (NAV), juntas representan el 22% de todas las infecciones de origen nosocomial, siendo la NAV la primera causa de infección en el paciente ventilado. Estudios recientes demuestran que aproximadamente el 10% de los pacientes sometidos a ventilación mecánica (VM) son diagnosticados con NAV (Wang et al., 2014). Tanto la NAH como la NAV se producen generalmente por microaspiración de las secreciones orofaríngeas o gástricas contaminadas con microbiota colonizante (generalmente modificada por sobrecrecimiento o tratamiento antibiótico previo prolongado), por aspiración de un gran inóculo de microorganismos y por alteración o abolición de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio de tipo mecánico (epitelio ciliado y moco), humoral (anticuerpos) y celular (polimorfo nucleares, macrófagos y linfocitos, y sus respectivas citocinas).

El paciente ventilado mecánicamente es más propenso a la colonización pulmonar por organismos pertenecientes a la microbiota orofaríngea. La presencia del tubo endotraqueal (TE) obstaculiza el reflejo normal de la tos, así como el aclaramiento mucociliar normal de las secreciones orofaríngeas y, por lo tanto, facilita una vía de entrada de los microorganismos a los pulmones. Conjuntamente, el TE actúa como reservorio bacteriano debido a la acumulación de una biopelícula que lo recubre, y que más tarde se desprende y se disemina hacia al pulmón durante la VM o la manipulación del propio tubo. No obstante, parece ser que la propia VM induce una inmunosupresión local, que tiene como resultado una reducción en el proceso de fagocitosis bacteriana

(Bielen et al., 2018). Esta alteración inmunitaria aumentaría el riesgo de desarrollo de infecciones en el paciente ventilado.

Debido al aumento en la frecuencia de microorganismos resistentes a múltiples fármacos como causa de infecciones respiratorias, así como el riesgo elevado de gravedad que conlleva en el paciente la falta de efectividad del tratamiento, en la mayoría de los casos se implementa una terapia empírica con antimicrobianos de amplio espectro, y por decisión de consenso, se realizan cultivos de las secreciones respiratorias de prácticamente todos los pacientes con sospecha de NAV (Kalil et al., 2016).

La resistencia ocasionada tras el uso de los tratamientos antibióticos en las infecciones de tracto respiratorio inferior (ITRI) promueve la sustitución de la microbiota original por patógenos oportunistas. Además, cabe destacar que la admisión en UCI de pacientes portadores de cepas multiresistentes representa un factor de riesgo que aumenta significativamente la frecuencia de infecciones nosocomiales causadas por microorganismos resistentes a múltiples fármacos. Así, como complicaciones de la infección pulmonar causada por *Staphylococcus aureus* se observa, entre otros, el desarrollo de empiemas pleurales, abscesos pulmonares y bacteriemia. Por otro lado, las ITRI causadas por *Pseudomonas aeruginosa* pueden variar en gravedad desde una colonización asintomática o una traqueobronquitis benigna hasta una bronconeumonía necrotizante grave. Los pacientes con enfermedad crónica pulmonar, como los afectados de EPOC, FQ, bronquiectasias, y en menor frecuencia, pacientes neutropénicos, suelen ser colonizados y/o infectados frecuentemente por este microorganismo.

La neumonía causada por *P. aeruginosa* se encuentra entre las neumonías más frecuentes y generalmente también más graves dentro del conjunto de neumonías nosocomiales (Gomes-Fernandes, 2017). Hay que destacar en este punto que los enfermos críticos tienen afectada su producción de inmunoglobulina A y fibronectina debido a un aumento de los niveles de proteasa. Esto, a su vez, impide la adherencia de las bacterias Gram positivas a la mucosa orofaríngea y favorece la adherencia de las bacterias Gram negativas. De este modo, *P. aeruginosa*, que coloniza poco frecuentemente la piel y las mucosas nasal y faríngea de las personas sanas, en los pacientes hospitalizados adquiere una tasa de colonización superior al 50%, especialmente tras la administración de tratamiento antimicrobiano prolongado que, asimismo, favorece la selección de cepas resistentes a múltiples fármacos.

1.3. Biopelículas: características y formación

Las bacterias existen en la Naturaleza bajo dos formas o estados: a) bacterias planctónicas, de libre flotación, y b) bacterias formando biopelículas constituidas por colonias de microorganismos sésiles. Se postula que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelículas, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Nazar, 2007). Esta disposición representa una antigua estrategia de supervivencia procariótica debido a las ventajas significativas que proporcionan las biopelículas a las bacterias, tanto frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, como en lo referente a la capacidad de concentrar nutrientes y facilitar la eliminación de desechos.

Las biopelículas, también denominadas *biofilms*, se definen como colonias microbianas inmovilizadas y encerradas dentro de una matriz que las propias bacterias autogeneran. Dicha matriz está constituida por sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (polisacáridos, proteínas, etc.). La estructura compleja y heterogénea de la matriz extracelular se encuentra intercomunicada a través de una red de canales de agua y nutrientes, que son necesarios para el intercambio de nutrientes, agua y productos metabólicos entre las células (Rukavina y Vani, 2016). Tanto la estructura como la composición exacta de las biopelículas se encuentran influenciadas por numerosos factores, entre los cuales cabe destacar las propiedades de la superficie, la disponibilidad de nutrientes, así como los componentes microbianos de la misma.

La biología de los *biofilms* se centra en su ciclo vital e interacciones con el medio ambiente. En dicho ciclo vital, que se trata de un proceso gradual y dinámico, se distinguen tres fases: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento (Figura 1).

El proceso de formación de la biopelícula comienza con el acondicionamiento de la superficie mediante su recubrimiento con macromoléculas del entorno, lo que permite la adhesión inicial reversible de los microorganismos.

La siguiente etapa consiste en la formación de uniones más fuertes e irreversibles a la superficie, seguida de la proliferación y agregación de microorganismos en grupos multicelulares y multicapas, los cuales producen activamente matriz extracelular. A medida que las bacterias se van dividiendo y van colonizando la superficie, comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz del *biofilm*, y éste comienza a

desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras similares a setas (Ramadan et al., 2005).

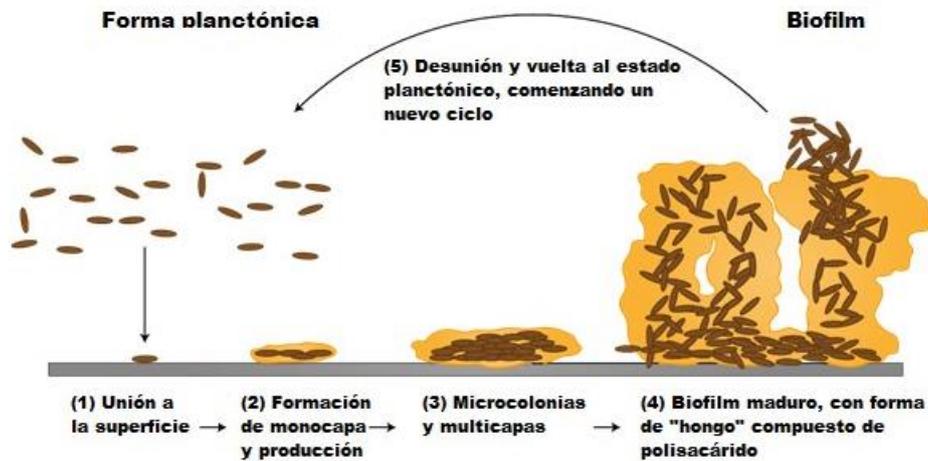


Figura 1. Representación esquemática de la formación de *biofilms*. El proceso comienza con la adhesión reversible de las células planctónicas (óvalos marrones) a una superficie (gris) (1). La bacteria comienza a formar una monocapa con uniones irreversibles tras la producción de una matriz extracelular (mostrado en amarillo) (2). Posteriormente, aparece una microcolonia que da lugar a una multicapa (3). Durante las últimas etapas, el *biofilm* madura y forma estructuras tipo champiñón debido a la presencia de polisacáridos (4). La última etapa consiste en la dispersión de algunas células, de la estructura del *biofilm* (5). Adaptado de Vasudevan (2014).

Una vez las biopelículas se encuentran en la etapa madura, algunas células bacterianas se desprenden de ellas, separándose continuamente de los agregados. Este fenómeno representa una fuente continua de bacterias planctónicas que posteriormente pueden propagarse y formar nuevas microcolonias.

A comienzos de los '90, se produjo un avance importante en la comprensión de los *biofilms*, con el descubrimiento de las proteínas responsables del mecanismo de formación. La unión de los microorganismos a una superficie y la ulterior formación de un *biofilm* requieren que las bacterias se cercioren que han efectuado contacto. Para lograrlo, es necesaria la existencia de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas. El proceso de interacción célula-célula se facilita debido a la proximidad existente entre las bacterias en el *biofilm* y a la existencia de señales químicas moleculares, denominadas autoinductores o *quorum-sensing* (QS), mediante las cuales existe un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular en la biopelícula. Por tanto, tanto el crecimiento como la maduración

de células bacterianas en una biopelícula diferenciada, así como el mantenimiento de comunidades altamente organizadas, se encuentran regulados por la comunicación intercelular mediante estos QS.

Algunos factores que modifican la regulación de los QS son, entre otros, la densidad celular, la expresión génica, la producción del factor de virulencia, así como otras funciones celulares existentes en la biopelícula (Scoot y Manning, 2003). Las principales moléculas QS son las acil-homoserina-lactonas, que predominan en bacterias Gram negativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en especies Gram positivas. Las bacterias también poseen un receptor que puede detectar específicamente el autoinductor correspondiente, de manera que cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos necesarios para la síntesis del inductor (Thomas y Nakaishi, 2006).

Las biopelículas constituyen una causa común de infecciones crónicas, nosocomiales y relacionadas con dispositivos médicos, debido al hecho de que pueden desarrollarse en tejidos vivos o necróticos, así como en superficies inertes de diferentes materiales implantados. Además, estas disposiciones peculiares de las bacterias están relacionadas con un alto nivel de resistencia a los antimicrobianos, fracasos frecuentes del tratamiento, así como una mayor morbilidad y mortalidad. Como consecuencia, las infecciones por biopelículas y las enfermedades que las acompañan se han convertido en un problema de salud importante y un desafío serio tanto para la medicina moderna como para la farmacia. En la figura 2 se recoge un listado de algunas de las patologías infecciosas en humanos en las que se encuentran involucradas especies bacterianas formadoras de biopelículas.

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos Gram positivos acidogénicos (e). <i>Streptococcus</i>
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos Gram positivos (e). staphylococos)
Fascitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas
Prostatitis bacteriana	<i>E. coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	Streptococos del grupo viridans
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones nosocomiales	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Bucles esclerales	Cocos Gram positivos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos Gram positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos Gram negativos
Peritonitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	<i>Actinomyces israelii</i> y muchos otros
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres hickman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

Figura 2. Listado de algunas infecciones humanas en las que están involucrados biofilms bacterianos. Tomada de Lasa et al., (2005).

Las infecciones por biopelículas comparten algunas características comunes: manifestación clínica retrasada, persistencia durante meses o años, generalmente con episodios agudos o periodos de exacerbación y ausencia de síntomas clínicos (Rukavina y Vani, 2016). Aunque este tipo de infecciones es menos agresivo que las infecciones agudas, su tratamiento se convierte en un desafío en mayor medida. La razón principal de ello es que se produce una disminución de hasta 1000 veces la susceptibilidad de las biopelículas a los agentes antimicrobianos y desinfectantes, así como la resistencia a la respuesta inmune del huésped. Las bases de la resistencia bacteriana en *biofilm* se están aún investigando. No obstante, como se ha reflejado en diversos estudios, parece que el aumento de la resistencia de la biopelícula es el resultado de varios mecanismos posibles (Lasa et al., 2005):

1. Existencia de la barrera de difusión física y química que constituye la matriz de exopolisacáridos, a la penetración de los antimicrobianos.
2. Crecimiento ralentizado de las bacterias del *biofilm* debido a la limitación de nutrientes.
3. Existencia de microambientes que antagonizan con la acción del antibiótico.

A continuación, se comentarán algunos de estos mecanismos.

El aumento de la tolerancia podría explicarse en parte por el hecho de que los microorganismos que forman la biopelícula están incrustados en el glicocalix polimérico extracelular, en su mayoría de naturaleza aniónica. Ello representa cierto impedimento a la penetración, probablemente debido a la difusión lenta y retardada o bien a interacciones químicas y electrostáticas con las moléculas antimicrobianas (Mah y O'Toole, 2001; Sun et al., 2013). Además, las interacciones químicas implican la degradación enzimática de los antibióticos, especialmente porque la matriz extracelular proporciona un entorno apropiado que favorece la acumulación de altas cantidades de enzimas inactivadoras de antibióticos dentro de la biopelícula.

Otra teoría propuesta para explicar la resistencia elevada de la biopelícula es que la estructura de mosaico específica de ésta genera gradientes de oxígeno, nutrientes, pH, fuerza iónica y potencial redox en toda la biopelícula, que conducen a la correspondiente heterogeneidad en la tasa de crecimiento y la actividad metabólica en las diferentes capas de la biopelícula (Stewart y Franklin, 2008).

Debido a los cambios producidos en la velocidad de proliferación y la transcripción de genes, los microorganismos en las biopelículas también manifiestan un fenotipo alterado en comparación con las células planctónicas. La mutación y la frecuencia de transferencia horizontal de genes en las biopelículas es significativamente mayor en comparación con sus contrapartes planctónicas, lo que podría explicar por qué los microorganismos que crecen en biopelículas se vuelven fácilmente resistentes a múltiples fármacos (Donlan y Costerton, 2001).

1.4. Deposición de biopelículas en el tejido pulmonar

Se ha estudiado la formación de biopelículas de *Pseudomonas* desarrolladas en pulmón de animales con FQ. Como se muestra en la Figura 3, esta población encerrada en la matriz persiste a pesar de las reacciones inmunes del huésped. Costerton et al. (2003) propusieron que los pulmones podrían ser colonizados como consecuencia del desprendimiento de fragmentos de biopelículas provenientes de la orofaringe y concluyeron que dichos fragmentos no pueden eliminarse mediante mecanismos de defensa pulmonar.

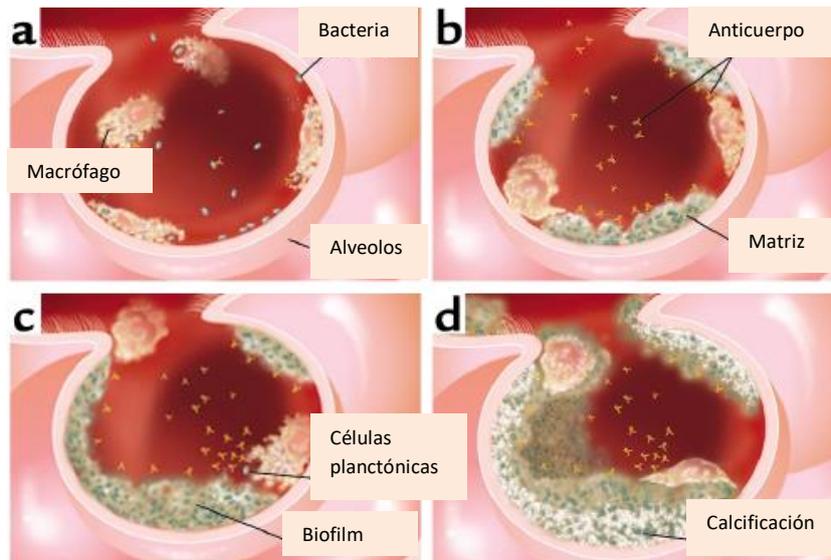


Figura 3. Representación esquemática de las estrategias de defensa del pulmón. **(a)** Superficie del epitelio alveolar defendida por la presencia de polimorfos nucleares y macrófagos, que fagocitan las bacterias planctónicas entrantes de forma rápida y fácil. **(b)** Los fagocitos alveolares no pueden atrapar las bacterias en fragmentos de biopelículas encerrados en la matriz, incluso cuando estos reaccionan con anticuerpos específicos. **(c)** Crecimiento de biopelículas y colonización del pulmón, liberando ocasionalmente células planctónicas que reaccionan con anticuerpos y son fagocitadas. **(d)** La biopelícula madura, y parte de la comunidad microbiana comienzan a calcificar. Adaptada de Costerton et al. (2003).

Estos datos experimentales obtenidos con animales parecen haber sido confirmados en ensayos clínicos con pacientes con FQ, indicando cómo los tubos endotraqueales que se han utilizado para la ventilación asistida han mostrado agregaciones masivas de biopelículas de especies mixtas. El desprendimiento simple de fragmentos podría conducir a la colonización crónica de los pulmones, como se aprecia en la figura 4.



Figura 4. Autopsia de un pulmón de un paciente con FQ que murió debido a una infección crónica por *P.aeruginosa*. Se aprecian las biopelículas presentes en todo el pulmón como gruesos parches amarillentos con aspecto de moco. Tomado de Hoiby et al., 2010.

Por otra parte, estudios en pacientes intubados en unidades de cuidados intensivos demostraron que las biopelículas existentes en los tubos endotraqueales, a menudo contenían bacterias del tracto digestivo cuando también se empleaban tubos nasogástricos en los pacientes, y que estos microorganismos a menudo se encontraban en los pulmones de pacientes que habían muerto tras la ventilación asistida (Costerton et al., 2003).

Por tanto, está bien documentado que los fragmentos de biopelículas se aspiran al pulmón, y que estos microorganismos encerrados en la matriz no se pueden eliminar mediante mecanismos de defensa pulmonar, convirtiéndose en microcolonias que persisten durante meses y pueden dar lugar a una infección diseminada.

1.5. Erradicación de la biopelícula

La erradicación de las biopelículas infecciosas es un proceso muy complicado para el que no hay un tratamiento adecuado disponible, desde que Van Leeuwenhoek notó que el vinagre que usó para limpiar sus dientes de la biopelícula oral mató solo las bacterias que residían en el exterior de esta, pero dejó las residentes en el fondo de una biopelícula viva. De hecho, una de las metas que se persigue actualmente es conseguir la penetración y acumulación de antimicrobianos, así como la muerte del microorganismo en todo el grosor de una biopelícula infecciosa, como advirtió Van Leeuwenhoek hace más de tres siglos (1684). Hay que tener en cuenta, además, que en este proceso de acceso a la biopelícula, los antimicrobianos pueden desactivarse enzimáticamente bien en la circulación sanguínea o bien una vez dentro de la biopelícula (Albayaty et al., 2018).

Todos estos factores, que se resumen en la figura 5, contribuyen a que la destrucción total de la población bacteriana en la profundidad de una biopelícula sea prácticamente imposible (Sutherland, 2001), lo que favorece la recurrencia de la infección después del tratamiento (Wolfmeier et al., 2018).

La penetración y la acumulación solo pueden ocurrir una vez que el antimicrobiano ha accedido a la zona del organismo donde se ubica la biopelícula. Dado que muy a menudo esto tiene lugar desde la circulación sistémica, y teniendo en cuenta los procesos de distribución y eliminación de muchos antimicrobianos administrados por vía sistémica, que requiere la administración de elevadas dosis, con los consecuentes efectos adversos

que pueden generarse en diferentes órganos, se está recurriendo a estrategias de vectorización con el fin de acumularse en cantidades suficientemente altas en las regiones del organismo donde se encuentre la biopelícula infecciosa (Forier et al., 2014).

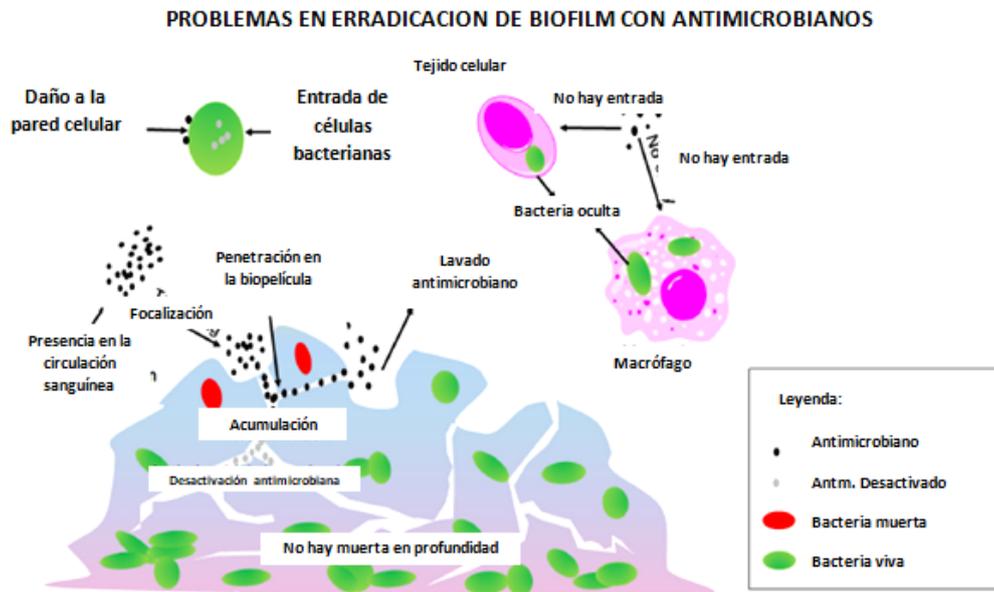


Figura 5. Resumen de los problemas involucrados en el tratamiento antimicrobiano de biopelículas infecciosas. Adaptada de Wang et al. (2020).

Una vez acumulado dentro de la biopelícula, el antimicrobiano ejerce su acción antimicrobiana, que puede basarse en la generación de daño en la pared celular, o bien en la entrada en la bacteria para interferir con los procesos metabólicos vitales. Ambos mecanismos presentan mucha complejidad, especialmente porque las bacterias han desarrollado una gran variedad de mecanismos de defensa, que se resume bajo el denominador común de resistencia a los antimicrobianos (Kumar et al., 2016). A esto se agrega el problema de las bacterias que buscan protección frente a los antimicrobianos, en las células de mamíferos (Mantovani et al., 2011), a las que muchos antimicrobianos no tienen acceso. Incluso se han encontrado bacterias en el interior de macrófagos que, como se sabe, están destinados por naturaleza a ejercer mecanismos de desactivación y muerte (Knodler et al., 2001).

Por tanto, de forma global, no existen antimicrobianos que resuelvan todos los problemas referidos anteriormente. Es aquí donde se abre un nuevo campo mediante la utilización de la nanotecnología, con el fin de facilitar el acceso de los antimicrobianos a la zona de

la biopelícula, favorecer la penetración de estos a través de su estructura matricial e interactuar con las bacterias que conforman el *biofilm* (Wang et al., 2020).

1.6. Sistemas nanoparticulares y biopelículas a nivel pulmonar

La resistencia de los patógenos bacterianos a los antibióticos se ha convertido en un grave problema de salud pública desde la introducción en clínica de los primeros antibióticos, como las sulfamidas y la penicilina. Este problema da lugar a que las infecciones se sitúen como la segunda causa principal de mortalidad a nivel mundial y la tercera causa en los países desarrollados (Alhariri et al., 2017).

Los patógenos resistentes a múltiples fármacos se presentan como un serio desafío en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Para evitar y prevenir la aparición y propagación de bacterias resistentes, es importante modificar los antibióticos convencionales y desarrollar nuevos agentes antibacterianos. En el caso de las biopelículas, la mayoría de los métodos de control propuestos se centran en (Rukavina y Vani, 2016):

- Prevención y minimización de la formación de biopelículas mediante la selección y modificaciones de la superficie de materiales antiadhesivos (Piozzi et al., 2004).
- Técnicas de desbridamiento que incluyen ultrasonido y procedimientos quirúrgicos (Breuing et al., 2005).
- Interrupción del sistema de señalización QS de la biopelícula (Rasmussen y Givskov, 2006).
- Lograr la penetración adecuada del fármaco a través de las biopelículas formadas mediante el uso de un campo electromagnético (Matl et al., 2011), ondas de ultrasonido, activación fotodinámica o sistemas específicos de administración de fármacos.

Centrándonos en esta última estrategia, y entre las diferentes tecnologías de administración de fármacos que se han explorado y desarrollado para el tratamiento de las infecciones relacionadas con las biopelículas, la nanotecnología desempeña un papel importante. De hecho, durante las últimas décadas, se han diseñado y empleado una gran variedad de sistemas de administración de fármacos a escala nanométrica, que incluyen nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas metálicas, nanopartículas sólidas lipídicas y liposomas (figura 6). Estos nanosistemas se consideran una estrategia

prometedora para superar la resistencia de las biopelículas, ya que han demostrado mejorar el acceso de los antimicrobianos a las células bacterianas, aumentando así la eficacia de los tratamientos (Alhariri et al., 2017).

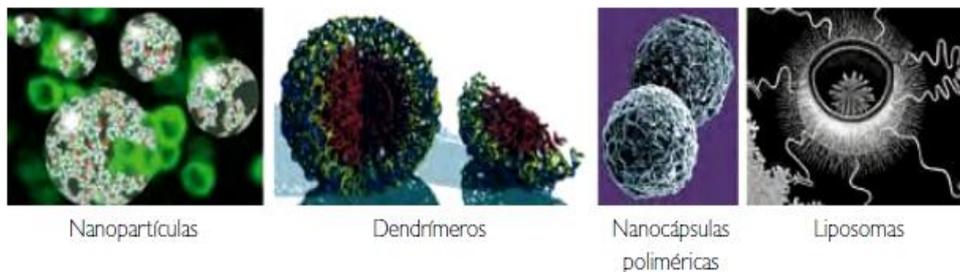


Figura 6. Diferentes tipos de nanosistemas que pueden emplearse en la dosificación de fármacos (Lechuga, 2001).

El diseño de los sistemas nanotransportadores es muy variado en función del objetivo perseguido, pudiendo, por ejemplo, formularse para ser activados por estímulos para dirigirse específicamente a una zona concreta con el fin de actuar como sensores biológicos; también se puede mejorar la solubilidad y estabilidad de agentes antimicrobianos, así como lograr una liberación controlada del fármaco. Hay diversos estudios que demuestran la mejora en la eficacia de agentes antimicrobianos combinados con estos transportadores frente a la administración unitaria del fármaco (Saucedo-Pereyra, 2017).

Por tanto, de forma resumida, se exponen algunas de las ventajas que ofrecen los sistemas nanoparticulares que incorporan antimicrobianos, frente al tratamiento convencional con ellos:

1. Liberación controlada y sostenida del fármaco en la zona diana de la infección, aumentando la eficacia terapéutica del fármaco, minimizando los efectos secundarios sistémicos y disminuyendo la frecuencia de administración.
2. El fármaco puede ser incorporado en el sistema y protegerlo frente a condiciones externas que le afecten.
3. El perfil de liberación y degradación puede ser modificado a partir del tamaño de las nanopartículas, pudiendo alcanzar cinéticas de orden cero y primer orden, sobre todo.

4. Aumento de la biodisponibilidad del fármaco en el lugar de acción.

Por otra parte, según su mecanismo de acción, los antibióticos nanoencapsulados, pueden ser vehiculizados al lugar de acción siguiendo mecanismos pasivo o activo. El direccionamiento activo se logra mediante la conjugación de este o un sistema de soporte a un tejido o a un ligando de células específicas. En cambio, el transporte pasivo se logra mediante la incorporación del agente terapéutico a una macromolécula o nanopartícula que, siguiendo un mecanismo pasivo a favor de gradiente, alcanza el órgano diana.

Este trabajo de revisión va a estar centrado principalmente en el análisis de los liposomas y sus formulaciones como sistemas nanotransportadores de moléculas antimicrobianas que van a facilitar el acceso de estas a la célula bacteriana.

Como es bien sabido, los liposomas son membranas artificiales esféricas constituidas por una o varias bicapas concéntricas que engloban un compartimento hidrófilo interno (Costerton et al., 2003). Los primeros estudios realizados con estos sistemas se desarrollaron para simular el comportamiento de las membranas biológicas. Sin embargo, con el tiempo, los liposomas se han seguido utilizando ampliamente y han extendido sus aplicaciones a la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, tanto en su escala micro como nanométrica (Costerton et al., 2003; Ingebrigtsen et al., 2016; Rushmi et al., 2017). La encapsulación de activos en los liposomas puede aumentar la efectividad de éstos al ofrecer protección física contra factores ambientales o externos a la formulación, y mejorar parámetros como la solubilidad y la interacción con la célula diana (Rushmi et al., 2017).

Además de estas ventajas que ofrecen los liposomas, existen otras características de estas vesículas que las convierten en sistemas adecuados para actuar sobre las biopelículas bacterianas, llevando en su interior un agente antimicrobiano concreto. Estas características se pueden resumir en las siguientes (Malcolm, 2005):

- ✓ Son biocompatibles, y su composición lipídica puede variar ampliamente.
- ✓ La superficie de los liposomas puede modificarse químicamente mediante la introducción de ligandos (lectinas, anticuerpos, etc.) que los vectorizan hacia una zona concreta. La funcionalización superficial con poli (etilenglicol) evita la captación por el sistema retículo endotelial y también por las biopelículas bacterianas (Ahmed et al., 2001).

- ✓ Capacidad para transportar fármacos tanto de naturaleza hidrosoluble como liposoluble a las biopelículas bacterianas, siendo igualmente efectivos para inhibir el crecimiento de dichas biopelículas (Robinson et al., 2000).
- ✓ La efectividad de los fármacos administrados en liposomas es mayor empleando concentraciones más bajas de fármaco que las equivalentes al fármaco libre. Este uso de liposomas es particularmente ventajoso cuando se requiere la reducción de los efectos adversos tóxicos que son dependientes de la concentración del fármaco.

Los liposomas han manifestado tener un futuro prometedor en el tratamiento de patologías pulmonares debido sobre todo a: su capacidad de solubilizar fármacos poco solubles; proporcionar una liberación sostenida con el tiempo, lo cual prolonga los niveles terapéuticos locales y sistémicos; evitan la irritación pulmonar; facilitan la liberación intracelular de fármacos, principalmente porque son captados por los macrófagos alveolares; son capaces de acceder a dianas específicas usando ligandos de superficie o anticuerpos; pueden ser absorbidos a través del epitelio intacto hasta alcanzar la circulación sistémica (Guerra-Morillo et al., 2020).

2. OBJETIVO

El objetivo de esta revisión consiste en investigar el uso de liposomas como sistemas portadores de antimicrobianos con el fin de atacar o erradicar las biopelículas formadas en el tejido pulmonar, así como analizar estos sistemas como estrategia para disminuir la resistencia microbiana.

3. METODOLOGÍA

Para alcanzar el objetivo propuesto en la presente memoria, se ha empleado como método de búsqueda bibliográfica la obtención de información de documentos válidos y relevantes a través de diferentes bases de datos como: *Pubmed*, *Science Direct*, *Web of Science*, *Catálogo Fama* y *Google Académico*. Del mismo modo, se ha llevado a cabo una búsqueda inversa, a través de la bibliografía de dichos artículos.

La búsqueda se realizó en inglés y castellano, siendo de gran relevancia la información obtenida en el primer idioma debido a que la mayoría de los artículos en esta área se encuentran publicados en inglés. Los términos utilizados en dichas bases de datos internacionales fueron: *biofilm*, *liposome*, *cystic fibrosis*, *nanomedicine*, *nanoparticles*, entre otros.

Una vez llevada a cabo su lectura, se procedió a realizar una búsqueda inversa, como ya se ha mencionado, con el fin de obtener trabajos de interés que en la búsqueda inicial no aparecieron y, sin embargo, resultaban de interés para el tema en estudio.

De las publicaciones revisadas y seleccionadas, se han incluido también varias referencias que se correspondían con fuentes primarias relevantes y artículos de revistas.

Tras la búsqueda, se han seleccionado las publicaciones mediante la aplicación de determinados criterios de inclusión y exclusión:

- **Criterios de inclusión:** resumen disponible y/o texto completo disponible, idioma en castellano o inglés.
- **Criterios de exclusión:** resumen no disponible, revisiones fechadas hace más de 10 años exceptuando aquellos que nos aportaban información básica sobre conceptos, los cuales han sido de fechas más antiguas.

En el apartado que se expone a continuación, se mostrarán los principales hallazgos obtenidos tras la lectura crítica de la bibliografía consultada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente, uno de los mayores desafíos en el tratamiento de infecciones por biopelículas está basado en superar la resistencia y tolerancia a los agentes antimicrobianos. La terapia exitosa en este caso estaría centrada en administrar formas innovadoras de sustancias antimicrobianas, en una concentración suficientemente alta, que tenga como diana las bacterias que forman la biopelícula y posteriormente penetrar en ella para atacar la población microbiana formadora de la colonia.

Como se ha referido en el apartado de Introducción, y dentro de los sistemas nanoparticulares, los liposomas se presentan como candidatos atractivos para encapsular

fármacos antimicrobianos, capaces de acceder a estas biopelículas, debido a su biocompatibilidad y versatilidad. Este tipo de vesículas ofrece un futuro prometedor en el tratamiento de las patologías pulmonares. Diversos estudios llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*, han puesto de manifiesto que la encapsulación en liposomas mejora la eficacia de fármacos tanto antibacterianos como antifúngicos contra una amplia gama de patógenos (Yilin et al., 2017).

Estos sistemas transportadores poseen capacidad de solubilizar fármacos poco solubles, pueden proporcionar una liberación sostenida del mismo a lo largo del tiempo, lo cual prolonga los niveles terapéuticos locales y sistémicos, evitan la irritación pulmonar y facilitan la liberación intracelular de fármacos, principalmente al ser captados por los macrófagos. Asimismo, poseen la capacidad de llegar a dianas específicas usando ligandos de superficie o anticuerpos y tienen el potencial para ser absorbidos a través del epitelio intacto para alcanzar la circulación sistémica (Guerra-Morillo et al., 2020). Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que presentan estos sistemas de administración, los liposomas presentan algunos inconvenientes, como la estabilidad limitada de las vesículas y el bajo atrapamiento de los fármacos hidrofílicos. La estabilidad de los liposomas está determinada por sus composiciones lipídicas, siendo el pH y la temperatura de almacenamiento los parámetros predominantes. Esta propiedad de los liposomas puede mejorarse mediante la adición de antioxidantes para evitar la oxidación de los fosfolípidos, mientras que la hidrólisis puede verse minimizada mediante la preparación de dispersiones de liposomas a pH neutro, almacenamiento a temperaturas más bajas y la liofilización de las formulaciones (Rukavina y Vani, 2016). Un problema importante asociado con la inestabilidad física es la liberación de fármaco de las vesículas lipídicas durante el almacenamiento y administración *in vivo*. De hecho, la mayor permeabilidad de la membrana y la pérdida de contenido más rápida se observa cuando las bicapas están en la fase de líquido cristalino (a una temperatura superior a la temperatura de transición de fases). Por lo tanto, la estabilidad de los liposomas se puede mejorar aumentando la proporción de fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos saturados y más largos, respectivamente, así como con la adición de colesterol, lo que resulta en vesículas con bicapas rígidas que tienen una temperatura de transición más alta. Además, la carga superficial (tanto positiva como negativa) también ha demostrado afectar la liberación de fármaco, lo cual se convierte en una característica muy desfavorable, ya que se ha demostrado que la mejor actividad antibacteriana se logra formulando liposomas

con carga positiva y con características de bicapa propias de los liposomas fusogénicos, como veremos más adelante (Rukavina y Vani, 2016). Al mismo tiempo, la presencia de lípidos aniónicos en las vesículas favorece la unión de las proteínas séricas a la superficie de las vesículas. Otro aspecto importante que considerares el relacionado con la inestabilidad física de los liposomas, su agregación y fusión durante el almacenamiento, que conduce al aumento del tamaño de la vesícula, que posteriormente afectará a su actividad *in vivo*.

Por tanto, y en vista de todos los factores de formulación que pueden influir en la estabilidad y efectividad de estos sistemas vesiculares, es importante analizar cómo afectarían las propiedades fisicoquímicas de los liposomas a su actividad frente al *biofilm*.

4.1. Efecto de la formulación y propiedades fisicoquímicas de los liposomas sobre la biopelícula

Se ha demostrado en diversos estudios de investigación (Rukavina y Vani, 2016) que las características fisicoquímicas de los liposomas influyen tanto en la eficacia y prevención como en la erradicación de las biopelículas. Se puede destacar que un tamaño apropiado, con población monodispersa en tamaño, características adecuadas de la bicapa, características de la superficie y elevada eficacia de encapsulación, son parámetros de gran relevancia a tener en cuenta para asegurar un acceso efectivo de antimicrobianos a las biopelículas. No obstante, no hay que olvidar las propiedades de la biopelícula, la compleja composición de su matriz extracelular, así como las características fisicoquímicas de los antimicrobianos encapsulados, ya sean fármacos, enzimas, metales, etc. En la figura 7 se presenta un esquema donde se resume la información anterior, destacando la importancia de optimizar las características fisicoquímicas de los liposomas atendiendo a su formulación para conseguir con éxito una eficacia en la erradicación de las biopelículas.

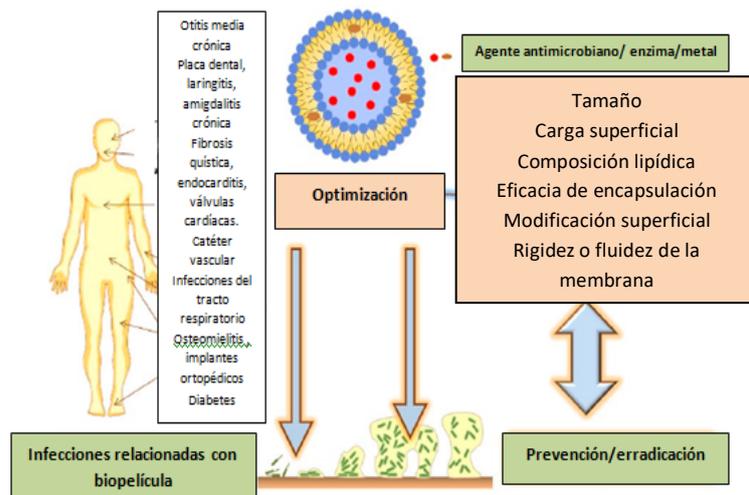


Figura 7. Influencia de las propiedades fisicoquímicas de los liposomas en la erradicación de la biopelícula. Modificada de Rukavina y Vani (2016).

Como estrategia inicial para permitir y prolongar el tiempo de contacto del antibiótico con la biopelícula mediante el uso de liposomas, se plantea favorecer la interacción mediante el uso de vesículas con carga superficial opuesta a la carga superficial de las bacterias.

Además, se ha demostrado que el tamaño de los liposomas y el estado termodinámico de las bicapas son responsables de la estabilidad de las vesículas durante el almacenamiento, liberación y la interacción con la biopelícula y las bacterias (Martin et al., 2015). Es por ello por lo que la permeabilidad de las moléculas atrapadas entre las bicapas lipídicas de los liposomas se convierte en el punto principal para desarrollar nuevas formulaciones de liberación controlada (Gubernator et al., 2007; Martin et al., 2015). La mayoría de los liposomas convencionales estudiados que son efectivos en la administración de antimicrobianos a las biopelículas tienen un tamaño significativamente inferior a 500 nm, en concreto, entre 100 y 200 nm (Liu et al., 2019). Incluso entre estos dos tamaños, se obtuvo en un estudio llevado a cabo con cloranfenicol, que la eficacia de encapsulación fue menor para los liposomas de 200 nm en comparación con las vesículas extruidas de 100 nm. Además, como efecto del tamaño, la difusión de liposomas extruidos de 200 nm en las biopelículas fue menor en comparación con las vesículas extruidas de 100 nm. Estos resultados pueden ayudar a explicar la diferencia de la eficacia en el control de las biopelículas bacterianas (Dias-Souza et al., 2017).

Estudios llevados a cabo por diversos autores (Mugabe et al., 2005; Alhariri et al., 2017) pusieron de manifiesto que la estabilidad de las formulaciones liposomales, y con ello, su actividad antimicrobiana, dependía en gran medida de la temperatura. Para ello se formularon liposomas con gentamicina, la cual está indicada en el tratamiento, a corto plazo, de las infecciones graves producidas por cepas de bacilos aeróbicos Gram negativos y bacilocos sensibles a gentamicina, siendo las principales indicaciones la septicemia, infecciones de la piel y tejidos blandos, infecciones de las vías respiratorias incluyendo pacientes con FQ, infecciones del SNC, etc. Los estudios demostraron que las formulaciones neutras y cargadas negativamente retuvieron 91% de gentamicina encapsulada, almacenada a 4 °C después de 48 h, mientras que a 37 °C, la encapsulación del fármaco se redujo ligeramente durante el período de estudio. Este efecto de la temperatura podría explicarse por la extensión en la longitud de las cadenas acílicas de los lípidos y la presencia de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en las formulaciones, que contribuyó a aumentar la temperatura de transición de fase (40 °C aprox.). Se confirmó así que los fosfolípidos saturados con una temperatura de transición alta, como DPPC, son más estables (Solleti et al., 2015). Como información adicional, se comprobó que la presencia de colesterol en las formulaciones redujo la permeabilidad de la bicapa, lo que resultó en la mejora de la encapsulación de fármacos a una temperatura superior (Anderson y Omri, 2004).

Finalmente, los métodos tradicionales de elaboración de liposomas, como la hidratación de la película lipídica, proporcionan un bajo rendimiento de encapsulación (Costerton et al., 2003; Frézard et al., 2011). La utilización de métodos alternativos, como el método de deshidratación-rehidratación, proporcionan mejoras en los valores de encapsulación de fármacos antimicrobianos como cloranfenicol (Dias-Souza et al., 2017). Encontrar un proceso adecuado de encapsulación de fármacos antimicrobianos puede aumentar su efectividad y superar los mecanismos de resistencia que implican su degradación, por ejemplo, debido a la hidrólisis enzimática.

En base a estas premisas, en el presente trabajo de revisión, se ha llevado a cabo el análisis acerca del papel de los liposomas en la eficacia de erradicación de las biopelículas de infecciones pulmonares, estableciendo una clasificación de estos de acuerdo con el diseño y características fisicoquímicas de los mismos.

4.2. Influencia del tipo de liposomas en la erradicación de las biopelículas

4.2.1 Liposomas convencionales

Este término hace referencia a los liposomas clásicos, es decir, aquellos que no tienen modificaciones en su superficie, compuestos por fosfolípidos con o sin adición de colesterol (Chol). Este tipo de liposomas puede atacar las biopelículas por un mecanismo de unión directa, lo que les permite la liberación posterior de las sustancias atrapadas, en el área circundante de los microorganismos.

La composición fosfolipídica de estas vesículas puede ser de origen natural o de origen sintético. Los liposomas naturales están compuestos de fosfolípidos de origen natural, como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, lecitina de soja, o lecitina de yema de huevo, a veces complementada con otros lípidos. La composición de los liposomas de origen sintético es muy variable, conteniendo lípidos ampliamente utilizados como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y dioleilfosfatidilcolina (DOPC), entre otros.

Estos lípidos contienen una cabeza polar hidrofílica y varias cadenas lipídicas hidrofóbicas. Dado que la cabeza hidrofílica de algunos de estos fosfolípidos es eléctricamente neutra (Wang et al., 2020), el potencial superficial de los lípidos es eléctricamente neutro, que se corresponde en general con potenciales zeta comprendidos entre -10 y $+10$ mV, como se recoge en la figura 8.

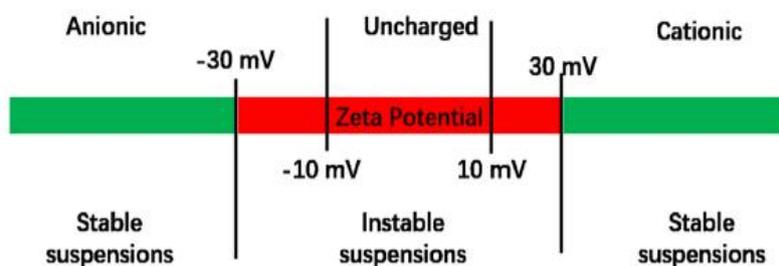


Figura 8. Potenciales zeta de los liposomas. Las dispersiones de liposomas se consideran inestables cuando su potencial zeta está entre -30 y $+30$ mV (Manai et al., 2017). Los potenciales zeta comprendidos entre -10 y $+10$ mV se consideran liposomas no cargados. Tomada de Wang et al., (2020).

Los liposomas que se encuentran en forma de dispersión coloidal requieren potenciales zeta más negativos que -30 mV o más positivos que $+30$ mV, con el fin de experimentar una repulsión electrostática de doble capa suficiente para generar sistemas estables. Además de la estabilidad de la dispersión, también la estabilidad de la bicapa lipídica en un liposoma se afecta cuando se utilizan lípidos altamente cargados (Kaszuba et al., 2010) o debido a la oxidación de los lípidos de la membrana. La inestabilidad inducida por la oxidación de los liposomas se puede prevenir agregando agentes reductores a los lípidos de la membrana, como ya se mencionó anteriormente.

Por tanto, dada la importancia de este factor, cuantificado mediante la medición de los potenciales zeta, en la estabilidad de las dispersiones de liposomas y su interacción con el entorno, incluidas las proteínas o las bacterias, los liposomas se vienen formulando con fosfolípidos que poseen radicales catiónicos y aniónicos, con el fin de ajustar su carga superficial (Kamaly et al., 2012).

Por ello, dentro de este grupo de liposomas convencionales resaltamos las siguientes aportaciones. Joshi y Misra (2001) llevaron cabo un estudio sobre la budesonida liposomal (EPC-Chol) en una formulación en polvo seco. Se descubrió que este sistema mantuvo los niveles de fármaco deseados en los pulmones por un tiempo prolongado, posiblemente permitiendo una mejor eficacia del fármaco y menores efectos adversos (Velino et al, 2019).

Posteriormente al estudio llevado a cabo en 2001, se destacó el efecto del ADN, F-actina, ácido lipoteicoico (LTA) y los lipopolisacáridos (LPS) sobre la actividad bactericida de antibióticos como tobramicina y polimixina B libres para tratar pacientes con FQ (Alipour et al, 2009). Se encapsularon dichos antibióticos en liposomas con el fin de mostrar una inhibición antibiótica menor en comparación con los antibacterianos libres. Los agentes antibacterianos policatiónicos, como los aminoglucósidos y las polimixinas, requieren vías de captación específicas para la entrada y erradicación de bacterias Gram negativas. Los antibióticos catiónicos aumentan la permeabilidad de la membrana externa bacteriana al desplazar los iones magnesio y unirse a los LPS. Sin embargo, en el esputo con FQ, altamente iónico, la elevada afinidad de las endotoxinas y glicoproteínas bacterianas polianiónicas excretadas de los glóbulos blancos lisados hacia los antibióticos catiónicos disminuye en general la interacción con la bacteria en los pulmones. Es por ello por lo que los liposomas pueden crear un entorno protector para los agentes antibacterianos,

minimizando tales interacciones y, posteriormente, manteniendo una concentración constante de fármacos en los pulmones. En este estudio se pudo demostrar que el atrapamiento o encapsulación de ambos antibióticos en los liposomas redujo la inhibición de estos hasta 100 veces y además redujo las unidades formadoras de colonias (UFC) de *P.aeruginosa* en el esputo 4 veces respecto a los antibióticos administrados de forma convencional.

Centrándonos ya en este grupo concreto de liposomas, según la carga superficial que adquieran mediante la adición de lípidos cargados en las bicapas, se pueden categorizar en: liposomas neutros, aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos.

- **Liposomas neutros**

Varios grupos de investigación han evaluado los potenciales de los liposomas convencionales en la erradicación de *P. aeruginosa* (el principal patógeno en los pulmones de los pacientes con FQ, que crece en pequeñas colonias formando biopelículas) en estudios *in vivo* tanto en animales de experimentación como en ensayos clínicos. Así, Meers et al. (2008) investigaron el potencial de penetración en biopelículas, el mecanismo de liberación del fármaco y la actividad antimicrobiana *in vivo* de liposomas neutros con DPPC/Chol cargados con amikacina y diseñados para su nebulización y administración por inhalación. Con el fin de visualizar la penetración en la biopelícula, los liposomas se prepararon marcados con carbocianina fluorescente y se monitorizaron mediante fluorescencia o microscopía láser de barrido confocal. En este estudio se observó que las vesículas con un diámetro medio de aproximadamente 300 nm penetraron fácilmente en la biopelícula y a través de la mucosidad infectada por *P. aeruginosa*, mientras que las vesículas con tamaños superiores a 1 μm no pudieron hacerlo. Además, se llevaron a cabo estudios paralelos también *in vivo* para observar los resultados de penetración en el *biofilm* mediado por el esputo y ramnolípidos presentes en el sobrenadante de la biopelícula. Como resultado se obtuvo una liberación sostenida de amikacina dando lugar a un rendimiento superior *in vivo* y, por tanto, una mayor eficacia de la amikacina liposomal inhalada en comparación con la formulación del fármaco libre. Hemos de saber que los ramnolípidos en las biopelículas de *P. aeruginosa* y el esputo de la FQ, debido a las características biotensioactivas, desencadenan así la liberación de la amikacina de los liposomas. Debido a que la concentración de ramnolípidos es mayor en la proximidad de la biopelícula, los liposomas liberan el

antibiótico en el sitio de la infección, consiguiendo así una liberación dirigida al lugar concreto de la infección (Rukavina y Vani, 2016).

La mejoría en la efectividad de amikacina liposomal (Arikace[®]) para el tratamiento de infecciones bacterianas por biopelículas ha sido confirmado en estudios clínicos, habiendo pasado las Fases II y III de ensayos clínicos en pacientes con FQ, con infecciones por *P. aeruginosa*, demostrando su tolerabilidad, seguridad, actividad biológica y eficacia (Clancy et al., 2013).

- **Liposomas catiónicos**

Los liposomas catiónicos se pueden diseñar con lípidos naturales o sintéticos con radicales catiónicos, como el ión amonio (Gottenbos et al., 2001; Lu et al., 2007), sulfonio (Ghatts y Leroux, 2009) o fosfonio (Popa et al., 2003; Chang et al., 2010). Como se ha comentado anteriormente, se requieren valores de potencial zeta de + 30 mV aproximadamente para conseguir dispersiones estables. Se han propuesto los liposomas catiónicos como sistemas adecuados de liberación de fármacos debido a su interacción electrostática con áreas o superficies cargadas negativamente, como la piel o dientes, a cuyas superficies se encuentran bacterias asociadas (Nguyen et al., 2013).

Robison et al. (2000) han destacado que cada bacteria presente en la biopelícula se adsorbe de forma independiente y que el grado de adsorción se reduce significativamente para los liposomas aniónicos en comparación con las vesículas cargadas positivamente, empleando formulaciones del mismo rango de tamaños. Este resultado llevó a concluir que las formulaciones catiónicas, en general, resultan ser más efectivas contra bacterias cargadas negativamente debido a su interacción iónica y a la fusión con la envoltura celular bacteriana (Drulis-Kawa y Dorotkiewicz-Jach, 2009). A lo largo de esta revisión podremos ver distintas formulaciones liposomales que, mediante adición o modificaciones varias dan lugar a liposomas catiónicos que establecen interacción electrostática con las membranas.

- **Liposomas aniónicos**

Estos liposomas pueden encapsular más eficazmente antimicrobianos con carga positiva (Messiaen et al., 2013) y prolongar su tiempo de liberación (Kaszuba et al., 1995; Robinson et al., 1998; 2000; Tang et al., 2009). Algunos estudios han demostrado que los liposomas aniónicos compuestos de DPPG y DOPC podrían cargarse con cantidades ocho

veces más altas de antibióticos que los liposomas basados en lípidos naturales sin carga (Messiaen et al., 2013; Wang et al., 2020).

Las biopelículas de *P. aeruginosa* tienen carga neta negativa; por lo tanto, la interacción de antibióticos cargados positivamente con los polímeros de la matriz constituyente de la biopelícula evitaría la penetración de antibióticos, como gentamicina, en la bacteria.

Este problema puede solventarse mediante la encapsulación de tobramicina, aminoglucósido eficaz contra cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas, en liposomas. En un estudio que se llevó a cabo encapsulando el fármaco en liposomas cargados negativamente, se apreció una inmovilización de células bacterianas debido a la atracción electrostática de los liposomas, que llevó a la penetración del fármaco y la muerte celular. Un resultado positivo adicional de este estudio fue la mayor carga de tobramicina en los liposomas aniónicos (ocho veces mayor) que en los liposomas neutros naturales debido a la interacción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y el fármaco (Messiaen et al., 2013).

Con el fin de mejorar el efecto antimicrobiano de este grupo de fármacos, Alhariri et al. (2017) evaluaron la actividad antimicrobiana de formulaciones de liposomas neutros y aniónicos que contenían gentamicina, en comparación con gentamicina libre. La actividad antimicrobiana se examinó midiendo parámetros microbiológicos como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) contra varias cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas. Los resultados demostraron que las CMI y CMB de la gentamicina encapsulada en liposomas aniónicos fueron significativamente más bajas que las de la gentamicina libre, al inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas analizadas.

Anteriormente, un estudio demostró que los liposomas cargados negativamente que contenían DPPC/ Sal sódica de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol (DMPG) y cargados con aminoglucósidos (tobramicina, gentamicina) exhibieron una actividad antibacteriana mejorada (Beaulac et al., 1998). Alhariri y colaboradores llevaron a cabo diferentes formulaciones de lípidos cargados negativamente, neutros y con colesterol en diferentes proporciones molares con un total de 20 mg/mL de contenido de lípidos, es decir, 7.5 mg de DPPC; 10.5 mg de DMPG; 2 mg de colesterol en una relación molar 2:3:1 (al que denominó NELG-1), se prepararon 6.3 mg de DPPC; 12 mg de DMPG; 1.7 mg de colesterol en una relación molar 2:4:1 (llamado NELG-2) y 15.8 DPPC; 4.2 mg de

colesterol en una relación molar 2:1 (denominado NLG) a través del método de deshidratación-rehidratación de vesículas. En este estudio, se encapsuló gentamicina en estas formulaciones liposomales con el fin de estudiar y analizar su efecto frente infecciones pulmonares y concretamente sobre la formación de biopelículas por *P. aeruginosa*. El aumento de la proporción de fosfolípidos cargados negativamente en las formulaciones de liposomas (NELG-1 y NELG-2) desempeñó un papel importante en el aumento de la eficacia de encapsulación de gentamicina en comparación con los liposomas neutros, debido a una interacción entre la gentamicina cargada positivamente y los liposomas cargados negativamente. Estos resultados pueden explicarse por el inicio de una fuerza de interacción electrostática entre las moléculas cargadas positivamente, como la gentamicina y los fosfolípidos cargados negativamente.

Además, se observó que en presencia de lavado broncoalveolar (LBA), esputo y plasma humano, la liberación del fármaco de la formulación varió (Alhariri et al., 2017). NLG mantuvo una cantidad razonable de gentamicina en estos entornos. NELG-1 y NELG-2 perdieron su contenido de gentamicina a medida que se incrementaba la carga negativa. Esto se explica por la avidez de las formulaciones negativas para interactuar con las lipoproteínas, la albúmina, las inmunoglobulinas y las fosfolipasas presentes en LBA, esputo y plasma, que tienen la capacidad de desestabilizar los liposomas dependiendo de la composición lipídica o la carga electrostática. Es sabido que los liposomas que contienen DPPC se unen a menos proteínas y son en general, más estables que un liposoma cargado negativamente (Hernández-Caselles et al., 1993). Este estudio llegó a concluir con los datos obtenidos que los liposomas neutros aumentan la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra las bacterias planctónicas, mientras que los liposomas cargados negativamente aumentan la encapsulación del fármaco y mejoran significativamente su actividad frente a la comunidad de biopelículas.

- **Liposomas zwitteriónicos**

Estos liposomas se caracterizan porque presentan potenciales zeta dependiente del pH, y no muestran una carga concreta. Ello se debe a que los lípidos que conforman la bicapa son de naturaleza zwitteriónica, por lo que tienen grupos funcionales ácidos y alcalinos (Hu et al., 2019; Makhathini et al., 2019) que permiten la inversión de carga por debajo y por encima de su punto isoeléctrico (Vila-Caballer et al., 2016; Liu et al., 2019). Esta característica permite la elaboración de liposomas que se encuentren cargados

negativamente en condiciones de pH fisiológico y adquieran carga positiva en condiciones del entorno más ácidas. Así ocurre con los liposomas de poli (metacriloilsulfadimetoxina) (PSD), desarrollados por varios autores (Ghattasy Leroux, 2009; Lu et al., 2018). La carga negativa a valores de pH fisiológicos ayuda al transporte de estos liposomas a través de la circulación sanguínea sin interacción importante con otros componentes sanguíneos cargados negativamente (Hamal et al., 2019), mientras que la adquisición de una carga positiva dentro del ambiente ácido de una biopelícula facilita una mejor interacción con bacterias cargadas negativamente allí existentes, como han demostrado algunos autores en sus estudios (Robinson et al., 2001; Nederberg et al., 2011; Ng et al., 2013).

4.2.2. Liposomas fusogénicos

Los liposomas fusogénicos, también conocidos como Fluidosomas, han sido diseñados en este campo de la investigación con el fin de mejorar la administración y acción de antimicrobianos, ya que facilitan la fusión de las membranas liposomales con las bacterianas.

Se trata de vesículas que, por su composición, pueden fusionarse con membranas biológicas, lo que aumenta la internalización del fármaco en las células. Las bicapas de estos liposomas contienen una fracción optimizada de lípidos que causan alteraciones en el empaquetamiento y la formación de la bicapa de fosfolípidos. La presencia de lípidos asimétricos, como fosfatidiletanolamina, o lípidos con cadenas acílicas más cortas, proporcionan una mayor fluidez de la bicapa lipídica pudiendo, de esta forma, desestabilizar las membranas biológicas (Furier et al., 2014; Scriboni et al., 2019) así como inducir la disminución de la temperatura de transición de la membrana (Rukavina y Vani, 2016). Por tanto, en comparación con los liposomas convencionales, típicamente compuestos de membranas rígidas, los liposomas fusogénicos se caracterizan por bicapas lipídicas relativamente fluidas.

Con estos liposomas, se ha descubierto que la actividad bactericida de la tobramicina liposomal depende principalmente de la fluidez de la membrana liposomal. Así, Furier et al. (2014) demostraron que los fluidosomas, con una temperatura de transición de fase (T_c) de aproximadamente 30 °C, mostraron una reducción significativa de la viabilidad de la biopelícula de *P. aeruginosa* en comparación con el antibiótico libre.

Como ya se ha indicado anteriormente, *P. aeruginosa* es conocida por causar infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ y en pacientes que padecen bronquiectasias sin FQ, pero también pueden causar infecciones relacionadas con heridas y dispositivos o material quirúrgico (catéteres, prótesis implantables). En este sentido, algunos autores mostraron que empleando fluidosomas como sistemas de administración de antimicrobianos como tobramicina, gentamicina y amikacina, se consiguió la erradicación completa de la enfermedad pulmonar crónica, que cursaba con infección por *P. aeruginosa* (Günday et al., 2014; Hadinoto y Cheow, 2014). Estos estudios, en los cuales se evaluó la actividad antimicrobiana *in vivo* en ratas, confirmaron que el antibiótico permanecía principalmente en los pulmones tras la administración de la formulación en liposomas, a diferencia de las formulaciones con el fármaco libre, donde se apreciaba una menor persistencia del fármaco en este órgano, lo que probablemente reduciría los efectos secundarios y la toxicidad sistémica (Forier et al, 2014).

Las formulaciones de liposomas de tobramicina han sido ampliamente estudiadas con el fin de incrementar su eficacia antimicrobiana a nivel pulmonar y reducir su toxicidad a nivel sistémico. Tras los primeros estudios que mostraron un aumento significativo en el tiempo de residencia del fármaco a nivel pulmonar, tanto para ratas sanas como infectadas, en comparación con la administración de tobramicina libre (Beaulac et al., 1996), se han incorporado nuevos estudios que analizan los efectos de la composición liposomal en la cinética de liberación del fármaco y la eficacia mediante el desarrollo de fluidosomas, compuestos de DPPC:DMPG en una relación variable de 10:1 a 15:1 (Velino et al, 2019). Los resultados del estudio mostraron que la administración de fluidosomas cargados de tobramicina en ratas infectadas, condujo a una erradicación completa del patógeno en comparación con liposomas convencionales y con el antibiótico sin liposomar. Además, la detección de bajos niveles de fármaco en los riñones tras el tratamiento sugirió una posible nefrotoxicidad reducida. Efectivamente, la tobramicina medida en los pulmones transcurridas 16 h desde la última dosis de antibiótico administrada, adquirió unos valores de concentración mayor o igual a 27 µg/mg de tejido en las formulaciones de liposomas. Asimismo, se detectaron niveles bajos de fármaco en los riñones (0,59 a 0,87 µg/mg de tejido) tras administrar el antibiótico encapsulado, mientras que los valores fueron de 5,31 µg/mg de tejido en los riñones en el caso del antibiótico libre.

Por tanto, los resultados de los diferentes estudios sugieren que la administración local de liposomas fluidos con tobramicina encapsulada podría mejorar en gran medida el tratamiento de la infección pulmonar crónica en pacientes con FQ. Ello requeriría la optimización de las formulaciones en cuanto a capacidad de encapsulación del fármaco, la fluidez adecuada que permitiera una modulación en la liberación del antibiótico y la posible interacción con la membrana externa bacteriana por mecanismos de fusión, así como la persistencia pulmonar. Se destaca que la carga negativa de los fluidosomas puede favorecer su reactividad y se ha demostrado que con una Tc similar a la descrita anteriormente de 30°C aproximadamente, la carga negativa tiende a mejorar la estabilidad física de los liposomas al reducir la capacidad de agregación (Grit and Crommelli, 1993).

4.2.3. Liposomas modificados

Las aplicaciones de los liposomas, particularmente de aquellos que presentan tamaños inferiores a 100 nm, a menudo se ven obstaculizadas por la escasa estabilidad que poseen estas vesículas debido a que sufren fenómenos de fusión y/o agregación espontáneos, resultando en pérdidas de carga útil e incremento de sus dimensiones.

Con el fin de superar este inconveniente, se han empleado varias estrategias, como optimización de la composición de liposomas y adición de agentes estabilizadores en su formulación (Yilin et al., 2017).

De forma global, la alteración de la composición y concentración de lípidos en la bicapa ha demostrado tener efectos significativos sobre el grado de adsorción en diferentes patógenos. En el caso, por ejemplo, de biopelículas de *S. aureus*, dichas propiedades modifican la efectividad de los fármacos encapsulados (Jardeleza et al., 2014). Dado el grado de dificultad de la penetración de la matriz de biopelículas por los antimicrobianos, por ejemplo, a nivel tópico, debido a que se origina una gran combinación de barreras físicas y metabólicas, asegurar que las dosis de los fármacos sean eficaces, difundan adecuadamente y lleguen a las células bacterianas formadoras del *biofilm*, resulta clave para conseguir una erradicación efectiva de las biopelículas. Asimismo, se ha demostrado que las propiedades bacterianas, como la hidrofobicidad de la pared celular, afectan a la penetración de los liposomas y, por lo tanto, la movilidad del fármaco a través de la matriz de biopelículas (Habimana et al., 2001).

La estearilamina (SA) es un lípido cargado positivamente ampliamente utilizado en la formulación de liposomas con el fin de aportar carga positiva superficial. Sus características de rigidez aportan estabilidad a las vesículas formadas (Guerra-Morillo et al, 2020). Su aplicación en la erradicación de las biopelículas bacterianas se fundamenta en la interacción electrostática con la carga opuesta de la superficie de la membrana bacteriana o la carga biológica negativa de los compuestos de la matriz. Aunque la unión a compuestos de la matriz podría ser realmente desventajosa debido que se vería dificultada la interacción directa de los liposomas con la superficie bacteriana, podrían permanecer como reservorios para ir liberando de forma prolongada los agentes antimicrobianos en las inmediaciones directas de las biopelículas (Forier et al, 2014). En algunos estudios se ha descubierto que la cantidad de estos liposomas depositados en la biopelícula dependía de la fuerza iónica del medio circundante, la temperatura y la hidrofobicidad de las bacterias, de forma que se adsorbían más liposomas a una fuerza iónica más baja, a temperaturas más altas y cuando las bacterias eran más hidrófobas. Cabe señalar que, aunque se adhieren menos liposomas a temperaturas más bajas, la fuerza de adsorción era mayor, lo que es consistente con una interacción electrostática. Por otra parte, el contenido de SA en los liposomas tuvo efectos importantes en la efectividad de las formulaciones ya que, a elevada concentración, SA puede separarse de los liposomas y unirse a las bacterias, reduciendo así la capacidad de unión de los liposomas a la célula bacteriana (Kim et al., 1999).

En 2008 se llevó a cabo un estudio en el cual se coencapsuló Galio y Gentamicina en liposomas. El objetivo de dicha administración conjunta fue mejorar la eficacia antimicrobiana de este aminoglucósido frente a bacilos aeróbicos Gram negativos y bacilocos. El galio ha demostrado ser un agente eficaz inhibidor del crecimiento y formación de biopelículas por *P. aeruginosa* (Halwani et al., 2008). Este metal es reconocido debido a sus similitudes químicas con el hierro, de forma que puede sustituir a este en muchos sistemas biológicos e inhibir, por tanto, procesos dependientes de hierro. La interrupción del metabolismo del hierro aumentaría la vulnerabilidad de la mayoría de las bacterias infecciosas, ya que es un elemento esencial para el crecimiento y funcionamiento de enzimas claves, como las involucradas en la síntesis de ADN y proteínas, transporte de electrones y en el estrés oxidativo.

La encapsulación del galio en los liposomas ofrecía además la ventaja de reducir su toxicidad, la cual limita su uso clínico. El perfil toxicológico de este metal, de forma

individual, hizo que disminuyese la viabilidad de las células expuestas a él, mientras que, al encapsularlo en los liposomas, este efecto desapareció, como se puede apreciar en la figura 9. Probablemente, la presencia de las bicapas de fosfolípidos de los liposomas evita el contacto directo del galio con las células pulmonares.

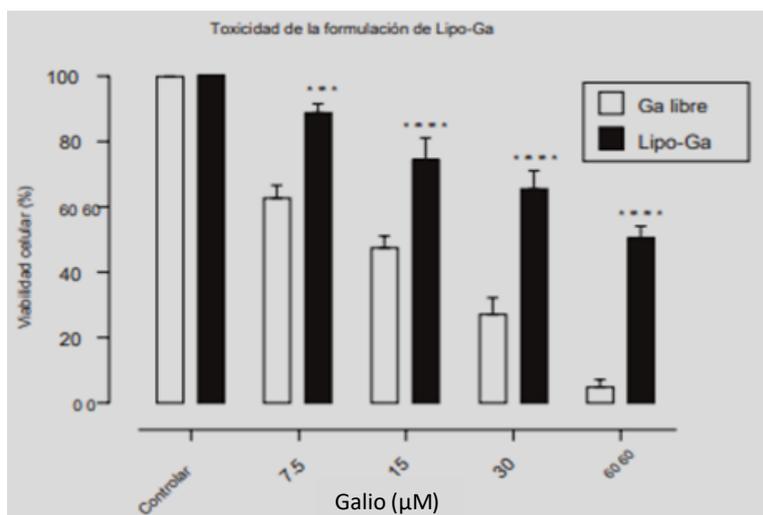


Figura 9. Efecto de la formulación de liposomas de galio (Lipo-Ga) sobre la viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad de las células pulmonares A549 se midió después de 24h de incubación con Ga libre (barras blancas) y Lipo-Ga (barras negras) a 7.5, 15,30 y 60 µM de Ga. Las células A549 no tratadas actuaron como control positivo. Adaptada de Halwani et al. (2008).

El estudio puso de manifiesto que la CMI de la formulación de liposomas con galio y gentamicina combinados era significativamente menor (8 mg/L) respecto a una formulación de galio asociado a gentamicina (32 mg/L), y ésta menor a gentamicina libre (64mg/L). Se destacó que la formulación liposomal fue la única que conseguía eliminar las cepas en forma de biopelícula y, con ello, la resistencia bacteriana (Halwani et al., 2008).

El mecanismo de acción de la formulación anterior está relacionado con la supresión de las moléculas de QS que, como se mencionó en el apartado de introducción, se trata de una serie de moléculas análogas a la acil-homoserinas lactonas (AHL) que se definen como vías de comunicación para la formación de biopelículas. Así, se demostró que la formulación liposomal suprimía la producción de AHL sin matar las bacterias.

Esta formulación supuso una nueva estrategia para los liposomas como sistemas transportadores de dos fármacos en una misma formulación, que consiguió: reducir la CMI de gentamicina con el consiguiente ajuste de dosis, reducir la toxicidad del galio y capacidad para prevenir la formación de biopelículas y la resistencia bacteriana que están asociadas a la infección pulmonar crónica de pacientes con FQ (Halwani et al., 2008). Estos estudios *in vitro* requieren un modelo animal para seguir evaluando la viabilidad de la propuesta.

4.2.4. Liposomas de superficie modificada

Una de las estrategias propuestas para combatir las infecciones relacionadas con biopelículas es el uso de liposomas modificados en la superficie. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo mediante diversos mecanismos. Globalmente se podrían clasificar en: modificación superficial por interacciones iónicas o por unión covalente de ligandos. En el primer grupo se englobarían las formulaciones utilizando: enzimas (lisozima, serratiopeptidasa) y polisacáridos (quitosano). En el segundo grupo se incorporarían: poliéteres (polietilenglicol), proteínas (lectinas) o anticuerpos, a la superficie del liposoma.

Como se ha referido inicialmente, las intervenciones convencionales con antimicrobianos para erradicar biopelículas son con frecuencia ineficaces debido, en la mayoría de los casos, a la producción de sustancias poliméricas extracelulares en la biopelícula, y que es considerado el mecanismo más común de resistencia antimicrobiana (Epstein et al., 2011; Jiang et al., 2011; Ghosh et al., 2015). Las sustancias poliméricas extracelulares pueden adsorber o reaccionar con moléculas antimicrobianas, disminuyendo su penetración en la biopelícula y, por lo tanto, la interacción con los microorganismos (Dias-Souza et al., 2017).

Con el fin de favorecer la penetración de las formulaciones a través de la biopelícula y su contacto con el microorganismo, Fu et al. (2019) propusieron modificar la superficie de liposomas con quitosano, polisacárido catiónico cuya estructura química se muestra en la figura 10.

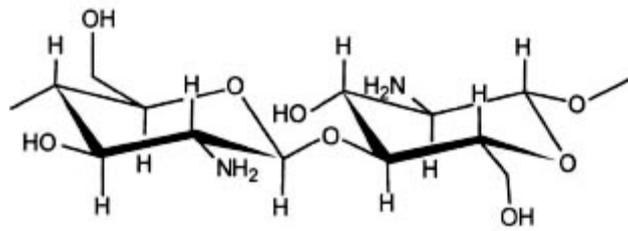


Figura 10. Estructura química del quitosano. Tomada de Rodríguez-Hamamur et al. (2010).

Con ello, además de mejorar la estabilidad de las formulaciones, la carga positiva de quitosano podría facilitar la interacción electrostática con la membrana bacteriana y con ello, el acceso del fármaco a las células, mejorando así la actividad antibacteriana. Además, las características hidrofílicas del quitosano favorecen la encapsulación de fármacos en liposomas y mejoran las interacciones de los fármacos con las bacterias.

El estudio se propuso con el objetivo de intentar aumentar la efectividad antibacteriana de la polimixina B y reducir su toxicidad. Para ello, se prepararon liposomas cargados de polimixina B modificados con quitosano (LPC). Sus propiedades fisicoquímicas de tamaño y carga superficial permitieron obtener una eficacia de encapsulación y carga de fármaco elevadas. Además, los perfiles de liberación mostraban mecanismos de liberación sostenida en el caso de los liposomas modificados con quitosano (figura 11).

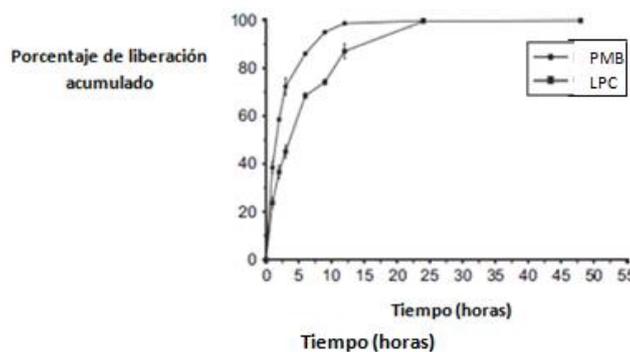


Figura 11. Perfiles de liberación *in vitro* de polimixina (PMB) a partir de una solución a partir de liposomas de PMB modificados con quitosano (LPC) a las 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 horas. Adaptada de Fu et al. (2019).

Con relación a la efectividad antibacteriana de la formulación, se obtuvo que la CMI del crecimiento visible de las células de biopelículas de LPC frente a *Acinetobacter*

baumannii (AB) era 8 ± 2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la de PMB fue de 32 ± 2 $\mu\text{g/mL}$, como se refleja en la figura 12. Ello sugiere que los LPC aún no pudieron eliminar eficazmente a AB productora de biopelícula resistente a la polimixina B, aunque tuvo cuatro veces más eficacia anti-biopelícula que el fármaco solo.

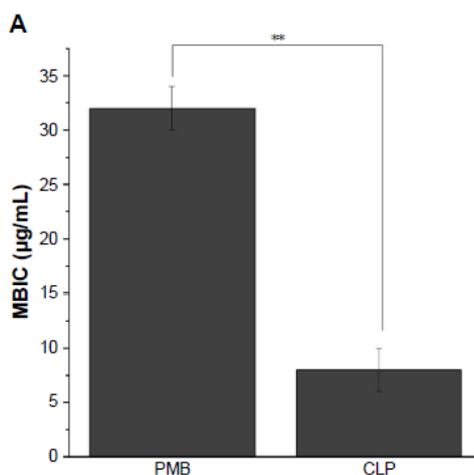


Figura 12. Efectos antibacterianos de diferentes tratamientos sobre *Acinetobacter baumannii* productora de biopelículas *in vitro*. Valores de concentración mínima inhibitoria de crecimiento visible de biopelícula (CMIB). A) Solución de polimixina B (PMB) y liposomas de polimixina B recubiertos con quitosano (LPC), siendo $n=3$. Tomada de Fu et al. (2019).

Con el fin de mejorar la erradicación de la biopelícula, en este estudio se incluyó la formación de canales temporales en el *biofilm* por cavitación mediante aplicación de ultrasonidos. Ello induciría la penetración de LPC en las biopelículas y la disgregación de las bacterias planctónicas, de las biopelículas. Efectivamente, los resultados *in vitro* indicaron que el efecto antibacteriano sinérgico de las microburbujas de ultrasonidos en combinación con LPC que contenían 2 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B fue suficiente para eliminar casi por completo *Acinetobacter baumannii* productora de *biofilm* resistente a fármacos. Estos resultados fueron confirmados por ensayos morfológicos (figura 13).

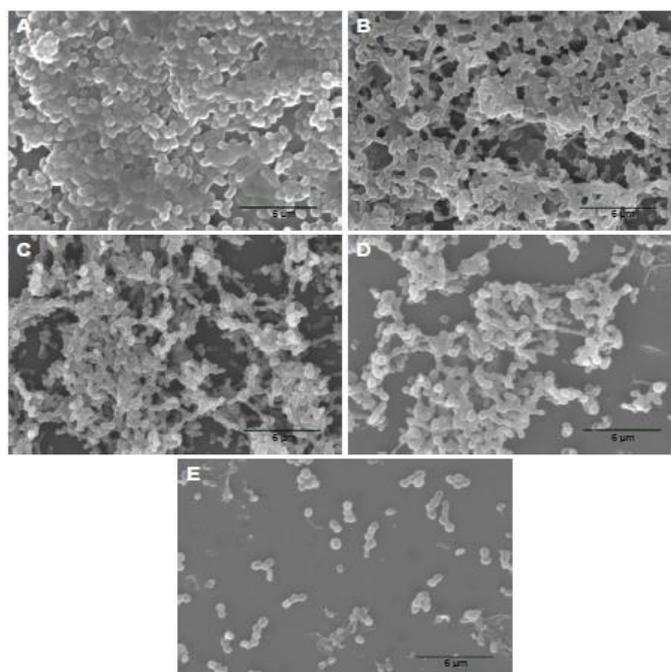


Figura 13. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de biopelículas de *Acinetobacter baumannii*. A) Control de biopelícula; B) microburbuja de ultrasonido; C) solución de polimixina B; D) liposoma cargado de polimixina B modificado con quitosano; E) microburbujas de ultrasonido y liposoma cargado de polimixina B modificado con quitosano. Tomado de Fu et al. (2019).

En estudios posteriores se verificará la toxicidad biológica de los LPC y se desarrollarán modelos animales de infección pulmonar de biopelícula de *Acinetobacter baumannii* o modelos animales con infecciones del tracto urinario e infecciones de la piel y tejidos blandos con el fin de evaluar si el efecto sinérgico de LPC junto a la aplicación de ultrasonidos puede mejorar el efecto antibacteriano de polimixina B y reducir su toxicidad para tratar las infecciones sistémicas o locales (Fu et al., 2019).

En estos últimos años, Yilin et al. (2017) llevaron a cabo un estudio que incorporaba lisozima (figura 14), enzima que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano.

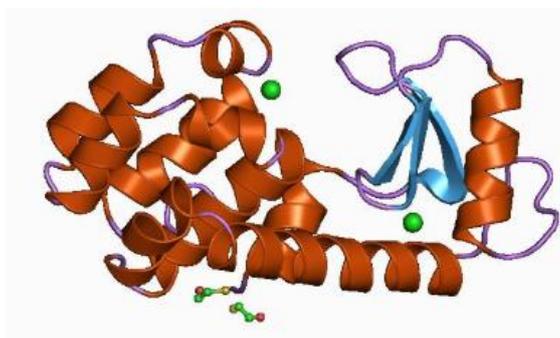


Figura 14. Representación gráfica de la estructura de lisozima (Fuente: Carrillo, 2013).

Esta enzima, que se encuentra cargada positivamente, se añadió, además, estabilizando liposomas de gentamicina cargados negativamente mediante interacción electrostática, en el tratamiento de la FQ. Estos autores encontraron que la gentamicina liposomada asociada a la lisozima (LLG) fue más efectiva para alterar las biopelículas preformadas, construidas a base de bacterias patógenas Gram negativas, que la lisozima o la gentamicina por sí solas. Como se muestra en la figura 15 (a y b), tanto la gentamicina como la lisozima solas ejercieron un efecto leve sobre la biomasa y las células vivas de biopelículas de *P. aeruginosa* tras 24h de tratamiento, en comparación con el grupo control. En cambio, el tratamiento con gentamicina liposomada asociada a lisozima (LLG) redujo notablemente tanto la masa de biopelícula como los recuentos de células viables. El estudio también se llevó a cabo utilizando biopelículas producidas por una especie bacteriana Grampositiva, *S. aureus* (figura 15c y d), obteniendo resultados similares al anterior.

Los resultados obtenidos se corroboraron mediante estudios de microscopía de fluorescencia, cuyas imágenes se recogen en la figura 16. En ella se muestran fotografías de biopelículas de *P. aeruginosa* (figura 16 a) y de *S. aureus* (figura 16 b) tras ser sometidas a la adición de una solución de gentamicina, lisozima y liposomas de gentamicina con lisozima (LLG). Se observó que las biopelículas tratadas con LLG exhibieron solo unas pocas colonias bacterianas aisladas en lugar de una estructura de biopelícula, como se pudo observar en el resto de imágenes, cuyas muestras fueron tratadas con gentamicina y lisozima.

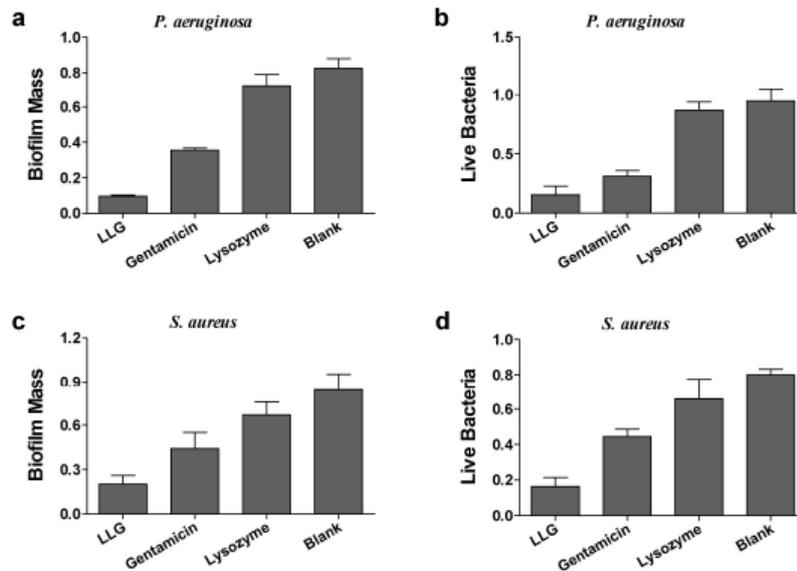


Figura 15. Efectos inhibitorios de LLG en la formación de biopelículas por *P. aeruginosa* (a, b) y *S. aureus* (c,d). Tomada de Yilin et al. (2017).

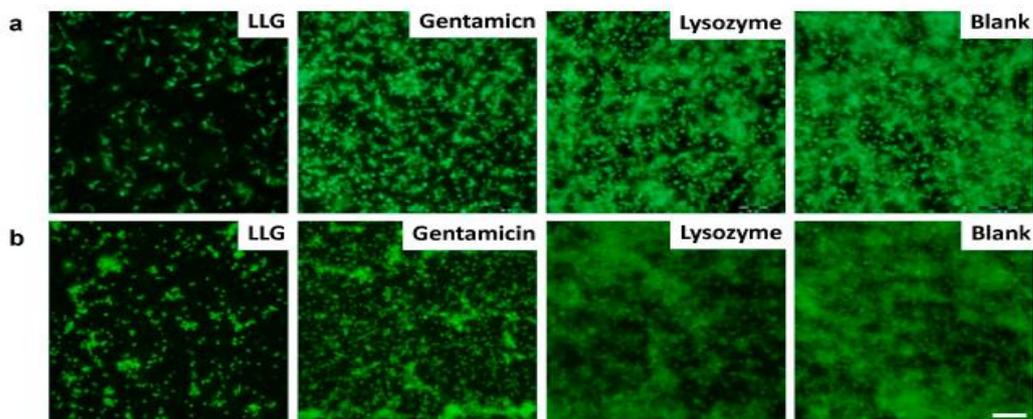


Figura 16. Microscopía de fluorescencia de biopelículas de *P. aeruginosa* (a) y *S. aureus* (b). Como control se utilizaron biopelículas incubadas con caldo de triptona-soja (TSB). Escala de la barra: 10 μ m. Tomada de Yilin et al. (2017).

Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) también se evaluaron los cambios en la morfología de la superficie de *P. aeruginosa* (patógeno en forma de varilla, figura 17 a) y *S. aureus* (patógeno de forma redonda, figura 17 b) cuando se trataron con las diferentes formulaciones. Mientras los grupos control mostraron una distribución altamente organizada y bien definida, en las biopelículas tratadas con LLG, las paredes celulares se arrugaron y dañaron, la forma y el tamaño de las células cambiaron drásticamente, y solo se observaron unas pocas células bacterianas dispersas. En general,

estos resultados indicaron claramente que LLG aportaban ventajas frente la resistencia bacteriana, debido a la alteración de las biopelículas existentes formadas por microorganismos Gram negativos y positivos.

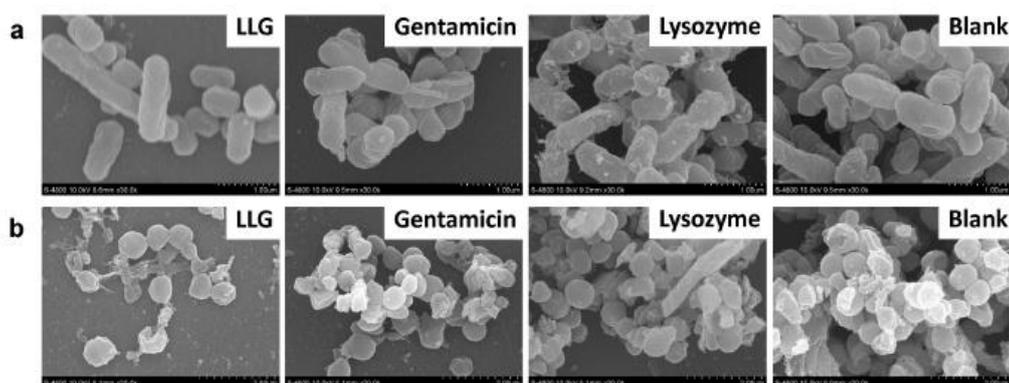


Figura 17. Microscopía electrónica de barrido del *biofilm* de *P. aeruginosa* (a) y *S. aureus* (b). Las biopelículas incubadas con TSB se usaron como control. Escala de la barra: 1 µm. Tomada de Yilin et al. (2017).

El desafío de eliminar infecciones provocadas por *P. aeruginosa*, como en el caso de la FQ, permanece sin demasiados cambios debido fundamentalmente al rápido desarrollo de la resistencia a los antibióticos. Se ha demostrado que la escasa penetración de fármacos en las densas biopelículas formadas juega un papel vital en el tratamiento efectivo de la infección (Yilin et al., 2017). Por tanto, la terapia antibiótica actual de biopelículas contra *P. aeruginosa* requiere la investigación de nuevas estrategias.

La resistencia a los antibióticos y la síntesis de varios factores de virulencia durante la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* está mediada principalmente por dos sistemas de detección de QS químicamente distintos: 1-acil-homoserina lactonas y 2- las 4-quinolonas. Entre todas las quinolonas, solo PQS (2-heptil-3- hidroxil-4-quinolona) se aísla en el líquido del lavado broncoalveolar en los pulmones con FQ, lo que sugiere la posible asociación de PQS con infecciones por *P. aeruginosa* y posterior daño inflamatorio a los tejidos respiratorios del huésped en pacientes con FQ. El papel de PQS en las biopelículas de *P. aeruginosa* es bien conocido: PQS mejora la formación de la biopelícula estimulando dos reguladores conocidos: RhIR/C4-HSL y RpoS (Diggle et al., 2003). Además, PQS regula la síntesis de ADN extracelular (ADNe), el cual actúa como

una interconexión célula–compuesto que mantiene predominantemente la estructura 3D y la arquitectura de la biopelícula (Whitchurch et al., 2002). Este ADNe también se aísla en concentraciones muy elevadas en muestras de esputo de pulmones con FQ (hasta 20 mg/mL), lo que sugiere la existencia de microcolonias ricas en ADNe de *P. aeruginosa* en los pulmones con FQ. Alarmantemente, biopelículas enriquecidas con ADNe mostraron hasta 640 veces más resistencia a los antibióticos que los cultivos planctónicos (Mulcahy et al., 2010). Por todo ello PQS se convierte en un objetivo clave para combatir este tipo de infecciones relacionadas con *P. aeruginosa*. En este sentido, Bandara et al. (2016) han propuesto la utilización de farnesol (figura 18), compuesto orgánico de origen natural que se encuentra presente en numerosos aceites esenciales de plantas, del que se ha demostrado que inhibe la síntesis de PQS (McAlester et al., 2008).

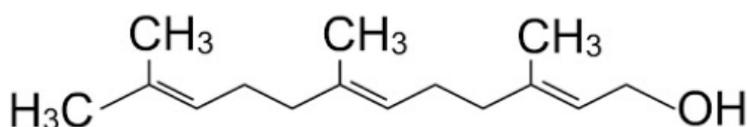


Figura 18. Estructura química del farnesol. Tomada de <http://www.plantasyhongos.es/glosario/sesquiterpenos.htm>

El estudio tuvo como objetivo formular liposomas encapsulando ciprofloxacino como antibiótico y modificar su superficie uniéndole farnesol natural, con el fin de erradicar la biopelícula de *P. aeruginosa*. De esta forma, se consiguió que dicha formulación disminuyera la CMI y CMB respecto a liposomas encapsulados únicamente con el antibiótico y una diferencia aún más drástica con respecto a la administración de ciprofloxacino libre. Los resultados para la CMI obtenidos fueron: ciprofloxacino liposomal combinado con farnesol 0.128 mg/mL, liposomas con ciprofloxacino solamente 1.31mg/mL y ciprofloxacino libre 16 mg/mL, favoreciéndose así la eliminación de la biopelícula. Hemos de destacar que los liposomas formulados estaban débilmente cargados positiva o negativamente y por ello favorecían así la interacción con la biopelícula y posterior penetración más eficazmente del fármaco comparado con el fármaco libre.

En los últimos años se está explorando la eficacia de la fluoroquinolona levofloxacino (LFX) en el tratamiento de infecciones bacterianas en pacientes con FQ (Purnima et al.,

2017). A pesar de los resultados alentadores iniciales, la solución de levofloxacino en aerosol no mostró ninguna mejora con respecto a la terapia estándar para la FQ (tobramicina inhalada) en los ensayos clínicos de fase III. Con el fin de mejorar la eficacia antibacteriana a nivel pulmonar, se propuso su encapsulación en liposomas modificados con serratiopeptidasa (SRP), la cual es una enzima proteolítica con antecedentes conocidos de actuar como un agente disruptor de la biopelícula (Purnima et al., 2017). En primer lugar, los resultados mostraron que la combinación de LFX y SRP fue más efectiva en la interrupción de la biopelícula de *S. aureus* que LFX solo. Además, se reveló que la combinación de polvo seco que contenía LFX liposomal combinado con SRP para la terapia inhalatoria tras la administración intratraqueal en ratas, desempeña un papel vital en la erradicación de la biopelícula, mejorando así la resistencia y eficacia antibiótica, en ratas infectadas por *S. aureus*. Cuando se combinaron ambos compuestos en una misma formulación liposomal, se proporcionó una carga de fármaco importante a nivel intracelular en el lugar de la infección en el que SRP actúa al romper la capa de biopelícula. Como resultado de ello, se sugiere la actividad antimicrobiana y *antibiofilm* sinérgicas de LFX en combinación con SRP contra *S.aureus*, según lo avalaron los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del estudio.

Otra estrategia de modificar la superficie de los liposomas consiste en la unión mediante enlaces covalentes de compuestos a nivel superficial de los liposomas.

En esta línea, son interesantes las aportaciones de Brenner (2017) quien llevó a cabo la unión covalente de anticuerpos a la superficie de liposomas con el fin de obtener inmunoliposomas. El desarrollo de estas uniones covalentes se apoyó en investigaciones previas llevadas a cabo por Robinson et al. (2000) con la lectina, proteína ampliamente utilizada para funcionalizar estas vesículas lipídicas. A modo de información general, se detallan las etapas fundamentales del mecanismo de unión de ambas estructuras:

1. En la preparación de liposomas se incorpora un lípido reactivo, por ejemplo, el derivado m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida (MBS) de dipalmitilfosfatidiletanolamina (DPPE-MBS).
2. Derivatización del anticuerpo con N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) para generar grupos -SH libres.

3. Conjugación del anticuerpo derivatizado con el liposoma. La conjugación se produce por reacción de los grupos -SH libres en el anticuerpo y el maleimido del grupo DPPE-MBS.

Este método descrito se puede adaptar a la unión de cualquier proteína a la superficie del liposoma. SATA reacciona con los grupos amino terminales en los residuos de lisina, de modo que el número de sitios potenciales para la derivatización variará de una proteína a otra. En principio, solo se requiere un residuo de lisina para la derivatización y la posterior conjugación. El número de moléculas de anticuerpos por liposoma de 100 nm de diámetro que incorporan 16% en moles de DPPE-MBS, es de aproximadamente 25.

Este tipo de formulaciones se presentó como estrategia para facilitar la focalización de los liposomas al lugar de acción, permitiendo así erradicar más fácilmente la infección bacteriana. En esta línea se han llevado a cabo estudios para mejorar la mortalidad en el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Hasta el momento no existe ningún fármaco aprobado para tratar esta patología, y ello puede ser debido a tres causas fundamentalmente: (1) los pacientes con SDRA son frágiles a causa de la disfunción orgánica múltiple simultánea, por lo que no toleran bien los efectos secundarios de los medicamentos; (2) la administración de medicamentos inhalados se ve impedida por la columna de líquido de naturaleza proteica que cubre los alvéolos lesionados; y (3) SDRA es heterogénea en su fisiopatología subyacente, por lo que es poco probable focalizar hacia una única diana que mejore la mayoría de los pacientes.

Para hacer frente a esta situación, se han desarrollado liposomas dirigidos al endotelio pulmonar (LEP), como se recoge en los estudios de Brenner (2017). Estos liposomas, de aproximadamente de 100 nm, están recubiertos con anticuerpos que se unen al endotelio capilar pulmonar de manera que, tras su administración por vía intravenosa, hacen que el fármaco se concentre predominantemente en los alvéolos (figura 19).

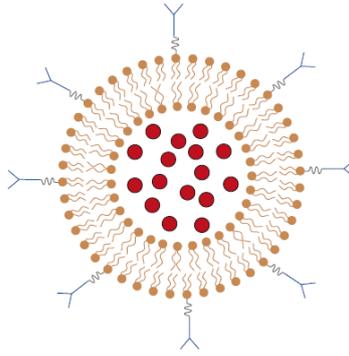


Figura 19. Liposomas funcionalizados con anticuerpos dirigidos hacia el endotelio pulmonar (LEP). LEP se componen de liposomas (bicapas de fosfolípidos de diámetro aproximadamente 100 nm; marrón), fármacos cargados (círculos rojos) y anticuerpos (azul, con formas de Y). Tomada de Brenner (2017).

Esta hipótesis se ha probado tanto en modelos animales sanos como en modelos animales que presentan patología grave y espacialmente heterogénea similar al SDRA severo. Al concentrar los fármacos en el fluido de los alveolos, LEP resolvería el reto farmacológico (1). Además, al administrarse por vía intravenosa, resuelven el desafío (2). Finalmente, como los LEP pueden cargarse con varios fármacos, se podría solucionar el tercer y último reto anteriormente presentado, con la terapia combinada.

Las infecciones del tracto respiratorio pueden tratarse eficazmente manteniendo concentraciones elevadas de fármaco en los pulmones cuando se administran por vía pulmonar. Son ya varios estudios los que han demostrado que los antibióticos pueden administrarse de manera segura por inhalación, ya sea en forma de polvo seco (Traini y Young, 2009) o utilizando nebulizadores. La nebulización sigue siendo una opción terapéutica interesante en el tratamiento de patologías respiratorias en pacientes hospitalizados en los que su cooperación en el uso del dispositivo de inhalación puede ser limitada (Purnima et al., 2017). Los sistemas liposomales de antibióticos cuando se administran por vía pulmonar tienen el potencial de proporcionar un mayor tiempo de retención del antibiótico a nivel pulmonar.

Hace unos 20 años, Vladimir Muzykantov descubrió que el recubrimiento de sistemas nanoparticulares con anticuerpos dirigidos contra epítomos endoteliales (por ejemplo, moléculas de adhesión plaqueto-endoteliales (PECAM)) favorecía la acumulación de estos nanotransportadores en los pulmones (Muzykantov et al., 1999). Recientemente se ha demostrado en estudios llevado a cabo por Brenner en 2017, que los LEP dirigidos con

PECAM se acumulan en los pulmones de ratones en unos niveles 300 veces superior a los liposomas sin funcionalizar y al fármaco libre. Además, como se mencionó anteriormente, los LEP parecen concentrarse en los alveolos, superando así los problemas farmacológicos por los que se veía afectado el SDRA.

Curiosamente, la adición de 1.6% en moles de lípidos-PEG produjo un potencial zeta próximo a cero. Sin embargo, las dispersiones de liposomas que contienen PEG-lípidos se describieron como estables (Kataria et al., 2011), presumiblemente debido a la estabilización y repulsión estérica.

4.2.5. Formulaciones comercializadas de liposomas

El defecto genético que caracteriza a la FQ origina en los pacientes una mucosidad espesa que se acumula en los pulmones y que favorece el crecimiento de microorganismos, como *P. aeruginosa*. Esta bacteria forma una biopelícula en el pulmón, que dificulta la penetración del sistema inmunitario y de los antibióticos, como se representa esquemáticamente en la figura 20.

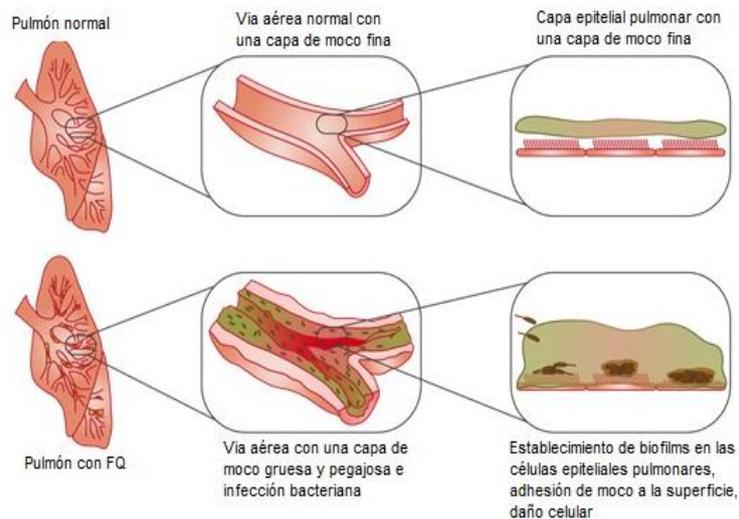


Figura 20. Representación esquemática de un pulmón con FQ. En un pulmón normal, las células epiteliales de las vías aéreas están recubiertas con una fina capa de moco, mientras que en un pulmón con FQ estas células están recubiertas de un moco denso y pegajoso que incluye un *biofilm* de bacterias, lo que promueve daño celular y problemas respiratorios. Tomada de Hollmann Perkins (2017).

En el tratamiento de esta patología se han venido proponiendo interesantes estrategias. Entre ellas, el uso de nanosistemas como los liposomas podría ser una alternativa válida para superar la gruesa capa de moco que se forma en el interior de la región alveolar, así como la biopelícula bacteriana (Ong et al., 2019).

En 2008, Meers et al. (2008) desarrollaron una formulación liposomal de amikacina inhalada (Arikace[®]), de la que se destacaron las siguientes características:

- Estabilidad liposomal. La formulación liposomal de amikacina se puede administrar como una solución nebulizada, reteniendo el fármaco en los liposomas y demostrando un mecanismo de liberación sostenida en pulmones normales no infectados.
- Penetración del liposoma. Los liposomas, de tamaño homogéneo, pueden penetrar en el esputo y el *biofilm*, lo que sugiere su capacidad para acceder a sitios de infección en los pulmones de pacientes con FQ.
- Liberación del fármaco. Se ha identificado un posible mecanismo de liberación de amikacina mediado por factores de virulencia bacteriana, pudiendo los ramnolípidos desempeñar un papel prominente.
- Eficacia. La inhalación de amikacina liposómica nebulizada en esta forma resulta significativamente más eficaz en la reducción de la carga bacteriana en un modelo de infección crónica por *P. aeruginosa* crónica que una dosis similar de amikacina libre, posiblemente como resultado de la liberación mediada por factores asociados con la infección bacteriana.

Arikace[®] se presenta como una formulación de liposomas de amikacina, fármaco aminoglucósido empleado en el tratamiento de infecciones provocadas por *P. aeruginosa* en la FQ. Esta formulación encapsula amikacina en el compartimento acuoso de liposomas neutros compuestos de DPPC y colesterol.

Posteriormente al desarrollo de dicha formulación, ya en 2015 Ehnsa y Clancy, propusieron que estos liposomas, cuya composición se asemeja a la del surfactante natural, actúan protegiendo a la amikacina, cargada positivamente, de las mucinas polianiónicas que son características del esputo de la FQ. Debido a su tamaño uniforme (300 nm aprox.), se ha demostrado que los liposomas penetran en la matriz del esputo, en el cual son retenidos y posteriormente lisados por los ramnolípidos de *P. aeruginosa*. Esta acción de lisis hace que el fármaco se libere en el sitio donde se encuentran las bacterias.

Los datos farmacocinéticos concluyeron que los liposomas desarrollados poseían una vida media pulmonar prolongada (varias horas) en relación con el antibiótico libre, lo que permite reducir la frecuencia de dosificación a una vez al día y la acumulación del fármaco en la vía aérea inferior.

Estudios realizados en un modelo preclínico de ratas con infección pulmonar por *P. aeruginosa* demostraron que, si bien los liposomas de amikacina pueden acumularse en los macrófagos alveolares, dicho efecto no se asoció con defectos de los macrófagos en la señalización de citocinas o la función de eliminación de patógenos, lo que apunta hacia el uso potencial de estos sistemas para tratar patógenos intracelulares, como infecciones por micobacterias no tuberculosas en pacientes con y sin FQ.

Los estudios clínicos en fase III indicaron que hubo una mejora significativa en los síntomas respiratorios informados por los pacientes asociados con el tratamiento de los liposomas de amikacina, de forma que el 67% de los sujetos que estaban en el grupo de dosis altas de la formulación (560 mg) informó síntomas respiratorios mejorados en comparación con el 36% de los sujetos tratados con placebo ($p < 0.01$). Hubo una reducción rápida y sostenida en densidad de *P. aeruginosa* proveniente del esputo en los grupos de dosis más alta. En comparación con los medicamentos que están aprobados o en desarrollo, esta formulación constituye una terapia potencial única para su uso en pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* por numerosas razones (Ehsan y Clancy, 2015).

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) causan infecciones pulmonares en pacientes con daño pulmonar estructural, inmunidad deteriorada u otros factores de riesgo. La administración de antibióticos a los lugares específicos de estas infecciones constituye un obstáculo importante de la terapia porque las infecciones pulmonares por MNT pueden persistir en forma de biopelículas o como infecciones intracelulares dentro de los macrófagos. Los tratamientos inhalados pueden mejorar el acceso de los antibióticos a los pulmones, pero conseguir su distribución a través de los pulmones y posibilitar la penetración en biopelículas y macrófagos se convierten en desafíos importantes a estudiar. Por ello, Zhang et al. (2018) desarrollaron una dispersión liposomal de amikacina para inhalación (ALIS) y descubrieron que esta formulación penetró de manera eficaz a través de las biopelículas de MNT, reduciendo el número de micobacterias viables de una forma concentración-dependiente. Además, los autores encontraron que la

captación de amikacina por los macrófagos se incrementó al menos 4 veces en la formulación liposomal comparado con el fármaco libre, a la vez que se retuvo más amikacina a las 24 h en las vías respiratorias y el tejido pulmonar en relación con la amikacina libre inhalada (Zhang et al., 2018). Estos datos demuestran que los liposomas penetraron eficazmente las biopelículas de MNT, mejorando la internalización de amikacina en los macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y reteniendo el fármaco en el interior de las vías respiratorias y el tejido pulmonar. Este estudio, que se encuentra en estudios clínicos de fase III representa un nuevo enfoque de tratamiento prometedor para pacientes con enfermedad pulmonar refractaria por MNT.

Una vez inhalado, ALIS debe dispersarse en los pulmones y penetrar a través de la mucosidad para llegar a las áreas infectadas. Los macrófagos pulmonares de ratas a las que se les administró ALIS mostraron niveles de amikacina de 5 a 8 veces más altos en comparación con las células de animales que recibieron amikacina libre en dosis bajas, aunque la dosis depositada inmediatamente tras la nebulización no fue significativamente diferente entre los grupos. Además, el grupo ALIS exhibió concentraciones de amikacina significativamente más altas en el líquido de lavado broncoalveolar y el tejido pulmonar en relación con el grupo de dosis bajas de amikacina. Estos resultados muestran que la formulación de ALIS retiene la amikacina dentro de los macrófagos, las vías respiratorias y el tejido pulmonar significativamente mejor que la amikacina libre, favoreciendo por tanto la erradicación de la biopelícula (Zhang et al., 2018).

Por todo ello, la nanomedicina representa una oportunidad extraordinaria para la mejora de las terapias actuales y para el desarrollo de opciones de tratamiento innovadoras para la FQ. La gran cantidad de investigación sobre el desarrollo de nanopartículas como nanoportadores para la vehiculización de genes y fármacos directamente a los pulmones por inhalación tiene la oportunidad de modificar los tratamientos sintomáticos para pacientes con FQ, así como aquellos basados en moduladores de CFTR y terapia génica. Debido al entorno peculiar en el que deben operar las terapias, que se caracteriza la existencia de barreras biológicas (tracto pulmonar, moco, epitelios, biopelícula bacteriana), el uso de nanotecnologías para mejorar la administración de medicamentos o terapias genéticas parece ser formas extremadamente prometedoras. Sin embargo, aunque varios nanosistemas ya fueron probados con resultados exitosos con medicamentos aprobados por la FDA, aún queda mucho por explorar (Di Mauro et al., 2016; Miragoli et al., 2018).

5. CONCLUSIONES

1. Con el fin de solventar la barrera de difusión tanto química como física que supone la matriz de exopolisacáridos a la penetración de antimicrobianos, se ha demostrado que mediante la encapsulación en liposomas con carga opuesta a la superficie de las bacterias, se protege al fármaco de posibles interacciones químicas y electrostáticas que impiden la penetración del fármaco en la biopelícula.
2. Los Fluidosomas consiguen erradicar completamente la biopelícula aumentando la persistencia y favoreciendo la liberación del fármaco contenido en su interior, gracias a su fluidez de membrana.
3. Tanto la modificación como la adición de agentes externos a la vesícula liposomal, además de estabilizar las formulaciones, se ha comprobado que suprimen señales que inactivan a los antimicrobianos, disminuyendo las CMI de los antimicrobianos encapsulados en liposomas frente a los antimicrobianos libres. Tanto es así que favorecen la interacción generalmente electrostática de la formulación con las bacterias que forman parte de la biopelícula y permiten una mayor eficacia y efectividad frente a dichas bacterias que forman parte de los *biofilms*.
4. A nivel pulmonar, se ha demostrado que los liposomas proporcionan una liberación sostenida con el tiempo, lo cual prolonga los niveles terapéuticos locales y sistémicos, evitando la irritación pulmonar y los efectos adversos asociados a dichas antibioterapias.
5. Todos estos hechos generalmente favorecen la disminución de la resistencia a los antibióticos que frecuentemente se están generando.

6. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed K, Muiruri PW, Jones GH, Scott MJ, Jones MN. The effect of grafted poly (ethyleneglycol) on the electrophoretic properties of phospholipid liposomes and their adsorption on bacterial biofilms. *Colloids Surf. A*. 2001; 194: 287–296.

Albayaty YN, Thomas N, Hasan S, and Prestidge CA. Penetration of topically used antimicrobials through *Staphylococcus aureus* biofilms: a comparative study using different models. *J. Drug Del. Sci. Technol.* 2018; 48: 429–436.

Alhariri M, Majrashi MA, Bahkali AH, Almajed FS, Azghani AO, Khiyami MA, et al. Efficacy of neutral and negatively charged liposome-loaded gentamicin on planktonic bacteria and biofilm communities. *Int. J. Nanomedicine*. 2017; 12: 6949–6961.

Alipour M, Suntres ZE, Halwani M, Azghani AO, Omri A. Activity and interactions of liposomal antibiotics in presence of polyanions and sputum of patients with cystic fibrosis. *PLoS One*. 2009; 4 (5): 1-9.

Anderson M and Omri A. The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Deliv*. 2004; 11(1): 33–39.

Bandara HM, Herpin MJ, Kolacny D, Harb A, Romanovicz D, Smyth HD. C. Incorporation of Farnesol significantly increases the efficacy of liposomal ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro. *Mol. Pharmaceutics*. 2016; 13: 2760–2770.

Beaulac C, Clement-Major S, Hawari J y Lagace J. Eradication of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrobial Agents And Chemotherap*. 1996: 665–669

Beaulac C, Sachetelli S, Lagace J. Aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin as a dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Drug Target*. 1993; 7: 33–41.

Beaulac C, Sachetelli S, Lagace J. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41(1): 35–41.

Bielen K, Jongers B, Boddaert J, Lammens C, Jorens PG, Malhotra-Kumar S, et al. Mechanical ventilation causes IL-4 mediated immunosuppression in a rodent model of mechanical ventilation and VAP. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID. 2018: P0611.

Brenner JS. Nanomedicine for the Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Annals ATS*. 2017; 14(4): 561-564.

Carrillo W. Lysozyme: Antibacterial activity and allergenicity. *Actual. nutr*. 2013; 14(4).

Chang HI, Yang, MS, and Liang M. The synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized polys (2, 6-dimethyl-1,4-phenyleneoxide) modified with ammonium and phosphonium salts. *React. Funct. Polym*. 2010; 70: 944–950.

Clancy JP, Dupont L, Konstan MW, Billings J, Fustik S, Goss C., et al. Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax*. 2013; 68: 818–825.

Costerton W, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003; 112(10): 1466-1477.

Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C and Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest*. 2003; 112: 1466–1477.

Di Mauro V, Iafisco M, Salvarani N, et al. Bioinspired negatively charged calcium phosphate nanocarriers for cardiac delivery of Micro RNAs. *Nanomedicine (Lond)*. 2016; 11(8): 891-906.

Dias-Souza MV, Soares DL, dos Santos VL. Comparative study of free and liposome-entrapped chloramphenicol against biofilms of potentially pathogenic bacteria isolated from cooling towers. *Saudi Pharm J*. 2017; 25:999–1004.

Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*- dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol*. 2003; 50 (1): 29–43.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 15, 167–193.

Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Gubernator J, Gula G, Bocer T, Doroszkiewicz W. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* cells and cationic PC:Chol:DOTAP liposomal vesicles versus outer-membrane structure and envelope properties of bacterial cell. *Int. J. Pharm.* 2009; 367: 211–219.

Ehsan Z and Clancy JP. Management of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients using inhaled antibiotics with a focus on nebulized liposomal amikacin. *Future Microbiol.* 2015; 10(12): 1901–1912.

Epstein AK, Pokroy B, Seminara A, Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(3): 995–1000.

Feldman C, Kassel M, Cantrell J, et al. The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J.* 1999; 13: 546–51.

Forier K, Raemdonck K, De Smedt SC, Demeester J, Coenye T, Braeckmans K. Lipid and polymer nano particles for drug delivery to bacterial biofilms. *J. Controlled Release.* 2014; 190: 607–623.

Frézard F, Santos RAS, Fontes MA. Liposome-encapsulated neuropeptides for site-specific microinjection. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.).* 2011; 789: 343–355.

Fu Y, Zhang L, Yang Y, Liu CW, He CY, Li P, Xian Yu. Synergistic antibacterial effect of ultra sound microbubbles combined with chitosan-modified polymyxin B-loaded liposomes on biofilm-producing *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Nanomedicine.* 2019; 14: 1805–1815.

Ghattas D and Leroux JC. Amphiphilic ionizable polyphosphazenes for the preparation of pH-responsive liposomes. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2009: 227–247.

Ghosh P, Mondal J, Ben-Jacob E, Levine H. Mechanically-driven phase separation in a growing bacterial colony. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112 (17): 2166–2173.

Gomes-Fernandes M, Laabei M, Pagan N, Hidalgo J, Molinos S, Villar-Hernandez R, Domínguez-Villanueva D, Jenkins AT, Lacoma A, Prat C. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. PLoS One. 2017; 12(4): e0175552.

Gottenbos B, Grijpma DW, Van der Mei HC, Feijen J and Busscher HJ. Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering gram-positive and gram-negative bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 2001; 48: 7–13.

Grit M and Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. Chem. Phys. Lipids. 1993; 64: 3–18.

Gubernator J, Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W, Kozubek A. In vitro antimicrobial activity of liposomes containing ciprofloxacin, meropenem and gentamicin against gram-negative clinical bacterial strains. Lett. Drug Des. Discov. 2007; 4: 297–304.

Guerra-Morillo MO, Rabasco-Álvarez AM, González-Rodríguez ML. Cystic Fibrosis: actual treatment and future perspectives with nanotechnology. Ars Pharm. 2020; 61(2): 81-96.

Günday TN, Türeli AE and Schneider M. Inhalable antibiotic nanoformulations for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Curr. Drug Deliv. 2014; 4(3):193 – 207.

Günday TN, Türeli AE, Schneider M. Inhalable antibiotic nanoformulations against *P. aeruginosa*, Drug Deliv. Lett. 2014: <http://dx.doi.org/10.2174/2210303104666140222002101>.

Habimana O, Steenkeste K, Fontaine-Aupart MP, Bellon-Fontaine MN, Kulakauskas S, et al. La difusión de nanopartículas en biopelículas se ve alterada por la hidrofobia de la pared celular bacteriana. Appl Environ Microbiol. 2011; 77: 367–368.

Hadinoto K and Cheow WS. Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against; *Pseudomonas aeruginosa*. Colloid Surf. B-Biointerfaces. 2014; 116: 772–785.

- Halwani M, Yebio B, Suntres ZE, Alipour M, Azghani AO, Omri A. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(6): 1291–1297.
- Hamal P, Nguyenhuu H, Don SV, Kumal RR, Kumar R, McCarley RL, et al. Molecular adsorption and transport at liposome surfaces studied by molecular dynamics simulations and second harmonic generation spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*. 2019; 123: 7722–7730.
- Hernández-Caselles T, Villalain J, Gómez-Fernández JC. Influencia de la carga de liposomas y la composición en su interacción con las proteínas del suero sanguíneo humano. *Mol Cell Biochem*. 1993; 120 (2): 119-126.
- Hoiby NO, Ciofu and Bjarnsholt T. *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm in cystic fibrosis. *Future Microbiol*. 2010; 5 (11): 1663-1674.
- Hollmann B, y Perkins, M. Centro de Ciencias Biomoleculares Dean Walsh, Universidad de Nottingham. 2017.
- Hu H, Zhou Z, Xu Q, Fan C, Wang L, Ren H, et al. A novel pH-responsive quaternary ammonium chitosan-liposome nanoparticles for periodontal treatment. *Int. J. Biol. Macromol*. 2019; 129: 1113–1119.
- Ingebrigtsen SG, Škalko-Basnet N, Holsæter AM. Development and optimization of a new processing approach for manufacturing topical liposomes-in-hydrogel drug formulations by dual asymmetric centrifugation. *Industr. Pharm. Drug Develop*. 2015; 42 (9): 1-33.
- Jardeleza C, Rao S, Thierry B, Gajjar P, Vreugde S, Prestidge CA, et al. Liposome-Encapsulated ISMN: A Novel nitric oxide-based therapeutic agent against *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS One*. 2014; 9: 1-9.
- Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y, Yu W. Antibiofilm activity of anexo polysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One*. 2011; 6 (4): e18514.
- Joshi M and Misra, AN. Pulmonary disposition of budesonide from liposomal dry powder inhaler. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*. 2001; 23: 531–536.

Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Executive Summary: Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016. *Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2016; 63(5): 575-582.

Kamaly N, Xiao Z, Valencia P.M, Radovic-Moreno AF and Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 2971–3010.

Kaszuba M, Corbett J, Watson FM and Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos. Trans. R. Soc. A.* 2010; 368: 4439–4451.

Kaszuba M, Lyle IG and Jones MN. The targeting of lectin bearing liposomes to skin-associated bacteria. *Colloids Surf. B.* 1995; 4: 151–158.

Kataria S, Sandhu P, Bilandi A, Middha A, and Kapoor B. Stealth liposomes: a review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 2011; 2: 1534–1538.

Kim HJ, Gias ELM, Jones MN, The adsorption of cationic liposomes to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 1999; 149: 561–570.

Knodler LA, Celli J and Finlay BB. Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 578–588.

Kumar S, He G, Kakarla P, Shrestha U, Ranjana KC, Ranaweera I, et al. Bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily as targets for modulation. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2016; 16: 28–43.

Lasa I, del Pozo JL, Penaldés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005; 28 (2): 163-175.

Lechuga LM. *Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud.* 9ª edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana. 2001: 99-112

Liu Y, Shi L, Su L, Van der Mei HC, Jutte PC, Ren Y, et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm infection control. *Chem. Soc. Rev.* 2019; 48: 428–446.

- Lu G, Wu D and Fu R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React. Funct. Polym.* 2007; 67: 355–366.
- Lu MM, Ge Y, Qiu J, Shao D, Zhang Y, Bai J, et al. Redox/Ph dual-controlled release of chlorhexidine and silver ions from biodegradable mesoporous silica nanoparticles against oral biofilms. *Int. J. Nanomed.* 2018; 13: 7697–7709.
- Mah TFC and O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 34–39.
- Makhathin SS, Kalhapure RS, Jadhav M, Waddad AY, Gannimani R, Omolo CA, et al. Novel two-chain fatty acid-based lipids for development of vancomycin pH-responsive liposomes against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Drug Target.* 2019; 27: 1094–1107.
- Malcolm NJ. Use of liposome to deliver bactericides to bacterial biofilms. *Meth. Enzymol.* 2005; 391 (13): 211-228.
- Manaia EB, Abuçafy MP, Chiari-Andréo BG, Silva BL, Oshiro-Júnior JA and Chiavacci L. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int. J. Nanomed.* 2017; 12: 4991–5011.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C and Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 519–531.
- Martin C, Low WL, Gupta A, Amin MC, Radecka I, Britland ST, et al. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. *Curr. Pharm. Des.* 2015; 21: 43–66.
- Matl FD, Obermeier A, Zlotnyk J, Friess W, Stemberger A, Burgkart R. Augmentation of antibiotic activity by low-frequency electric and electromagnetic fields examining *Staphylococcus aureus* in broth media. *Bioelectromagnetics.* 2011; 32: 367–377.
- McAlester G, O’Gara F, Morrissey JP. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57: 563–569.
- Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto AW, Sardaryan G, Kurumunda R, 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: 859-868.

Melo JT, Fernández PV. Fibrosis quística en el adulto. *Rev. Med. Clin. Condes.* 2015; 26(3): 276-28.

Messiaen AS, Forier K, Nelis H, Braeckmans K, Coenye T. Transport of nanoparticles and tobramycin-loaded liposomes in *Burkholderia cepacia* complex biofilms. *PLoS One.* 2013; 8(11): e79220.

Miragoli M, Ceriotti P, Iafisco M, Vacchiano M, Salvarani N, Alogna A, et al. Inhalation of peptide-loaded nanoparticles improves heart failure. *Sci. Transl. Med.* 2018; 10: ean6205. doi: 10.1126/scitranslmed.aan6205

Mugabe C, Azghani A O, Omri A. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *JAC.* 2005; 55: 269–271.

Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 2010; 192 (23): 6191–6199.

Muzykantov VR, Christofilidou M, Balyasnikova I, Harshaw DW, Schultz L, Fisher AB, Albelda SM. Streptavidin facilita la internalización y la dirección pulmonar de un anticuerpo anti-células endoteliales (plaqueta endotelial molécula de adhesión celular 1): una estrategia para immunotargeting vascular de las drogas. *Proc. Natl Acad Sci EE.UU.* 1999; 96: 2379 - 2384.

Nazar J.C. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 2007; 67: 61-72.

Nederberg F, Zhang Y, Tan JP, Xu K, Wang H, Yang C, et al. Biodegradable nanostructures with selective lysis of microbial membranes. *Nat. Chem.* 2011; 3: 409–414.

Ng VWL, Ke X, Lee ALZ, Hedrick JL and Yang, Y. Y. Synergistic co-delivery of membrane-disrupting polymers with commercial antibiotics against highly opportunistic bacteria. *Adv. Mater.* 2013; 25: 6730–6736.

Nguyen S, Hiorth M, Rykke M and Smistad G. Polymer coated liposomes for dental drug delivery – Interactions with parotid saliva and dental enamel. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013; 50: 78–85.

Ong V, Mei V, Cao L, Lee K and Chung EJ. Nanomedicine for cystic fibrosis. *SLAS Technol.* 2019; 24: 169–180.

Piozzi A, Francolini I, Occhiaperti L, Venditti M, Marconi W. Antimicrobial activity of polyurethane coated with antibiotics: A new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *Int. J. Pharm.* 2004; 280: 173–183.

Popa A, Davidescu CM, Trif R, Ilia G, Iliescu S and Dehelean G. Study of quaternary onium salts grafted on polymers: antibacterial activity of quaternary phosphonium salts grafted on ‘geltype’ styrene-divinylbenzene copolymers. *React. Funct. Polym.* 2003; 55: 151–158.

Purnima V, Gupta-Abhijit M, Belubbi NT and Nagarsenker MS, Pulmonary delivery of synergistic combination of fluoroquinolone antibiotic complemented with proteolytic enzyme: A novel antimicrobial and antibiofilm strategy. *Nanomedicine.* 2017; 13: 2371–2384.

Ramadan HH, Sanclement JA and Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Oper Tech Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132: 414-417.

Rasmussen TB and Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296: 149–161.

Robinson AM, Creeth JE and Jones MN. The use of immunoliposomes for specific delivery of antimicrobial agents to oral bacteria immobilized on polystyrene. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2000; 11: 1381–1393.

Robinson AM, Creeth JE and Jones MN. The specificity and affinity of immunoliposome targeting to oral bacteria. *BBA-Biomembranes.* 1998; 1369: 278–286.

Robinson AM, Creeth JE and Jones MN. The use of immunoliposomes for specific delivery of antimicrobial agents to oral bacteria immobilized on polystyrene. *Biomater. Sci.* 2000; 11: 1381–1393.

Rodríguez-Hamamura N, Valderrama-Negrón A, Alarcón-Cavero H, López-Milla A. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev Soc Quím Perú*. 2010; 76 (4):336-354.

Rukavina Z y Vani Z. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics*. 2016; 8 (18): 1-26.

Rushmi ZT, Akter N, Mow RJ, Afroz M, Kazi M, Matas M, Rahman M and Shariare MH. The impact of formulation attributes and process parameters on black seed oil loaded liposomes and their performance in animal models of analgesia. *Saudi Pharm. J*. 2017; 25: 404–412.

Saucedo-Pereyra L. Nanovehículos para el tratamiento de la infección bacteriana II. Trabajo fin de grado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2017: 1-20.

Scott C and Manning SC. Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J*. 2003; 82 (suppl): 18-20.

Scriboni AB, Couto VM, de Moraes Ribeiro LN, Freires IA, Groppo FC, de Paula E, et al. Fusogenic liposomes increase the antimicrobial activity of vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm. *Front. Pharmacol*. 2019; 10(1401): 1-11.

Solleti VS, Alhariri M, Halwani M, Omri A. Antimicrobial properties of liposomal azithromycin for *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(3): 784–796.

Stewart PS and Franklin MJ. Heterogeneidad fisiológica en biopelículas. *Nat. Rev. Microbiol*. 2008; 6: 199-210.

Sun FJ, Qu F, Ling Y, Mao PY, Xia PY, Chen HP, et al. Biofilm-associated infections: Antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiol*. 2013; 8: 877–886.

Sutherland IW. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 222–227.

Tang H, Xu Y, Zheng T, Li G, You Y, Jiang M, et al. Treatment of osteomyelitis by liposomal gentamicin-impregnated calcium sulfate. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2009; 129: 1301–1308.

Thomas JG and Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(suppl): 10S-15S.

Traini D and Young PM. Delivery of antibiotics to the respiratory tract: an update. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009; 6: 897-905.

Van Leewenhoek, A. An abstract of a letter from Mr. Anthony Leevvenhoeck at Delft, dated Sep. 17. 1683. Containing some microscopical observations, about animals in the scurf of the teeth, the substance call'd worms in the nose, the cuticula consisting of scales. *Philos. Trans.* 1684; 14: 568–574.

Vasudevan R. Biofilms: Microbial cities ods cientific significance. *J Microbiol Exp.* 2014; 1(3): 84–98.

Velino C, Carella F, Adamiano A, Sanguinetti M, Vitali A, Catalucci D, et al. Nanomedicine approaches for the pulmonary treatment of cystic fibrosis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019; 7(406): 1-22.

Vila-Caballer M, Codolo G, Munari F, Malfanti A, Fassan M, Ruggie M, et al. A pH-sensitive stearyl-PEG-poly (methacryloyl sulfadimethoxine) decorated liposome system for protein delivery: an application for bladdercancer treatment. *J. Control. Rel.* 2016; 238: 31–42.

Wang D-Y, van der Mei HC, Ren Y, Busscher HJ and Shi L. Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections. *Front. Chem.* 2020; 7: 872.

Wang Y, Eldridge N, Metersky ML, Verzier NR, Meehan TP, Pandolfi MM, et al. National trends in patient safety for four common conditions, 2005-2011. *The New England journal of medicine.* 2014; 370(4): 341-51.

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002; 295 (5559): 1487.

Wolfmeier H, Pletzer D, Mansour SC and Hancock REW. New perspectives in biofilm eradication. *ACS Infect. Dis.* 2018; 4: 93–106.

Yilin H, Zhaojie W, Peng Z, Hu B, Yuelin S, Jinyou D et al. Lysozyme associated liposomal gentamicin inhibits. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(784): 1-8.

Zhang J, Leifer F, Rose S, Chun DY, Thaisz J, Herr T, Nashed M, Joseph J, Perkins WR and Di Petrillo K. Amikacin liposome inhalation suspension (ALIS) penetrates non-tuberculous mycobacterial biofilms and enhances amikacin uptake into macrophages. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 915.