

# NANOPARTÍCULAS BIO-INSPIRADAS

para el tratamiento de  
enfermedades infecciosas

Samuel Denche Mangas



Grado en Farmacia  
Facultad de Farmacia



UNIVERSIDAD  
DE SEVILLA  
1505



NANOPARTÍCULAS BIO-INSPIRADAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS

FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Samuel Denche Mangas



**NANOPARTÍCULAS BIO-INSPIRADAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE FARMACIA.

TRABAJO FIN DE GRADO. BIBLIOGRÁFICO.

GRADO EN FARMACIA

Samuel Denche Mangas

Sevilla, 21 de Julio. Facultad de Farmacia, Aula 1.1.

Departamento de Química Inorgánica

Prof. Dr. José Manuel Córdoba Gallego

# **NANOPARTÍCULAS BIO-INSPIRADAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Samuel Denche Mangas, Facultad de Farmacia, C/Prof. García González s/n.

Prof. Dr. José Manuel Córdoba Gallego.

Dpto. de Química Inorgánica, Facultad de Química, C/Prof. García González s/n.

## **RESUMEN**

Las nanopartículas suponen un nuevo avance en el tratamiento de enfermedades infecciosas, de especial importancia son aquellas que logran imitar las características de los microorganismos patógenos, ya que son las que mayor respuesta inmunológica generan, así como mayor efecto antimicrobiológico. Se han intentado reunir los aspectos clínicamente más interesantes de las nanopartículas, así como sus posibles aplicaciones y aplicabilidad fuera del laboratorio; con el objetivo de evitar y tratar una de las mayores causas de muerte y pérdida de calidad de vida del mundo: las enfermedades infecciosas. Se ha focalizado especialmente en las vacunas basadas en esta tecnología, ya que suponen uno de los mayores frentes para combatir este problema.

**Palabras clave:** Nanopartículas, biomiméticas, enfermedades infecciosas, vacunas.

# ÍNDICE

1. Introducción.
  - 1.1. ¿Qué son las Enfermedades infecciosas?
  - 1.2. Nanotecnología: la nueva aliada de la medicina.
  - 1.3. Las nanopartículas con actividad antimicrobiana.
2. Objetivos.
3. Metodología.
4. Resultados y discusión.
  - 4.1. Vacunas basadas en la nanotecnología (nanovacunas)
    - 4.1.1. Vacunas basadas en “jaulas” proteicas (SAPN)
    - 4.1.2. Vacunas de partículas similares a virus (VLP)
    - 4.1.3. Vacunas basadas en péptidos sintetizados *de novo*
    - 4.1.4. Vacunas basadas en bacteriófagos
  - 4.2. Otras nanopartículas con potencial antimicrobiano
    - 4.2.1. Nanopartículas neutralizantes de toxinas
    - 4.2.2. Nanopartículas biomiméticas portadoras de fármacos
    - 4.2.3. *Microswimmers*
  - 4.3. Nanoingeniería verde
5. Conclusión.
6. Glosario.
7. Bibliografía.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ¿Qué son las Enfermedades infecciosas?

Las enfermedades infecciosas son aquellas que están provocadas por bacterias, hongos, virus o protozoos iguales o distintos a los que conforman la microbiota normal del organismo. Para que se produzcan debe tener lugar un proceso de infección por parte del microorganismo, es decir, debe multiplicarse dentro del huésped y además sobrepasar sus barreras defensivas (García Palomo et al., 2010).

En España, estas patologías suponen un 1,4% del total de defunciones (tomando los datos del año 2018 publicados por el Instituto Nacional de Estadística), esto se traduce que son la undécima causa de mortalidad en nuestro país (INE, 2018); aun así, dichos valores suponen una pérdida considerable de calidad de vida de la población, que midiéndose en años potenciales de vida perdidos son una media de 15,33 años entre hombres y mujeres, conformando la quinta causa de mayor pérdida de este índice de la calidad de vida de una población (INE, 2018).

El interés de conocer la epidemiología de estas enfermedades está, en que, según estos datos, se pueden establecer unos criterios u otros con respecto a las intervenciones de Salud Pública (Cassini et al., 2018), así mismo, de cara al paciente es interesante conocer como le afectan estas enfermedades para llevar a cabo una práctica clínica adecuada.

Si se revisasen los datos epidemiológicos desde principios del siglo XX, se podría observar una tasa de mortalidad mucho más alta a la actual, esta reducción se logró gracias a la aparición del primer antibiótico: el salvarsán. A éste le siguieron las penicilinas en la década de 1920, y así progresivamente hasta nuestros días (Hutchings et al., 2019).

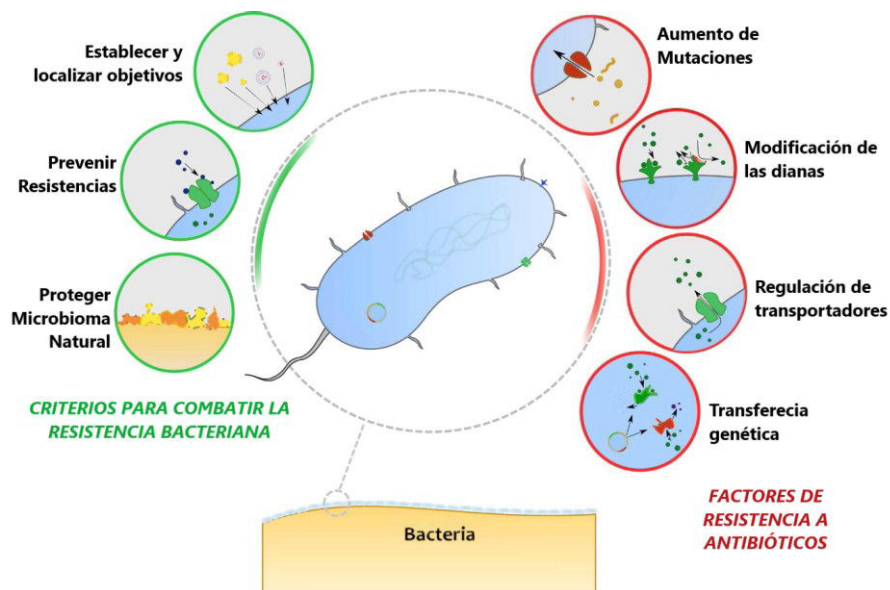
Los antibióticos, empleados para tratar las infecciones causadas por bacterias, son un arma de doble filo ya que un mal uso de éstos es la principal causa de la aparición de resistencias en estos microorganismos. En particular, España es uno de los países con los mayores porcentajes de resistencia a antimicrobianos de la Unión Europea (Moruno Rodríguez, 2017) de hecho, muchas de estas bacterias resistentes son causantes de infecciones de notoria importancia, tales como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*.

Como se ha mencionado anteriormente, la principal causa de que esto ocurra es el mal uso de los antibióticos, ya sea desde el punto de vista de la adherencia, o porque se utilice sin causa justificada y sin ninguna limitación; parte de ello es el bajo control que existe por parte de la administración de cara a la dispensación de los antibióticos (Sánchez Núñez et al., 2018), ya que la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) solo tiene en cuenta los antibióticos que son dispensados con cargos al Servicio Nacional de Salud (SNS), sin considerar

los que son vendidos libremente por los farmacéuticos, los de uso exclusivo hospitalario o los asociados a mutualidades como ISFAS o MUFACE.

Por otro lado, para poder atacar este problema emergente de salud, debemos conocer las causas que lo provocan, especialmente a nivel molecular. Una de las principales causas es la aparición de mutaciones en la información genética de las bacterias, esto ocurre especialmente en aquellas que son sensibles a antibióticos beta-lactámicos, los cuales para ejercer su acción necesitan penetrar el interior de la célula bacteriana a través de porinas, cualquier cambio estructural o secuencial en estas proteínas hará que varíe la afinidad del antibacteriano por ella, impidiendo que ejerza su acción y propagándose así la infección en el hospedador (Blair et al., 2015). Del mismo modo, pueden sufrir mutaciones otras estructuras diana como los peptidoglucanos de la pared celular o proteínas intracelulares; así mismo, pueden generar mecanismos que inactiven *per se* dichas moléculas, como por ejemplo las enzimas beta-lactamasas. Esto hace que las bacterias queden invulnerables a la acción farmacológica de estos medicamentos.

Existen una serie de estrategias que intentan frenar y evitar este aumento de las resistencias desde el ámbito clínico, figura. 1, éstas se dividen en dos grupos: combinar los antibióticos que hoy conocemos con otros compuestos coadyuvantes, como es el caso de la combinación de Amoxicilina con Ácido clavulánico (el cual inhibe la acción de enzimas destructoras de los antibióticos beta-lactámicos); o podemos sustituir los antibióticos de acción sistémica por una acción más localizada, dirigiéndolos a un lugar específico para que ejerzan su acción (Brooks y Brooks, 2014). Ambas estrategias son de interés desde el punto de vista de la Nanotecnología, ya que podemos dirigir la acción de los antibióticos encapsulándolos o podemos emplear nanopartículas con actividad antibacteriana intrínseca.



**Figura 1.** Comparación de las distintas estrategias bacterianas causantes de resistencias y los criterios clínicos para combatirlas (Brooks y Brooks, 2014).

Por otro lado, además de las bacterias nos encontramos con los virus. Estos son el siguiente grupo de microorganismos responsable de gran cantidad de infecciones a nivel hospitalario y comunitario. Los virus, en realidad, no son más que parásitos intracelulares obligados de carácter acelular, es decir, suponen una gran controversia en la comunidad científica sobre su clasificación en seres vivos o no vivos, ya que para poder completar su ciclo biológico necesitan de la maquinaria celular de otro organismo. Por tanto, desde nuestro punto de vista podemos considerar un virus como una maquinaria molecular capaz de penetrar en una célula y emplear sus orgánulos para reproducirse y en caso de que sea patógeno provocar una infección y una enfermedad con un cuadro clínico característico. Así mismo, la variedad de virus es muy abundante, sirviendo como principal punto de clasificación su material genético: cadena simple o compuesta, ADN o ARN, así como si se encuentran envueltos o no; a pesar de ello, el punto en común de todos ellos es la presencia de una cápside que sirve para proteger y delimitar su material genético y el contenido interno del virus (Buzón et al., 2020).

Estas características tan especiales son las que limitan el tratamiento de las infecciones víricas a fármacos antivirales o vacunas, ya que no pueden ser tratadas con los antimicrobianos habituales como los que se emplean para bacterias y otros agentes patógenos. Uno de los más importantes es el Aciclovir, aunque también es el causante de resistencias en determinadas cepas de virus, al igual que pasaba con las bacterias (Coen & Whitley, 2011).

Los casos más importantes de resistencia a fármacos antivirales, desde el punto de vista clínico, son las del virus del VIH y del virus Influenza, causantes a nivel mundial de los casos de SIDA y de gripe común respectivamente. Sirven como ejemplo de los dos principales mecanismos de resistencia que presentan los virus: en primer lugar, la incapacidad de inhibir la maquinaria enzimática del virus, como ocurre con la retrotranscriptasa del VIH y, en segundo lugar, la gran capacidad de mutación que presentan estos patógenos. Este hecho tiene graves consecuencias clínicas, ya que las resistencias al tratamiento establecido son las causantes de defunciones por fracaso en el tratamiento o causan cronicidad en la infección comunitaria, evitando la erradicación de enfermedades (Bisso-Andrade, 2019).

## **1.2. Nanotecnología: la nueva aliada de la Medicina**

La nanotecnología es una ciencia reciente, surgida en el año 1.959 de la mano del físico Richard Feynman y no fue hasta la década de los años 70 cuando se acuñó el término de nanotecnología como “el estudio, la síntesis, el diseño, la caracterización, la producción y la aplicación a niveles atómicos y moleculares en una escala de 1 a 100 nm, de estructuras, dispositivos y sistemas”. De entre la multitud de aplicaciones posibles de la nanotecnología, una de las más importantes e influyentes es la clínica, de ello aparece una nueva disciplina que aún



conocimientos de ambas: la Nanomedicina; cuyos principales objetivos son el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades (Pájaro Castro et al., 2013).

Desde el punto de vista farmacológico, aparece la nanoterapia que consiste en dirigir, enmascarar o transportar fármacos desde el lugar de administración hacia el lugar de acción, con ello podemos disminuir la aparición de efectos sistémicos no deseados, así como una terapia más efectiva para el paciente. Además de tratar enfermedades pueden ser diagnosticadas, empleando nanopartículas que emitan fluorescencia o transportando radiofármacos para conseguir un diagnóstico por imagen más eficaz; o sin embargo se pueden emplear nanosensores o biochips que son capaces de ayudar en la diagnosis por ellos mismos. Por último, otra de las aplicaciones es la de regenerar tejidos u órganos dañados (nanomedicina regenerativa) pudiendo, por ejemplo, crear en el laboratorio minerales para huesos dañados (Echevarría-Castillo, 2013).

Existe una gran variedad y complejidad en las distintas nanopartículas, las cuales constituyen la principal arma de la nanomedicina, las características de éstas dependen de su síntesis, purificación o caracterización; del mismo modo, pueden ser orgánicas como las constituidas por ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o micelas, o inorgánicas como el grafeno, los micropolímeros o partículas constituidas por metales de transición como el oro o la plata.

Las diferentes características que pueden presentar son las que les otorgan unos usos y aplicaciones (Tabla I) distintas unas de otras como (Pelaz et al., 2017):

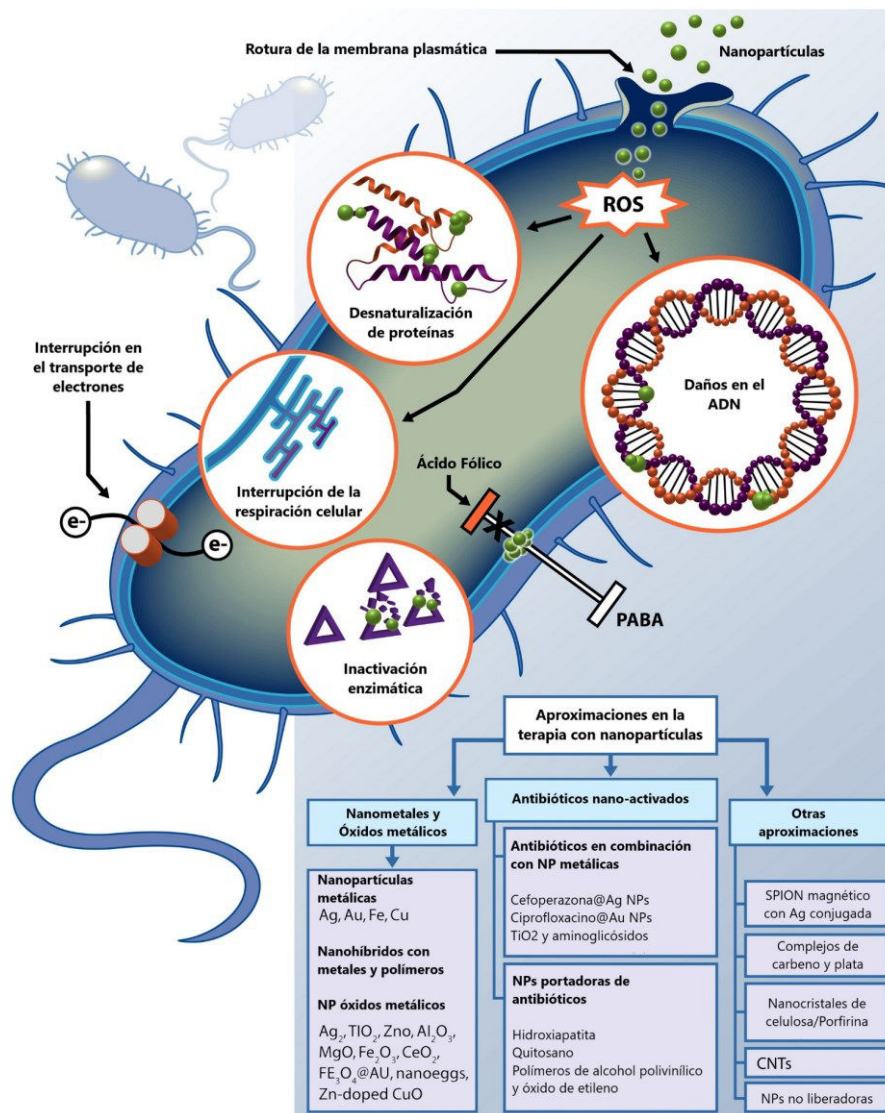
**Tabla I.** Breve relación de la múltiple aplicabilidad de las distintas nanopartículas en medicina (Adaptado de Pelaz et al., 2017).

APLICACIÓN	EJEMPLOS DE NANOPARTÍCULAS EMPLEADAS
<b>DIAGNÓSTICO POR IMAGEN</b>	
Tomografía computerizada	Nanopartículas de oro como agente de contraste.
Resonancia magnética	Complejos <i>paramagnéticos</i> de $Gd^{3+}$ , $Mn^{2+}$ o $Fe^{3+}$ .
Imagen por Fluorescencia	Puntos cuánticos, que sustituyen <i>fluoróforos</i> orgánicos tradicionales.
<b>DIAGNOSTICO IN VITRO</b>	
Medición de glucosa en sangre	Matriz de poliacrilamida para la enzima glucosa oxidasa.
Detección de tumores	ADN funcionalizado con nanopartículas magnéticas de $Fe_3O_4$ .
Detección de antígenos	Anticuerpos funcionalizados con nanocables de silicio con una capa de polietilenglicol (PEG)
<b>TRATAMIENTO IN VIVO</b>	
Tratamiento del cáncer	Nanocomplejos formados por micelas lipídicas o poliméricas
Transporte de moléculas a través de barreras biológicas	<i>PLGA</i> recubierto de quitosano en forma de aerosol para tratar enfermedades respiratorias
<b>IMPLANTES IN VIVO</b>	
Nanomedicina regenerativa	Nanotubos de carbono para crear neuroprótesis
<b>TERAGNOSIS</b>	
Rastrear el transporte de fármacos	Puntos cuánticos y nanodiamantes

### 1.3. Las nanopartículas con actividad antimicrobiana.

Sin tener en cuenta, por ahora, las nanopartículas que emulan las características de estructuras biológicas (bio-inspiradas o biomiméticas), nos encontramos con tres estrategias en la nanoterapia para tratar las infecciones por microorganismos (Figura 2): nanometales y óxidos metálicos, antibióticos tradicionales nano-activados y otras aproximaciones.

Los compuestos de plata han sido empleados tradicionalmente para tratar quemaduras y prevenir las infecciones asociadas a ellas, uno de los mecanismos propuestos para su actividad antimicrobiana es su afinidad por grupos fosfato y sulfuro, interaccionando con el ADN bacteriano, causando presuntamente, la muerte del patógeno. Pueden emplearse por sí mismos, asociados a polímeros sintéticos o en combinación con otros antibióticos, comprobándose una gran eficacia contra bacterias del género *Staphylococcus* sp. resistentes a Meticilina (MRSA).



**Figura 2.** Breve esquema de las distintas estrategias de tratamiento antimicrobiano y los distintos mecanismos de acción propuestos (Brooks y Brooks, 2014).

El oro ha sido empleado en la medicina tradicional china y ayurvédica como revitalizante, y aunque es considerado un material inerte para el organismo, sus nanocompuestos son capaces de destruir bacterias y tumores por medio de calor fototérmico gracias a la irradiación de infrarrojos; al combinarlo con antibióticos tradicionales aparece una sinergia entre ellos, ya que el oro facilita la aparición de poros en la membrana celular provocando su disrupción.

Por otro lado, el óxido de magnesio preparado por un método de aerogel, es capaz de retener durante una cantidad considerable de tiempo halógenos en su interior, estas nanopartículas se adhieren a las membranas plasmáticas de las bacterias, formando agregados y es entonces cuando los halógenos encerrados en su interior destruyen las membranas plasmáticas de las bacterias.

Otros óxidos metálicos, como los de aluminio son responsables de expulsar radicales libres en el interior de las bacterias, provocando la apoptosis y destrucción de la célula; el dióxido de titanio puede ser empleado como desinfectante asociado a la irradiación ultravioleta haciendo de este método aún más eficaz e igualmente las nanopartículas de monóxido de zinc pueden emplearse en la agricultura para eliminar patógenos en las plantas, evitando el uso de pesticidas (Rai & Bai, 2011).

Del mismo modo, ciertas nanopartículas pueden emplearse para modificar la distribución de los antimicrobianos existentes, haciendo que actúen en el lugar de la infección, este es el caso de nanopartículas basadas en polímeros, micelas, dendrímeros, nanotubos de carbono o aquellas construidas de sílices porosos, entre otras varias. Como se ha explicado anteriormente, esa cualidad es una de las principales armas para luchar contra la resistencia a los antibióticos y eliminar los efectos sistémicos indeseados que presentan los antimicrobianos de acción sistémica (Wang et al., 2017).

Aunque este nuevo método de atacar a los microorganismos patógenos ofrece ciertas ventajas sobre los métodos actuales, implican algunos riesgos especialmente toxicológicos. Algunos estudios han demostrado que existe una relación lineal entre el tamaño de estas nanopartículas y su toxicidad asociada, el pequeño tamaño de las mismas y su inespecificidad pueden hacer que atraviesen membranas biológicas dentro del organismo, también pueden generarse especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que implican daños en el ADN celular o en la maquinaria enzimática, lo cual conduce a citotoxicidad y muerte celular o aparición de tumores (Castaño et al., 2014).

Por todo lo expuesto anteriormente, en especial las ventajas que presentan las nanopartículas sobre el tratamiento actual de las enfermedades infecciosas son por lo que nos centramos en las nanopartículas que imitan estructuras biológicas, tanto de los patógenos hacia los que están indicados como de estructuras del propio organismo que recibe el tratamiento, es decir, las nanopartículas biomiméticas.

## **2. OBJETIVO**

El principal objetivo que se persigue con esta revisión bibliográfica es el de realizar un resumen y una recopilación de las últimas tendencias en Nanomedicina, con un especial énfasis en las enfermedades infecciosas. En concreto, se ha pretendido buscar en las nanopartículas una solución para un problema grave como es la resistencia a antimicrobianos, cada vez más en alza y responsable de millares de muertes alrededor del mundo, especialmente en países desarrollados y con buen acceso a medicamentos, como es el nuestro.

Por otro lado, también se pretende encontrar nuevas vías de fabricación y empleo de los anti-infecciosos actuales, aprovechando las distintas ventajas que la Nanotecnología es capaz de brindar.

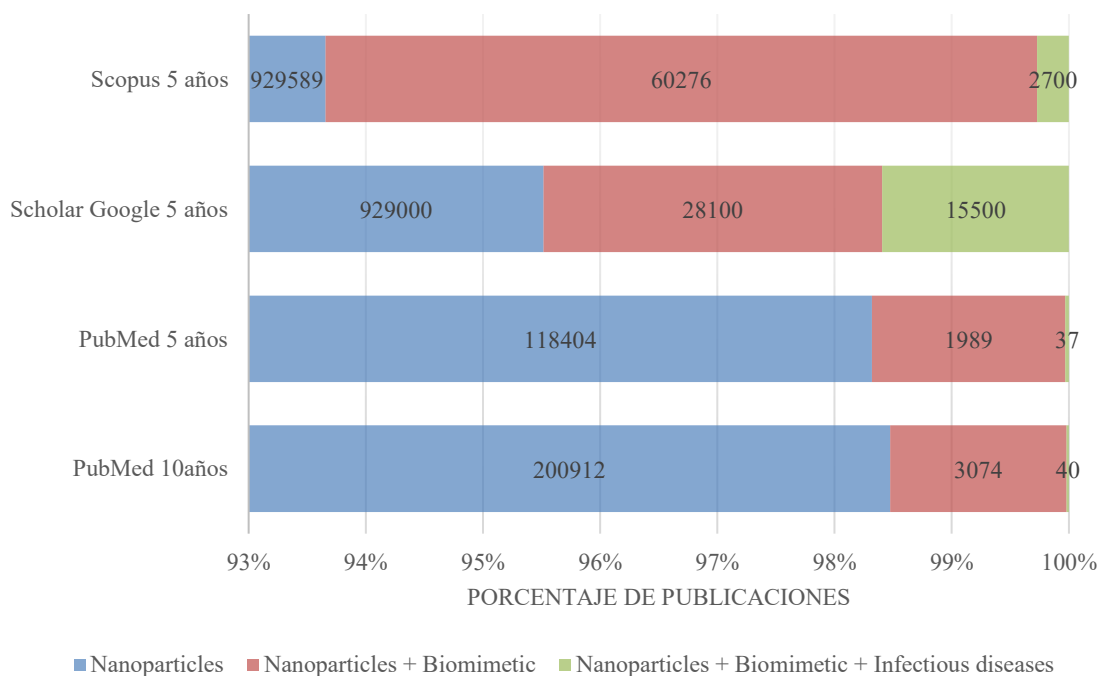
Como objetivo secundario, con esta pequeña revisión, se busca transmitir la aplicabilidad potencial que presentan las nanopartículas en la terapéutica actual y futura, para ello se ha procurado consensuar un texto accesible desde cualquier punto de vista, ya sea más o menos técnico.

### 3. METODOLOGÍA

El método que se ha empleado para realizar la revisión bibliográfica es deductivo, por tanto, se parten de conceptos generales para establecer hipótesis específicas o particulares.

En primer lugar, se partió de publicaciones en libros y otras revisiones bibliográficas para llegar a los conceptos más generales: Enfermedades infecciosas y Nanotecnología; además se emplearon fuentes de datos epidemiológicos y demográficos como es el Instituto Nacional de Estadística de España (INE). Del mismo modo, se han consultado libros en versión online disponibles en ClinicalKey o el Catálogo de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla, debido a la imposibilidad de realizar consultas presenciales.

Posteriormente, se han ido repasando publicaciones de autores punteros en el tema, acotándose la búsqueda al último lustro para conseguir actualidad en la revisión, para ello nos hemos servido de herramientas como PubMed, Scopus y ScienceDirect para consultas de documentación específica; así como de Google Académico, Scielo y otras bases de datos europeas para hacer consultas más generales que satisficieran vacíos de información de carácter poco específico. Tomando como ejemplo la base de datos PubMed, a continuación, se muestra en la figura 3 una gráfica comparativa con las distintas cifras de artículos que muestra la plataforma, acotando a la última década y al último lustro:



**Figura 3.** Gráfica ilustrativa en la cual, el eje horizontal representa el número de publicaciones en valores de porcentaje de cada una de las bases de datos, según los parámetros descritos en la leyenda. En el eje vertical se muestran las distintas bases de datos con acotaciones al último lustro (o década en caso de PubMed) para ofrecer una comparativa.

Según lo mostrado en la gráfica, presentada en la Fig. 3 podemos apreciar varias ideas claves:

- Los principales avances en esta disciplina, tanto en nanopartículas, como específicamente en nanopartículas relacionadas con enfermedades infecciosas han tenido lugar en los últimos 5 años, ya que el número de publicaciones acotando a una década o a un lustro apenas variaba, y es por ello por lo que se eligió este último rasante.

- PubMed es la Base de Datos con menor número de aportaciones al tema, eso hace que sea la escogida para la búsqueda de información específica, ya que las publicaciones contenidas son bastantes más técnicas y concretas.

- A pesar de que Google Académico es el que arroja mayor cantidad de resultados relacionados con la revisión, fue Scopus la seleccionada para la obtención de contenido principal, ya que refleja contenidos mejor contrastados y a criterio propio con mayor rigor científico.

Por último, se elaboró un glosario y un listado de acrónimos con aquellas palabras que puedan ser desconocidas para el lector, por ello, vendrán recogidas al final del texto siendo señaladas en **negrita** y *cursiva*.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Vacunas basadas en la nanotecnología (nanovacunas)

Las vacunas son medicamentos biológicos centrados en crear una respuesta inmune en el organismo receptor, principalmente para combatir enfermedades infecciosas, aunque también se están empezando a emplear en terapias anticancerosas. De forma general, aquellas destinadas a combatir procesos infecciosos están compuestas de patógenos vivos, muertos o atenuados, partes de éstos (antígenos) o sustancias derivadas de los mismos (factores de virulencia) (Franc, 2020).

Existen tantos tipos de vacunas, como formas de obtenerlas y aplicaciones potenciales de las mismas. En la Tabla II, se recoge un pequeño extracto de lo mencionado.

**Tabla III.** Síntesis de los distintos tipos de vacunas tradicionales que existen actualmente, como se obtienen a grandes rasgos y algunos de los usos aprobados más importantes. (Franc, 2020).

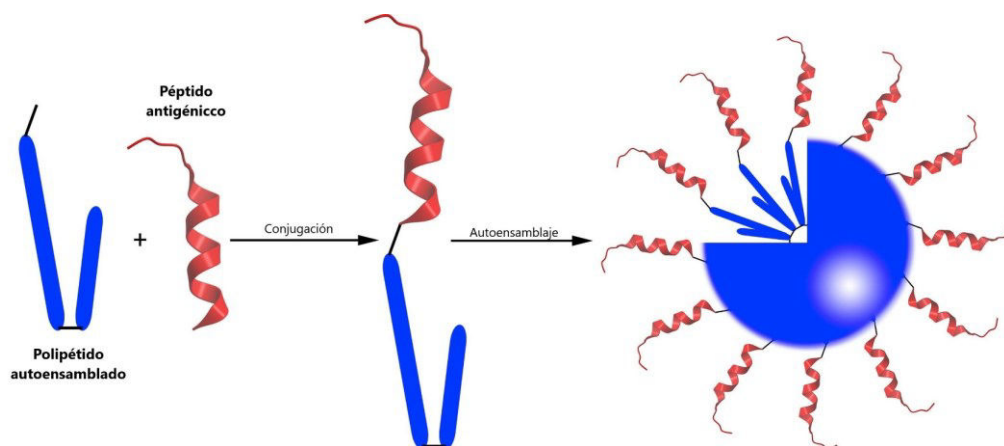
TIPO DE VACUNA	DESCRIPCIÓN	EJEMPLOS
<b>Atenuadas (LAV)</b>	Patógenos debilitados por medios químicos o físicos, incapaces de provocar una infección, pero con capacidad antigénica.	Tuberculosis, Poliomiéлитis o Rubéola
<b>Inactivadas (KA)</b>	Patógenos destruidos por métodos físicos o químicos. Son más seguras y estables que las LAV. Están cayendo en desuso.	Tos ferina y Poliomiéлитis, Hepatitis B y C (en investigación)
<b>Subunidades inactivadas (SUV)</b>	Solo contienen los componentes microbianos responsables de la inmunogenicidad (de superficie). Se obtienen por degradación y separación de los componentes de los microorganismos	Meningococo, <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>Vacunas fisionables (SV)</b>	Similares a las SUV, lo que las diferencia es que las SV también contienen antígenos internos.	Vacuna de la gripe
<b>Toxoides (T)</b>	Se elaboran a partir de toxinas proteicas producidas por bacterias, que se desnaturalizan químicamente.	Difteria y Tétanos.
<b>Vacunas recombinantes (RV)</b>	Se aísla el gen responsable del antígeno, se introduce en cultivos celulares y se produce en grandes cantidades mediante biotecnología.	Hepatitis B y Virus del Papiloma Humano
<b>Vacunas Vectoriales (VV)</b>	Se obtienen antígenos de forma recombinante y se introducen en vectores víricos no patógenos, que crean un <i>epítipo</i> .	Covid-19
<b>Vacunas genéticas (ADN o ARN)</b>	Se aísla el material genético del microorganismo y se introduce en el huésped que sintetiza las proteínas asociadas a ese ADN o ARN.	En ensayos clínicos de vacunas contra el Zika o el VIH.

Al igual que con las vacunas tradicionales, el principal objetivo de las nanovacunas es el de proporcionar al organismo las herramientas necesarias para generar anticuerpos, idealmente neutralizantes, para poder hacer frente a las infecciones (Jackman et al., 2021).

#### 4.1.1. Vacunas basadas en “Jaulas” proteicas (SAPN)

Son vacunas desarrolladas a partir de nanopartículas de proteínas **autoensambladas** (SAPNs, por sus siglas en inglés: *Self-Assembling Proteins Nanoparticles*) están formadas por una serie de polipéptidos que se autoensamblan formando una esfera u otra figura tridimensional que pretenden imitar a un virus (Indelicato et al., 2017), para generar una respuesta inmunológica tan férrea como se haría ante un patógeno real. La principal función de estas nanopartículas es, una vez formada la esfera, la presentación de un epítipo o antígeno completo el cual es el encargado de desencadenar la respuesta inmune o encerrar en su interior cualquier sustancia coadyuvante al tratamiento o con implicación inmunológica.

Las distintas partes (Fig. 4) que forman estas nanopartículas se pueden obtener en el laboratorio, por lo que se tiene mayor control en su producción, además presentan mayor ventaja sobre otras vacunas clásicas, ya que las propiedades fisicoquímicas pueden ser definidas antes de su fabricación, tienen un menor ratio en cuanto a cantidad obtenida frente a su coste y se pueden degradar biológicamente ya que sus unidades básicas que están unidas mediante enlaces no covalentes (Zhao et al., 2017).



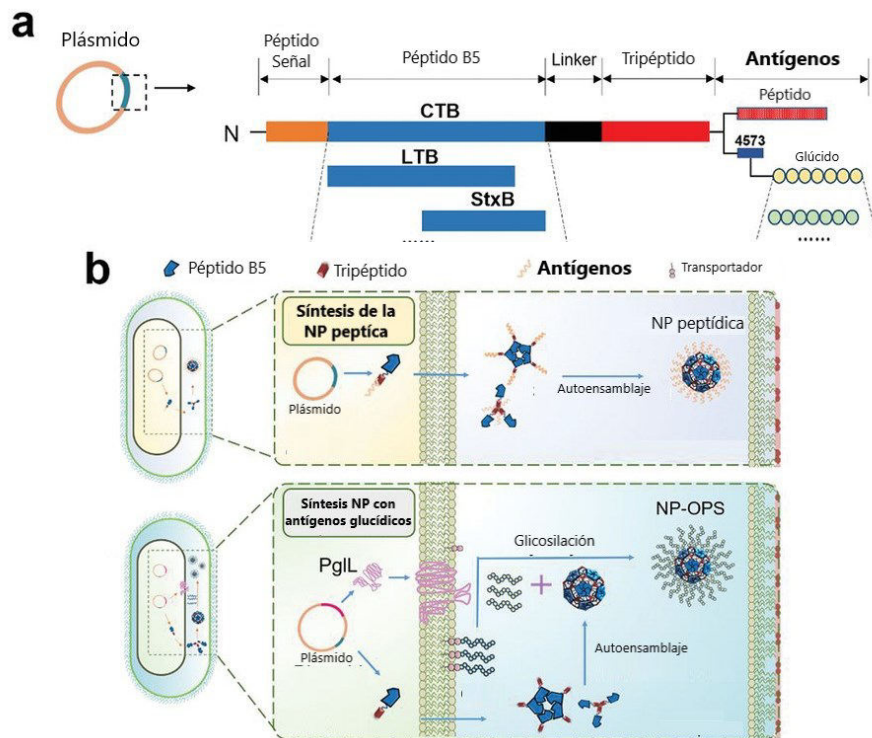
**Figura 4.** Esquema de las partes básicas de una SAPN y las dos fases principales de su obtención y síntesis. En azul se muestra el polipéptido susceptible de autoensamblarse al que se le une un epítipo o antígeno (en rojo) mediante una conjugación sencilla, o *in situ* en caso de obtenerlas de forma recombinante. Obtenida de (Zhao et al., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, estas nanopartículas se pueden obtener completamente empleando ingeniería genética introduciendo plásmidos en células procariotas (*Escherichia coli*) o eucariotas según la complejidad del plegamiento del polipéptido. Este plásmido debe contener la secuencia del polipéptido y del antígeno a presentar (Fig. 5).

Normalmente no es necesaria ninguna etapa de purificación extra ya que las factorías celulares son capaces de sintetizar las subunidades por separado que se autoensamblan en el periplasma, esto se consigue con un estudio complejo del plásmido a introducir. Una vez producidas se pueden caracterizar mediante varias técnicas analíticas como el microscopio de transmisión electrónica (TEM) con el cual podemos estudiar el diámetro, simulaciones de



dinámica molecular para averiguar su estabilidad en el ensamblado, estudios del *efecto Tyndall* que nos da información sobre su estabilidad coloidal, etc. (Pan et al., 2020).



**Figura 5.** Esquema general de un plásmido (a) susceptible de ser empleado para la obtención de SAPN mediante factorías celulares, en este caso *E. coli* (b). Adaptada a partir de (Pan et al., 2020)

Una de las proteínas más empleada es la ferritina, la cual es capaz de formar las denominadas cajas de ferritina tras el autoensamblaje de 24 copias de subunidades de 20 kDa, las cuales son fácilmente modificables en el laboratorio. Además, poseen varias zonas donde pueden bioconjugarse antígenos y epítomos en el mismo proceso de manipulación génica. Estas cajas de ferritina son esferas de 12 nm que poseen un espacio hueco de 8 nm en su interior; estas características las hacen susceptibles de ser empleadas como vacunas de SAPNs o como nanopartículas capaces de liberar fármacos en su lugar de acción cuando son microencapsulados en el interior de la caja (Han et al., 2014).

Otras proteínas empleadas, y con demostrada eficacia, son las proteínas de choque térmico un tipo de chaperonas sintetizadas por organismos termófilos del dominio *Archaea* con la capacidad de resistir altas temperaturas ya que se autoensamblan en cajas similares a las de la ferritina de 24 subunidades para evitar la agregación en el interior de la célula. Así mismo, la subunidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa de *Geobacillus stearothermophilus* forma agregados peptídicos de unos 24 nm con estructura dodecaédrica, también con estabilidad térmica.

A estos agregados proteicos se le pueden unir antígenos de determinados microorganismos patógenos, así como proteínas fluorescentes para emplearlos en nanodiagnóstico o en vacunas contra el cáncer, todo ello aún en estudios en fase clínica (Butkovich et al., 2020).

Aunque estas proteínas presentan grandes utilidades, actualmente se tiende a emplear el diseño computacional de proteínas según las necesidades del investigador, lo cual presenta ciertas ventajas como la predicción del autoensamblaje, optimización de los puntos de unión del epítipo o caracterización óptima para obtener un buen rendimiento industrial y tecnológico de cara a la fabricación masiva de la vacuna (Marcandalli et al., 2019).

Debido a las numerosas ventajas que presenta el desarrollo de vacunas de este tipo, tales como sencillez en su fabricación o estabilidad del producto final, se están investigando diversas aplicaciones clínicas de interés para la Epidemiología actual:

- Una vacuna contra la malaria está siendo estudiada en la que el núcleo de SAPN está compuesto por monómeros de hélices superenrolladas, con el **antígeno P27** (subtipos A, C o F) en sus extremos N- o C-terminal; en total se presentan unas 60 copias del antígeno por cada nanopartícula. Esta vacuna ha demostrado un alto grado de eficacia ya que desarrolla una respuesta inmunitaria similar a la que hay presente en personas que han pasado la infección en lugares endémicos del parásito, así mismo es potencialmente útil contra las especies mayormente distribuidas: *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* por lo que, junto a que la fabricación a gran escala es posible y rentable, así como su estabilidad; supone una gran oportunidad de vacunar en los países más afectados y con menos recursos (Karch et al., 2017).
- El VIH es un virus con una extraordinaria variabilidad genética, actualmente unos 9 subtipos son los causantes de la pandemia actual y cada uno de ellos con sus respectivos antígenos, por lo que la estrategia actual para desarrollar una vacuna consiste en SAPN de estructura similar a la anterior que presentan versiones del **antígeno VIV2** procedentes de distintos grupos virales, capaces de disminuir la probabilidad de primoinfección. Este tipo de vacunas (algunas en fases clínica y preclínica) suponen una nueva brecha de estudio tras el fracaso de publicaciones anteriores con otros tipos de vacunas (Karch et al., 2021).

#### **4.1.2. Vacunas de partículas similares a virus (VLP)**

Los virus, además de ser las partículas infecciosas con el menor tamaño, tienen dos partes bien diferenciadas y presentes en cualquier tipo de virus: el material genético (ADN o ARN) que es necesario para su replicación y una envuelta proteica llamada cápside; y algunos de ellos pueden presentar envoltura lipídica (virus encapsulados) (Murray et al., 2021).

Estas vacunas de partículas similares a virus o VLP, por sus siglas en inglés (*Virus-like particles*) consisten en una serie de estructuras proteicas que pretenden imitar las presentes en los

virus reales; estas se ensamblan sin encerrar material genético del patógeno, por lo que carecen de capacidad infectiva.

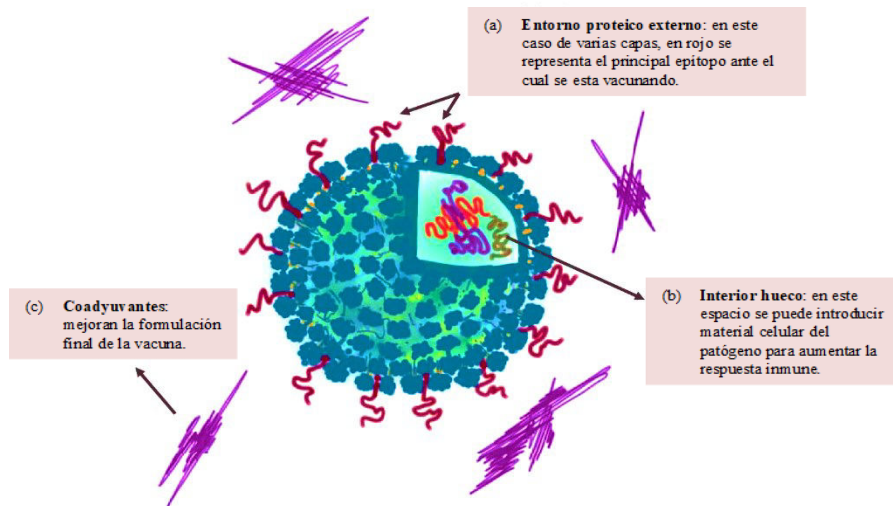
Teniendo en cuenta todo lo anterior, el centro de estudio para el diseño de estas nanopartículas serán todas las capas externas de estos parásitos (Fig. 6. a), teniendo entonces distintos tipos de VLP:

- VLP no envueltos, es decir, los que no llevan capas lipídicas. De forma general son los más sencillos de producir y solo están formados de distintas capas proteicas: los de una sola capa pueden producirse sin ayuda de factorías celulares y los de dos capas o más pueden incluso necesitar ser producidas con ayuda de células eucariotas debido a su gran complejidad.
- VLP envueltos o eVLP, son aquellos que en su estructura incorporan una capa lipídica, la cual obtienen de la célula donde se producen; esto ofrece una ventaja ya que, si adherimos ciertos epítomos a la membrana celular de estas factorías celulares, obtendríamos las VLP con epítomos expresados de forma similar a como lo haría el patógeno realmente. Igual que las anteriores, pueden estar formadas por una o varias capas de componentes proteicos (Nooraei et al., 2021).

Este tipo de nanovacunas presenta prácticamente las mismas ventajas que las de SAPN sobre las tradicionales, salvo un par de excepciones, y es que al ser definitivamente esferas huecas en su interior puede transportarse cierta cantidad de material genético o proteínas (Fig. 6. b), así como restos de la membrana plasmática u otros componentes celulares del microorganismo patógeno, lo cual suscita un incremento en la respuesta inmunitaria (Frietze et al., 2016).

Por otro lado, al igual que las SAPN, estas proteínas también necesitan ser producidos en sistemas de producción heteróloga, es decir, empleando células procariontas y eucariotas e ingeniería genética, igual que se explicó anteriormente; sin embargo, el alto grado de glicosilación de estas proteínas, así como la intervención de la *ubiquitina*, ha desplazado a las células procariontas hacia un papel secundario, prefiriéndose la producción en sistemas eucariotas como levaduras y líneas celulares de insectos o mamíferos; este hecho conlleva un incremento de costos pero un resultado mucho más próximo a las conformaciones nativas (Syomin & Ilyin, 2019).

El hecho de que gran cantidad de este tipo de vacunas ya estén comercializadas abre la puerta a nuevas investigaciones por esta misma corriente, así varios grupos de investigación están en plenos ensayos clínicos de estas vacunas con algunas sustancias coadyuvantes (Fig. 6. c) como glicoproteínas, ADN, ARN, lipoproteínas, análogos estructurales, etc. que son embebidos en las VLP o dispersos en la formulación para aumentar la respuesta inmunológica. Algunos de ellos también ayudan en la formulación final del producto, aumentando su resistencia a la temperatura o a la mucosa, lo cual hace que varias de estas vacunas puedan administrarse por vía oral o nasal, como ventaja frente a las de administración únicamente parenteral (Cimica & Galarza, 2017).



**Figura 6:** Representación esquemática del entorno de una vacuna de VLP en este caso no envuelta, en el que puede observarse el entorno proteico exterior (a) cuya principal función es la presentación de antígenos; el interior hueco (b) el cual puede contener determinados compuestos que potencien la acción inmune; y los adyuvantes de la vacuna (c) que pueden ir dentro o fuera de la VLP, que sirven para mejorar la respuesta de la vacuna en general. Extraído y editado de (Klimek et al., 2018)

Por otro lado, hay abiertas varias líneas de investigación para desarrollar nuevas vacunas basadas en VLP:

- Al igual que con las vacunas basadas en SAPN, muchas otras de VLP que pretenden erradicar el VIH han fracasado anteriormente. Estas nanopartículas han evolucionado desde pequeños conglomerados proteicos hasta el ideal actual de eVLP que son capaces de presentar antígenos en su superficie como lo haría un microorganismo real. En cambio, algunos grupos de estudio han estado empleando proteínas procedentes del virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), ligeramente diferente al humano, esto ha generado una respuesta inmunológica poco específica, y por tanto poco eficaz; por tanto, el principal desafío es generar VLP que sean lo más parecidas posible a las proteínas estructurales del VIH (Chen et al., 2020).

- El virus del Zika (emergente), el virus Chikungunya, el virus de la Fiebre Amarilla y el virus de la Encefalitis Japonesa son transmitidos por mosquitos de los géneros *Aedes* sp. y *Culex* sp., estos arbovirus están ampliamente distribuidos cuyas zonas endémicas se superponen unas con otras, por lo que se está trabajando en una vacuna tetravalente frente a los cuatro virus, denominada CJaYZ. Se producen en factorías celulares proteínas estructurales de los cuatro virus (proteínas NS2B3 del Virus del Zika y una CprME por cada uno los otros tres virus descritos), así obtenemos cuatro proteínas diferentes por separado a las cuales se les ha comprobado su capacidad antigénica en formulaciones monovalentes, bivalentes y tetravalentes y para todas ellas se obtuvo una respuesta inmune robusta (Garg et al., 2020).

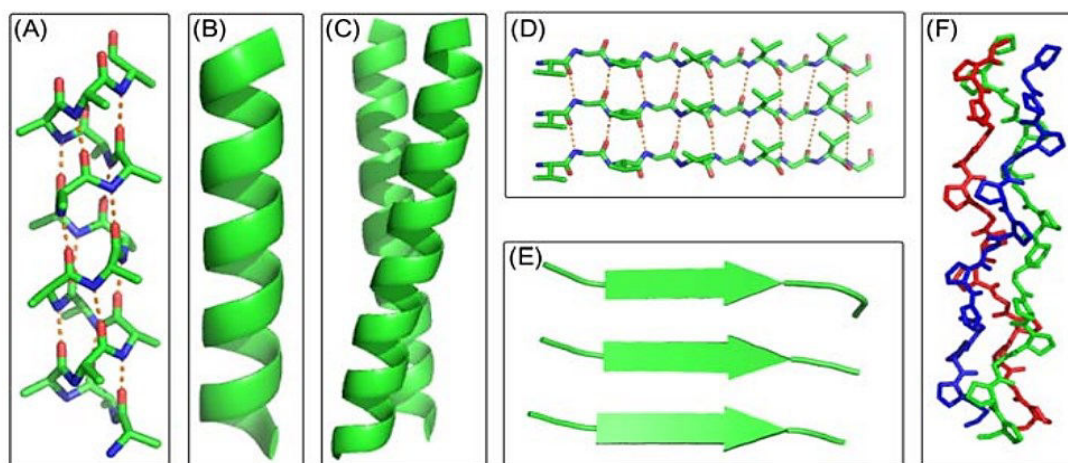
Como se ha mencionado con anterioridad, en la actualidad existe una gran variedad de vacunas basadas en VLP que ya están en el mercado y que, por tanto, están siendo empleadas para combatir enfermedades de importancia sanitaria como la Hepatitis o el Virus del Papiloma Humano, algunas de ellas se recogen en la Tabla III:

**Tabla III.** Algunos ejemplos de vacunas basadas en VLP disponibles actualmente en el mercado y algunos datos importantes como el tipo de células en el que se producen, adyuvantes empleados, de que se compone la estructura de la VLP y el antígeno que muestra en superficie. Abreviaturas: Al (aluminio), HBsAg (Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B), SHBs, MHBs y LHBs (Proteína S, M y L respectivamente del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B), CHO (células de Ovario de Hámster Chino), HPV (Virus del Papiloma Humano), HEV (Virus de la Hepatitis E). Extraída de (Qian et al., 2020).

VACUNA	FACTORIA CELULAR	ADYUVANTE	VLP	ANTÍGENO
<b>Heptavax-B®</b> (Merck y Co.)	No (se obtiene de plasma)	Hidróxido de Al	HBsAg	SHBs
<b>Engerix-B®</b> (GSK)	Levaduras ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Hidróxido de Al	HBsAg	SHBs
<b>Recombivax HB®</b> (Merck y Co.)	Levadura ( <i>S. cerevisiae</i> )	Sulfato de Al	HBsAg	SHBs
<b>Sci-B-Vac®</b> (SciGen)	Mamíferos (células CHO)	Hidróxido de Al	HBsAg	SHBs, MHBs, LHBs
<b>Gardasil®</b> (Merck y Co.)	Levadura ( <i>S. cerevisiae</i> )	Sulfato de hidroxifosfato de Al	HPV	HPV6/11/16/18 VLP
<b>Cervarix®</b> (GSK)	Células de insectos (Hi-5 TM)	AS04 (hidróxido de Al y MPL)	HPV	HPV16/18 VLP
<b>Hecolin®</b> (Innovax)	Bacteria ( <i>E. coli</i> )	Hidróxido de Al	HEV	HEV p239

#### 4.1.3. Vacunas basadas en péptidos sintetizados *de novo*

Al contrario que ocurría en los dos casos anteriores, estos péptidos no están diseñados basándose en el autoensamblaje natural de las proteínas, sino que son construcciones proteicas sencillas que se limitan a estructuras secundarias de  $\alpha$ -hélice y láminas  $\beta$  (Nguyen et al., 2021) como las representadas en la figura 7.



**Figura 7.** Representación de las estructuras secundarias proteicas más comunes. (A)  $\alpha$ -hélice con enlaces intramoleculares en naranja. (B) Esquema de  $\alpha$ -hélice. (C) Hélice superenrollada (*coiled coil*). (D) Representación de tres cadenas de proteínas formando una hoja plegada  $\beta$ , puentes de hidrogeno intermoleculares representados en naranja. (E) Tres láminas  $\beta$  paralelas entre sí. (F) Representación del colágeno de su triple hélice levógira, formada por tres  $\alpha$ -hélices enrolladas sobre sí mismas. Extraída de (Nevagi et al., 2018)

El diseño de estas vacunas se basa en emplear herramientas informáticas para obtener secuencias cortas de péptidos que sean epítomos potenciales para ser reconocidos por linfocitos de tipo B y tipo T (Lohia & Baranwal, 2020).

La sencillez de este tipo de vacunas hace que presenten ciertas ventajas sobre el resto, ya que no es imperativo que sean sintetizadas en factorías celulares ni generar estructura terciaria ni glicosilaciones, además su pequeño tamaño hace más sencilla su entrada en el interior de las células por ejemplo mediante endocitosis. Sin embargo, suelen ser necesarios ciertos mecanismos que mejoren sus características farmacológicas como es la microencapsulación o la protección mediante liposomas (Hos et al., 2018).

Por otro lado, esta técnica puede aplicarse para generar nanofibras proteicas como la Coil29 que son capaces de presentar antígenos en su superficie, esto abre la posibilidad de desarrollar vacunas monovalentes y polivalentes en función del número y tipo de epítomos distintos que presenten (Wu et al., 2017).

Muchos candidatos a vacunas basados en péptidos sintéticos siguen en estudios preclínicos. Uno de ellos es un péptido candidato para tratar la Brucelosis, una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Brucella* spp. que causa graves pérdidas económicas cuando afecta a animales de consumo y además posee un tratamiento poco efectivo en caso de humanos. Esta posible vacuna consiste en un péptido que reúne tres epítomos distintitos en una sola molécula: Subunidad B de la toxina del colera (CTB) como coadyuvante, epítomos sensibilizantes de linfocitos B y de linfocitos T; que son separados entre sí mediante secuencias de aminoácidos espaciadoras que también modulan la respuesta inmune (Saadi et al., 2017).

Del mismo modo, un estudio en la Universidad de Quebec ha revelado que la inserción de epítomos claramente inmunogénicos en *fibrillas amiloideas* puede suponer una oportunidad relevante para la obtención de vacunas. En este caso han conseguido expresar el epítomo inmunogénico E2EP3 del *virus Chikungunya* en extremos de estas fibrillas amiloideas uniéndolas mediante conexiones flexibles de Glicina. Esto hace que estos péptidos puedan ser fagocitados por macrófagos, sin necesidad de coadyuvantes en la vacunación (Babych et al., 2018).

#### **4.1.4. Vacunas basadas en bacteriófagos**

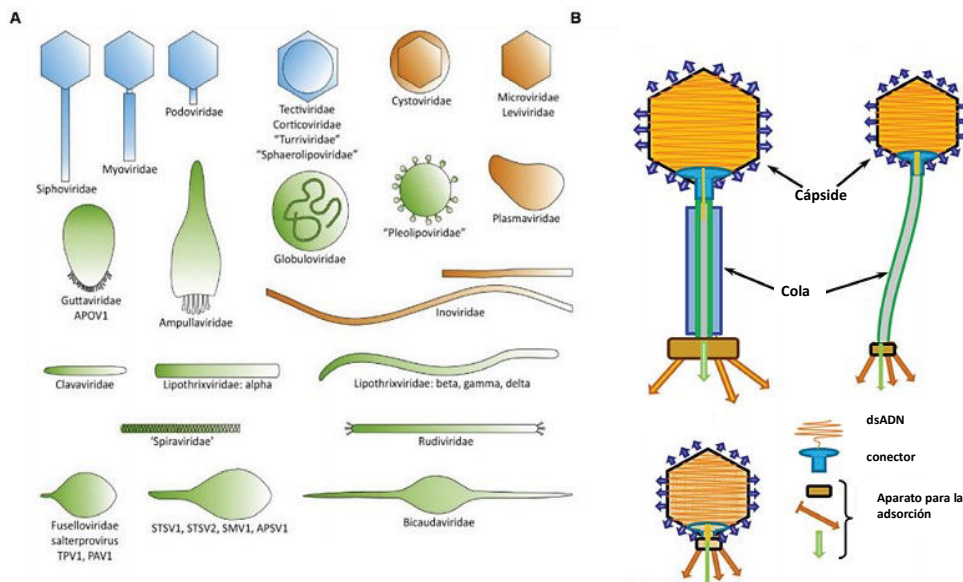
Los bacteriófagos (o fagos) son un grupo bastante heterogéneo de virus que infectan bacterias, presentan un ciclo biológico bastante peculiar que se inicia con la adsorción del virus a la pared bacteriana, a continuación el material genético del virus es introducido en el interior de la bacteria mediante una serie de maquinarias enzimáticas, y allí empieza a multiplicarse el genoma vírico para generar nuevos viriones; a partir de este punto se dan dos situaciones, que a

grandes rasgos consisten en la entrada en una fase de latencia o en la destrucción de la célula liberando al exterior las nuevas copias del virus (Hyman & Abedon, 2019).

Al aumentar el nivel de complejidad con respecto a las nanopartículas anteriores, existe una mayor diversidad con respecto a las implicaciones clínicas, de hecho, con los fagos tenemos tres tipos posibles de vacunas para desarrollar (Zalewska-Piątek & Piątek, 2021):

- Vacunas de ADN basadas en fagos. Se copia el gen del antígeno de interés dentro del genoma del fago y este material genético queda protegido por la cápside del virus. Son vacunas con un bajo coste de producción, eficaces y estables, que pueden ser incluso administradas por vía oral.
- Vacunas de fagos presentadores de antígenos. Durante la clonación, se fusiona la secuencia de un antígeno con la secuencia que da lugar a las proteínas de la cápside del virus, obteniéndose un fago con antígenos en su superficie. Son de especial utilidad en la creación de *bibliotecas de fragmentos de fagos*.
- Vacunas híbridas. Combinan ambas técnicas, obteniéndose un fago muy similar a uno real. Penetran fácilmente la célula y relativamente menos en el núcleo (en desarrollo), lo que genera una respuesta inmune mejor que con los fagos heterólogos no híbridos.

La gran diversidad estructural, mostrada en la figura 8, hace que sea un grupo de virus interesante de estudio, pero principalmente nos centraremos en los fagos filamentosos y en los que presentan cápside y cola.



**Figura 8.** (A) Representación esquemática de bacteriófagos y la correlación de su estructura con la familia a la que pertenecen, se pueden distinguir cuatro tipos básicos: con cápside y cola, con cápside y sin cola, filamentosos y de estructura variada. (B) Detalle de fagos con cápsides y cola, y señalización de las distintas partes. Extraída de (E. White & v. Orlova, 2020).

Por tanto, y teniendo en cuenta lo anterior, la principal aplicación de los fagos filamentosos como el fago M13, fd o f1 es la creación de librerías de fragmentos de fagos o librerías de péptidos, con sus importantes aplicaciones biotecnológicas, ya que al no presentar cápside no

pueden añadirse péptidos de gran peso molecular sino pequeños epítomos para el reconocimiento celular. Esto no ocurre con pequeños fagos con cápside (pero sin cola) como el MS2 o el Q $\beta$  cuya principal aplicabilidad es el desarrollo de vacunas portando antígenos en su superficie, además de ello y fuera del contenido de este texto, con el pequeño fago Q $\beta$  se han desarrollado vacunas para enfermedades no infecciosas como Alzheimer, diabetes, cáncer o alergia.

Por otro lado, estudios preclínicos con bacteriófagos con cápside y cola como el T4, T7 o  $\lambda$  han generado varios candidatos a vacunas bastante importantes, esto es gracias a la posibilidad de emplear estos fagos tanto como presentadores de antígenos como modelos de vacunas híbridas, lo cual es aplicable a enfermedades infecciosas y no infecciosas como cáncer, diabetes o terapia génica (Tao et al., 2019).

Una ventaja clara de los fagos frente al resto de nanovacunas descritas con anterioridad es precisamente la producción de los mismos en biorreactores, pues solo hay dos variables a tener en cuenta: la relación entre el flujo de bacterias (generalmente *E. coli*) y de fagos que se debe realizar de forma continua y en distintas etapas para evitar mutaciones en ambas poblaciones, y en segundo lugar, se deben emplear fagos con *ciclo lítico*, y en caso de ser de *ciclo lisogénico* deben emplearse condiciones en el sistema de producción que propicien el salto del estado de latencia al ciclo lítico. Aun así, gracias a un modelo de predicción matemático se ha conseguido desarrollar un sistema de producción en cadena que genera gran cantidad de bacteriófagos de forma optimizada (Jurač et al., 2019).

Que los bacteriófagos sean específicamente parásitos bacterianos hace que sea una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos (aunque no se descarta su aplicación en infecciones virales), sin embargo, ciertos estudios demuestran que el mecanismo de infección de los bacteriófagos podría de algún modo aumentar la mutagenicidad de las bacterias que infectan, ya que estas intentan protegerse de la infección por fagos, esto podría desencadenar en un problema mayor si de alguna forma se aumenta la resistencia de las bacterias a los tratamientos posibles. Sin embargo, se ha demostrado que aquellas cepas bacterianas que han desarrollado una resistencia al tratamiento con fagos también han sufrido una pérdida en la capacidad patogénica, ya que sus factores de virulencia también han disminuido (Oechslin, 2018).

Actualmente, varios candidatos a vacunas se están probando en modelos animales, tales como:

- Una vacuna contra la infección por SARS-CoV-2, de especial importancia desde que la OMS declarase la pandemia asociada a este virus. El equipo de Zhu et al. (2021) ha desarrollado una vacuna híbrida mediante técnicas de *CRISPR*, obteniendo un fago T4 que expresa el antígeno S (proteína de la espícula externa del SARS-CoV-2) en la superficie del fago, así como ciertas partículas víricas con implicación en la respuesta inmunitaria y descubiertas en pacientes que han pasado la enfermedad, que se encuentran encapsuladas



dentro de la cápside. Han logrado una respuesta inmunológica robusta en los modelos animales. Otros aspectos destacables es que no necesita adyuvantes por lo que se reducirían los posibles efectos secundarios que presentan otras vacunas actuales y, además, serviría como modelo para otras vacunas polivalentes ya que los costes de investigación, desarrollo y fabricación a gran escala son relativamente bajos.

- El colera es una enfermedad producida por el bacilo gram negativo *Vibrio cholerae* resistente a antibióticos y que causa multitud de muertes y brotes endémicos. Algunos estudios buscan tratar esta enfermedad empleando terapias basadas en fagos, durante el desarrollo se comprobó que este bacilo es fácilmente capaz de generar resistencias tanto a antibióticos como a la terapia con bacteriófagos, además, es posible que el propio organismo genere anticuerpos contra los fagos; por tanto, se está estudiando en la posibilidad de inocular una vacuna con una mezcla de fagos con distintas mutaciones, para intentar erradicar las bacterias multirresistentes y poder controlar la enfermedad (Hsueh & Waters, 2019).

- Otro bacilo aerobio gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* es responsable del mayor número de infecciones nosocomiales con pronóstico grave. Es una bacteria oportunista que presenta multirresistencia a antibióticos, con especial implicación clínica en el área de quemados. Esta resistencia múltiple a varios tipos de antibióticos hace necesaria la investigación de nuevos métodos para el tratamiento y la profilaxis, uno de ellos es emplear bacteriófagos, que presenta tres posibles vías de contención. En primer lugar, la vacunación para prevenir la infección o un avance peligrosamente grave, se ha estudiado tanto con un cóctel de varios tipos de bacteriófagos para combatir la resistencia, como con fagos específicos por separado, los cuales han demostrado la mayor eficacia. En segundo lugar, se ha estudiado en modelos animales la administración por vía inhalatoria de extractos desecados de fagos, lo cual ha demostrado gran eficacia con buenos resultados antibacterianos sin perjudicar el tejido pulmonar. Y por último, emplear fagos junto a antibióticos genera una sinergia (*Phage-Antibiotic Synergy*, PAS) entre ambos tratamientos, en especial con *pipracilina* y *ceftazidima* (Horcajada et al., 2019).

## 4.2. Otras nanopartículas con potencial antimicrobiano

Aunque las vacunas representan una estrategia eficaz para tratar y prevenir enfermedades provocadas por microorganismos, en ciertas ocasiones es necesario explotar nuevas vías de tratamiento, especialmente que actúen *in situ* y directamente sobre el agente etiológico o sus efectos en lugar de promover una respuesta inmunitaria para ello.

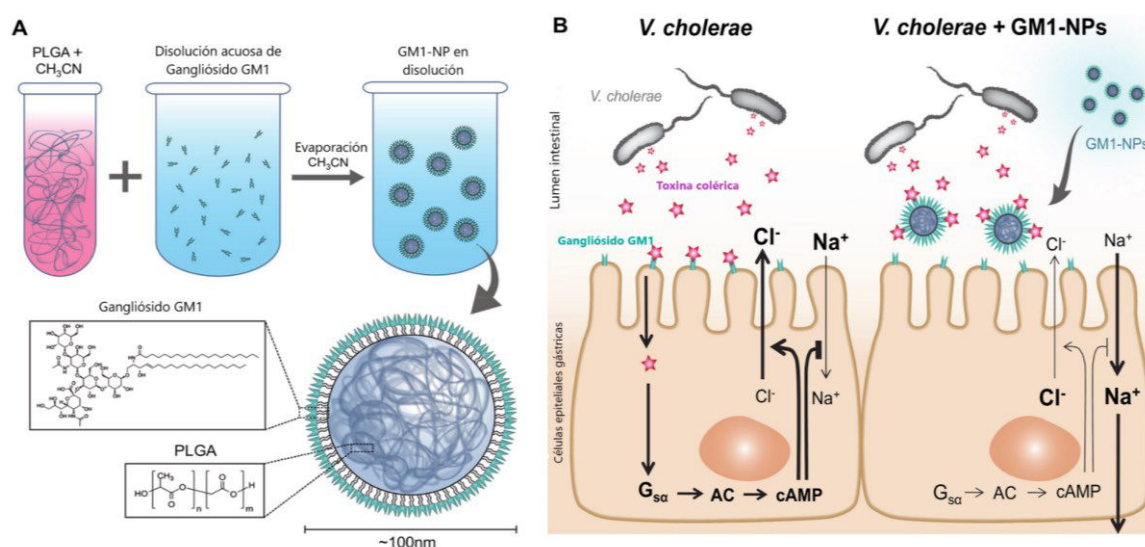
Algunas de las siguientes nanopartículas se han mencionado anteriormente sin tener en cuenta una cierta modificación que las asemeje a componentes biológicos, sin embargo, a continuación, se muestran algunos ejemplos más específicos.

#### 4.2.1. Nanopartículas neutralizantes de toxinas

En el apartado anterior, mencionábamos el colera (producido por *Vibrio cholerae*) como una de las enfermedades bacterianas responsable de un mayor número de muertes. Uno de los factores que hace tan difícil de tratar es que el bacilo secreta endotoxinas que causan fuertes diarreas, las cuales son las realmente culpables de la mortalidad.

Para llevar a cabo esta estrategia se produjeron nanopartículas de PLGA recubiertas de gangliósido GM1 (Fig. 9.A), un *esfingolípido* naturalmente presente en las células del intestino a los que se une la toxina colérica y provoca la salida masiva de iones cloruro de las células epiteliales del intestino lo cual desemboca en brotes intensos de diarrea (Fig. 9.B).

Por tanto, con estas nanopartículas obtenemos un elemento neutralizante que evita que las toxinas liberadas por la bacteria lleguen a su destino, ya que quedan adheridas a su superficie, por lo que la infección podría darse de forma asintomática o con síntomas de poca gravedad (Das et al., 2018).



**Figura 9.** (A) Esquema de síntesis de nanopartículas autoensambladas de gangliósido GM1 y PLGA y estructura básica de la misma y diámetro aproximado. (B) Modo de acción de la toxina colérica *per se* en comparación con el modo de acción en presencia de nanopartículas GM1-PLGA (en negrita los mecanismos celulares acentuados). Extraída y adaptada de Das et al. (2018).

Otra estrategia para obtener nanoesponjas capaces de neutralizar toxinas bacterianas es la síntesis de nanopartículas de PLGA recubiertas de la membrana de eritrocitos. El núcleo de PLGA se obtiene mediante nanoprecipitación con acetona y el exterior conformado por las membranas de los glóbulos rojos se obtienen exponiendo las células a medios fuertemente hipotónicos; uniendo ambos elementos por *sonicación*.

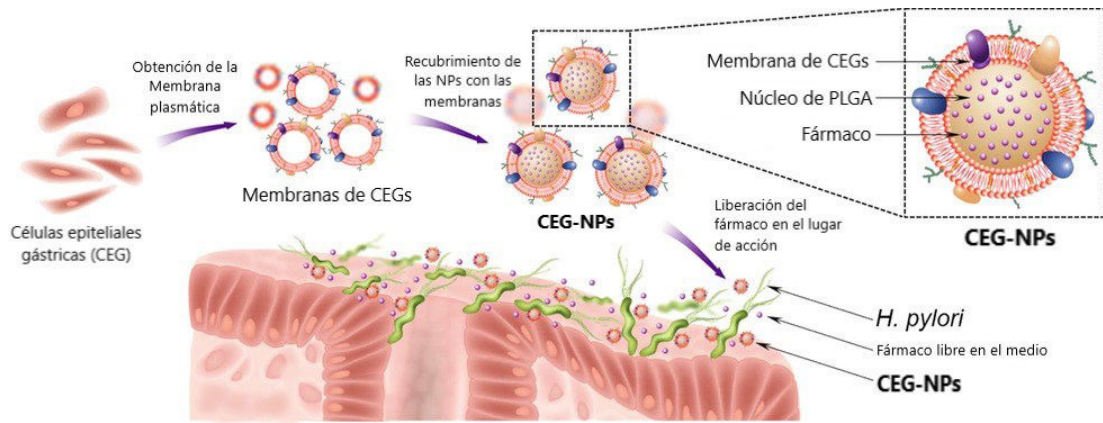
Estas nanopartículas, que pueden emplearse junto a antibióticos para conseguir una sinergia entre ambos métodos, ha demostrado una amplia eficacia frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), dicha bacteria es responsable de importantes infecciones crónicas con grandes cargas a la salud pública; ya que sus toxinas se dirigen directamente a los glóbulos blancos y glóbulos rojos para evadir la respuesta inmune cuando infecta el organismo, creando poros en sus membranas celulares, provocando la muerte celular (Chen et al., 2019).

#### **4.2.2. Nanopartículas biomiméticas portadoras de fármacos**

Algunos microorganismos patógenos tienen la capacidad de ocultarse en el espacio intercelular o intracelular, esto hace que algunas terapias farmacológicas tradicionales sean imprecisas y poco eficaces frente a ellos. Para paliar este problema se han formulado nanopartículas en forma de liposomas, es decir pequeñas esferas lipídicas que imitan las membranas celulares que son capaces de transportar fármacos hidrófilos e hidrófobos; o nanopartículas basadas en polímeros que pueden ser modificados químicamente para satisfacer cualquier necesidad clínica, por lo que podríamos obtener nanopartículas a la carta, tal y como hemos visto anteriormente (Aparna, Biswas, and Jayakumar 2019).

Un tipo muy específico de liposomas son los exosomas, unas vesículas externas que las células son capaces de producir y por lo que contienen proteínas, lípidos y cargas celulares específicas, esto hace que sean notablemente biomiméticas. Del mismo modo, son una herramienta clave del sistema inmunitario para generar su respuesta frente a patógenos por lo que suponen una importante vía de inmunomodulación. Del mismo modo, pueden camuflarse nanopartículas en membranas de exosomas, lo cual dirige la quimioterapia hacia el lugar de acción (Lu and Huang 2020). Estas vesículas han demostrado una amplia utilidad como portadoras de fármacos o péptidos y ADN exógenos lo cual hace que sean buenos candidatos para la quimioterapia en enfermedades infecciosas o de vacunas específicas (Gutierrez-Millan et al. 2021).

Por otro lado, si unimos la técnica de neutralización de toxinas y la de encapsulación de fármacos, obtenemos nanopartículas ampliamente selectivas capaces de neutralizar el patógeno en sí o sus productos y a la vez lograr una liberación de fármacos controlada *in situ*. Este es el caso del trabajo de Angsantikul et al. (2018) en el que han recubierto unas nanopartículas de PLGA con fármacos embebidos en la membrana celular del epitelio gástrico para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* (Fig. 10).



**Figura 10.** Obtención y mecanismo de acción sugerido para las nanopartículas frente a la infección por *H. pylori*. Obtenida de (Angsantikul et al. 2018)

Esta bacteria es prevalente en más del 50% de la población humana y es la principal responsable de úlceras pépticas, gastritis inflamatoria y cáncer gástrico. La terapia actual consiste en un triplete farmacológico compuesto por un **IBP**, Claritromicina y Amoxicilina/Metronidazol.

El uso de estas nanopartículas se basa en que la adherencia de la bacteria al epitelio gástrico es un paso limitante para la infección, al recubrir las nanopartículas con las membranas de estas células conseguimos que se adhieran a las bacterias, por lo que los fármacos del núcleo de PLGA se liberen directamente sobre los microorganismos patógenos.

#### 4.2.3. Microswimmers

Los *microswimmers* son unas nanopartículas sintéticas capaces de desplazarse por sí mismas o con la ayuda de otras partículas como bacterias. Esta capacidad de movimiento les confiere características mejoradas con respecto a las nanopartículas anteriores, permitiendo una administración dirigida de fármacos, genes, agentes de imagen o ADN. Algunos de ellos se desplazan accionados por reacciones catalíticas mediadas por peróxidos o ácidos o bases fuertes, lo cual supone un problema ya que se generan compuestos tóxicos de manera secundaria.

Es por ello por lo que el equipo de Park et al. (2017) han embebido estas nanopartículas a bacterias de la especie *Escherichia coli* no patógenas para aprovechar sus cualidades intrínsecas de movilidad, y es que *E. coli* presenta flagelos que ayudan a la bacteria a desplazarse en función de gradientes electroquímicos. Estos dispositivos se basan en **nanopartículas de PEM** cargadas de fármacos y optimizadas para unirse a las bacterias, las cuales también pueden modificarse genéticamente para dirigirse a un lugar concreto del organismo, en donde el fármaco es liberado en función de las condiciones fisicoquímicas del entorno.

Estas nanoestructuras presentan multitud de aplicaciones clínicas potenciales como el diagnóstico por imagen, liberación dirigida de fármacos, microcirugía, fertilización asistida, terapia celular, quimioterapia y por supuesto, vacunación. En este caso pueden obtenerse vacunas de administración oral mediante la fabricación secuencial de *microswimmers*, es decir, en forma

de partículas multicapa, donde una nanopartícula de magnesio es recubierta por dióxido de titanio, ésta con una membrana de glóbulo rojo presentadora de antígenos que se recubre de una capa mucoadhesiva de quitosano y todo ello se protege con una capa entérica para asilar el dispositivo del pH gastrointestinal. Así la nanopartícula se libera en el intestino delgado por cambios de pH, allí el medio intestinal activa la propulsión autónoma que facilita la penetración de la pared intestinal, una vez conseguido esto el quitosano asegura una mucoadhesión firme para asegurar la liberación del antígeno y conseguir el efecto deseado, potenciando la respuesta inmunológica (Bunea y Taboryski, 2020).

### 4.3. Nanoingeniería verde

Las nanopartículas anteriormente descritas presentan grandes ventajas sobre la farmacología antiinfecciosa actual, pero al igual que cualquier otra factoría química genera graves efectos negativos sobre el Medio Ambiente. Recientes investigaciones han descrito diversos protocolos de obtención de nanopartículas de una forma clínicamente útil, pero responsable con el entorno.

Según Qidwai et al. (2018) estos métodos prometen una serie de ventajas sobre los métodos químicos tales como: mayor rendimiento económico, no es necesario añadir estabilizadores ni agentes reductores, menor consumo energético y, además, una mejor eficacia antimicrobiana. Aunque algunas formas de producción empleando bacterias, levaduras u hongos ya se ha descrito anteriormente en aquellas vacunas que se obtienen por técnicas biotecnológicas, es de especial interés aquellas que se obtienen a partir de extractos vegetales.

Existen varios métodos de obtención de nanopartículas a partir de plantas, como la reducción de los iones metálicos en disolución acuosa del extracto vegetal que contiene los agentes reductores, poniéndose en contacto con una solución de la sal metálica en el laboratorio, se obtienen directamente las nanopartículas; otro método sería emplear dispositivos microfluídicos en los que se hace pasar la mezcla de extracto vegetal y sal metálica junto con aceites por capilares de vidrio u otro material con lo cual podemos controlar el tamaño de las partículas; o podemos emplear el método *in vivo*, mediante el cual se expone la planta a la sal metálica en el medio de crecimiento, entonces la planta se encarga de reducir el metal y acumularlo en sus distintos órganos en forma de nanopartículas. Una vez obtenidas, pueden modificarse exteriormente para distintos propósitos como diagnóstico, detección o adhesión de sustancias y otras aplicaciones biomédicas (Qiao y Qi, 2021).

Así pues, aunque existen estudios de nanopartículas metálicas obtenidas a partir de plantas con importantes aplicaciones antimicrobianas, también se ha estudiado su uso como larvicidas en el caso de mosquitos de la familia *Culicidae*, estos organismos en su fase adulta son los principales vectores de enfermedades infecciosas graves como malaria, dengue, fiebre amarilla o filariasis. Los principales géneros responsables de esta transmisión de enfermedades son: *Aedes* spp.,

*Anopheles* spp. y *Culex* spp. que causan graves problemas de salud humana y veterinaria a nivel mundial (Foster y Walker, 2018). Este método de control biológico ofrece grandes ventajas sobre los empleados anteriormente, ya que no inutilizan las fuentes de agua disponibles y no necesitan la introducción de especies exógenas en los ecosistemas acuáticos donde se desarrollan las larvas.

Para la obtención de las nanopartículas se emplearon diversos extractos y subproductos de los órganos vegetales como el látex, rizomas, extractos alcohólicos o acuosos; y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) como fuente metálica primordial. Como principal desventaja, nos encontramos con que estos biocidas también pueden afectar a los organismos larvicidas naturalmente presentes en el ecosistema, aunque varios estudios han demostrado baja o nula toxicidad para estos organismos, frente a una considerable actividad larvicida seguida de un aumento en la eficiencia depredadora. En definitiva, se ha conseguido abrir nuevas líneas de investigación para conseguir larvicidas respetuosos con el Medio Ambiente y eficaces en el control de vectores de enfermedades (Kojom Foko et al. 2021).

## 5. CONCLUSIÓN

Las enfermedades infecciosas son uno de los mayores desafíos de la Farmacia y la Medicina, desde que apareciesen de algún modo estas disciplinas; ya que son producidas por elementos invisibles para el ojo humano pero que causan graves estragos en la Salud Pública. Gracias a los avances en la ciencia durante los siglos XIX y XX, conseguimos ganar varias batallas contra estos microorganismos, pero no así la guerra o erradicación completa. Las constantes mutaciones y variaciones en el material genético hacen que estos minúsculos enemigos burlen nuestras defensas, posicionando estas enfermedades entre las responsables de gran cantidad de muertes o cronicidad de los estados patológicos.

Por tanto, ha surgido la Nanotecnología con una férrea implicación clínica, además de las otras muchas utilidades que potencialmente presenta. Esta ciencia reciente podría suponer un nuevo arma para combatir enfermedades infecciosas emergentes o que son viejas conocidas, pero que no hemos podido vencer; aunque también posee especial utilidad contra otras patologías importantes como el cáncer, el Alzheimer, etc.

La necesidad de buscar ayuda en la nanotecnología es el constante aumento en la resistencia a los antimicrobianos, la principal vía de tratamiento que tenemos contra las infecciones. Y es que en las nanopartículas se ha reunido todo el conocimiento clínico y tecnológico disponible para crear ventajosos tratamientos capaces de ejercer su acción en el lugar de la infección, luchar contra uno o varios tipos específicos de patógenos y posiblemente desterrar la Farmacología actual a un papel secundario, ya que existen nanoterapias prometedoras contra patologías graves.

Desde que el padre de la Microbiología, Louis Pasteur descubriese y acuñase el término vacuna, éstas constituyen una herramienta en constante desarrollo para protegernos y tratarnos de las infecciones. De ese modo, se han expuesto algunos casos de vacunas basadas en nanopartículas actualmente en estudio o comercializadas que presentan importantes mejoras con respecto a las tradicionales, tales como la infección sobre la cual van dirigidos, el proceso de industrialización, así como aquellas que afectarían al usuario final: el paciente.

Y es que el proceso de vacunación es una práctica clínica sencilla, de bajo riesgo para el receptor y con un efecto antimicrobiológico exacerbado en comparación con la terapia farmacológica clásica; y es que el sistema inmunitario es plenamente capaz de eliminar cualquier causante de enfermedad presente en el organismo si se le proporcionan las herramientas adecuadas.

Sobre ese aspecto se ha trabajado en las investigaciones expuestas, que persiguen la mayor biosimilitud posible, un aspecto clave en la inmunomodulación, haciendo que las nanopartículas se parezcan lo mas posible a un sistema infeccioso natural, lográndose así un efecto natural, duradero e inocuo para el paciente.

Por otro lado, la manera de obtener estas vacunas (principalmente basadas en proteínas) es industrialmente rentable, ya que emplea tecnología recombinante bien conocida y optimizada, con lo cual se podrían obtener líneas de producción capaces de surtir de vacunas desde el país más prospero hasta aquel con menos recursos, lográndose así una mayor calidad de vida en los países subdesarrollados y el control de enfermedades causantes de una gran mortalidad.

Del mismo modo, estas terapias también presentan un claro beneficio económico de cara a la producción de alimentos de origen animal ya que, si tenemos una ganadería más sana y próspera, se obtendrá un mayor rendimiento en la producción y mayor calidad en los productos, lo cual también repercute en la Salud del consumidor.

Estos tratamientos podrían llegar a desbancar a los actuales, pero mientras tanto forman una gran alianza contra las infecciones graves, ya que logran un efecto sinérgico importante y de mayor importancia que las asociaciones de fármacos actuales, ya que son capaces de actuar en el lugar específico donde el microorganismo causa estragos, pudiendo neutralizar toxinas o al propio microorganismo.

Por último, estas nanopartículas pueden producirse en grandes industrias químicas o de una manera más respetuosa con el medio ambiente, esto también ayudaría a paliar un problema como es el cambio climático.

En definitiva, las nanopartículas componen un vasto campo de investigación de especial interés clínico, que va desde la profilaxis al tratamiento de enfermedades, especialmente infecciosas, gracias a ello podríamos estar a punto de conocer tratamientos para graves infecciones como el VIH, el cólera, la Fiebre Amarilla, el dengue o la covid-19. Si esto llegase a ocurrir se traduciría en un aumento drástico de la esperanza de vida como ya ocurrió en el pasado cuando surgieron los antimicrobianos.



## 6. GLOSARIO

*Antígeno P27*: secuencia de 27 aminoácidos contenida en la proteína Tex1 (*Trophozoite exported protein*) de *Plasmodium* spp., que es esencial en el proceso de infección del parásito.

*Antígeno VIV2*: es una zona conocida y bien delimitada de la proteína HIV-1 Env, que en el ensayo clínico RV144 (fallido) se demostró que estaba involucrada en la reducción de la probabilidad de infección, es decir, que otorgaba profilaxis.

*Autoensamblado*: es un fenómeno espontáneo que existe en la naturaleza a escala tanto macromolecular como micromolecular en la que una serie de unidades se ordenan formando una determinada estructura o patrón.

*Bibliotecas de fragmentos de fagos*: son colecciones de bacteriófagos presentadores de antígenos que están detalladamente catalogadas. Son de especial utilidad en el desarrollo de biofármacos, especialmente anticuerpos y vacunas, ya que poseen la capacidad de unir y aislar anticuerpos o proteínas de una mezcla compleja.

*Ceftazidima*: es un antibiótico del grupo de las cefalosporinas de tercera generación de uso hospitalario, controlado y solo empleado cuando se agotan otras vías de tratamiento. Se suele emplear solo para infecciones graves por *P. aeruginosa* para evitar resistencias, aun así, es de gran espectro: gram-negativas, gram-positivas y anaerobios.

*Ciclo lisogénico de bacteriófagos*: Durante un ciclo lisogénico el virus entra en estado de latencia y su genoma queda insertado en el del hospedador bacteriano.

*Ciclo lítico de bacteriófagos*: los fagos con ciclo lítico producen una infección rápida del hospedador que concluye en la lisis de la célula y la liberación al exterior de nuevas copias del virus.

*CRISPR*: son las siglas en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromics Repeats* o Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas. Son una serie de técnicas que emplea enzimas endonucleasas como Casp9, que sirven como “tijeras moleculares” que reconocen y escinden ciertas regiones del ADN palindrómicas, esto permite eliminar ADN indeseado e introducir un determinado gen de interés. De especial utilidad en Biotecnología para modificar plásmidos y vectores de transcripción para optimizar la obtención de productos en biorreactores.

*Efecto Tyndall*: fenómeno físico que explica como las partículas coloidales en una disolución o gas son visibles porque reflejan o refractan la luz.

*Epítipo*: es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmune y a la que se unen específicamente los anticuerpos, los receptores de las células B o de las células T.

*Esfingolípido*: son lípidos complejos derivados de la esfingosina (aminoalcohol insaturado de 18 carbonos) presente en la membrana celular y actúan como segundos mensajeros de diversos procesos celulares.

*Fibrillas amiloideas*: son polímeros insolubles formados por subunidades proteicas de bajo peso molecular que provienen de precursores solubles que adquieren una estructura secundaria anormal en laminas  $\beta$  antiparalelas.

*Fluoróforo o fluorocromo*: es la parte o zona de una determinada molécula encargada de emitir fluorescencia.

*Paramagnetismo*: es la propiedad que posee un determinado material por la cual tiene una mayor permeabilidad magnética que el vacío, y es atraída hacia las zonas de mayor energía de un campo magnético.

*Piperacilina*: antibiótico beta-lactámico de tipo ureidopenicilina de amplio espectro, eficaz contra *P. aeruginosa* por vía intravenosa en asociación con inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa como Tazobactam.

*PLGA*: copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y ácido glicólico.

*Sonicación*: es una técnica de laboratorio consistente en la aplicación de ondas de ultrasonidos de baja frecuencia y alta intensidad a un medio líquido o pastoso. Las fuerzas generadas rompen partículas y gotitas, interrumpen las células e inician reacciones químicas. Por lo que se utiliza para homogeneización, molienda húmeda, dispersión, emulsificación, extracción...

*Teragnosis*: creación a partir de dos raíces que son: “tera” de terapia y “gnosis” de diagnóstico, se refiere, por tanto, al arte de tratar y diagnosticar en la misma operación.

*Ubiquitina*: es una pequeña proteína presente en células eucariotas con un papel principal en la ubiquitinación, un determinado tipo de modificación postraducciona en el que se modifican la estructura y función de una proteína o se degradan las mal sintetizadas.

*Virus Chikungunya*: es el agente etiológico de la fiebre Chikungunya, una enfermedad transmitida por mosquitos del género *Aedes* spp. Aparece un brote de fiebre alta acompañada de artralgia y mialgia. Aunque no es mortal por sí mismo, los dolores pueden durar varios días, meses o años.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Angsantikul P, Thamphiwatana S, Zhang Q, Spiekermann K, Zhuang J, Fang RH, et al. *Coating Nanoparticles with Gastric Epithelial Cell Membrane for Targeted Antibiotic Delivery against Helicobacter pylori Infection*. *Advanced Therapeutics* (2018);1(2):1800016.
- Aparna VA, Biswas R, Jayakumar R. *Targeted nanoparticles for treating infectious diseases*. In: *Biomimetic Nanoengineered Materials for Advanced Drug Delivery*. Elsevier; (2019). p. 169–85.
- Babych M, Bertheau-Mailhot G, Zottig X, Dion J, Gauthier L, Archambault D, et al. *Engineering and evaluation of amyloid assemblies as a nanovaccine against the Chikungunya virus*. *Nanoscale* (2018);10(41):19547–56.
- Bisso-Andrade A. *Resistencia a los antimicrobianos*. (2019). *Rev Soc Peru Med Interna*.;31(2):50–9.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., y Piddock, L. J. V. (2015). *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 42–51). Nature Publishing Group.
- Brooks, B. D., y Brooks, A. E. (2014). *Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance*. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 78, pp. 14–27). Elsevier.
- Bunea AI, Taboryski R. Recent advances in microswimmers for biomedical applications. *Micromachines* (2020);11(12):1–24.
- Butkovich N, Li E, Ramirez A, Burkhardt AM, Wang SW. *Advancements in protein nanoparticle vaccine platforms to combat infectious disease*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. (2020); 13:1681.
- Buzón P, Maity S, Roos WH. *Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics*. Vol. 12, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. Wiley-Blackwell; 2020. p. e1613.
- Cassini, A., Colzani, E., Pini, A., Mangen, M.-J. J., Plass, D., McDonald, S. A., Maringhini, G., van Lier, A., Haagsma, J. A., Havelaar, A. H., Kramarz, P., y Kretzschmar, M. E. (2018). *Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013*. *Eurosurveillance*, 23(16), 17–00454.
- Chen CW, Saubi N, Joseph-Munné J. *Design Concepts of Virus-Like Particle-Based HIV-1 Vaccines*. *Frontiers in Immunology* (2020); 11.
- Chen Y, Zhang Y, Chen M, Zhuang J, Fang RH, Gao W, et al. *Biomimetic Nanosponges Suppress In Vivo Lethality Induced by the Whole Secreted Proteins of Pathogenic Bacteria*. *Small* (2019);15(6):1804994.
- Cimica V, Galarza JM. *Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines*. *Clinical Immunology* (2017); 183:99–108.

- Coen DM, Whitley RJ. *Antiviral drugs and antiviral drug resistance*. Vol. 1, Current Opinion in Virology. Elsevier B.V.; 2011. p. 545–7.
- Das S, Angsantikul P, Le C, Bao D, Miyamoto Y, Gao W, et al. *Neutralization of cholera toxin with nanoparticle decoys for treatment of cholera*. PLoS Neglected Tropical Diseases (2018) 12(2): e0006266.
- Echevarría-Castillo, F. (2013). *Challenges of the present century: nanotechnology and health*. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 29, 3–15.
- Foster WA, Walker ED. *Mosquitoes (Culicidae)*. In: Medical and Veterinary Entomology. Elsevier; (2018) p. 261–325.
- Franc A. *Vaccines from the perspective of a pharmacist*. Česká a Slovenská Farmacie. (2020); 69:151–62.
- Frietze KM, Peabody DS, Chackerian B. *Engineering virus-like particles as vaccine platforms*. Current Opinion in Virology (2016);18:44–9.
- García Palomo, J. D., Agüero Balbín, J., Parra Blanco, J. A., y Santos Benito, M. F. (2010). *Infectious diseases: Concept, classification, general and specific aspects of infections. Criteria for infectious disease suspicion. Complementary diagnostic tests. Indication criteria*. Medicine, 10(49), 3251–3264.
- Garg H, Mehmetoglu-Gurbuz T, Joshi A. *Virus Like Particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus*. Scientific Reports (2020);10(1).
- Gutierrez-Millan C, Calvo Díaz C, Lanao JM, Colino CI. *Advances in Exosomes-Based Drug Delivery Systems*. Macromolecular Bioscience. (2021) 1;21(1).
- Han JA, Kang YJ, Shin C, Ra JS, Shin HH, Hong SY, et al. *Ferritin protein cage nanoparticles as versatile antigen delivery nanoplatfoms for dendritic cell (DC)-based vaccine development*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. (2014);10(3):561–9.
- Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. *Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections*. Clinical Microbiology Reviews. (2019); 32(4).
- Hos BJ, Tondini E, van Kasteren SI, Ossendorp F. *Approaches to improve chemically defined synthetic peptide vaccines*. Frontiers in Immunology. (2018);9(APR):884
- Hsueh BY, Waters CM. *Combating Cholera*. F1000Research [online]. (2019) [consultado el 20 de mayo de 2021]; 8:1000. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6492228/>
- Hutchings, M., Truman, A., y Wilkinson, B. (2019). *Antibiotics: past, present and future*. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 51, pp. 72–80). Elsevier Ltd.
- Hyman P, Abedon ST. *Bacteriophage: Overview*. In: Schmidt TM, editor. Reference Module in Biomedical Sciences. 4th ed. Elsevier; 2019, p. 441–457.

- Indelicato G, Burkhard P, Twarock R. *Classification of self-assembling protein nanoparticle architectures for applications in vaccine design*. Royal Society Open Science (2017);4(4).
- INE. Instituto Nacional de Estadística. *Defunciones según la Causa de Muerte Año 2018 Principales causas de muerte por grupos de enfermedades*. [en línea] Consultado en marzo de 2021, Disponible en: [https://www.ine.es/prensa/edcm\\_2018.pdf](https://www.ine.es/prensa/edcm_2018.pdf)
- INE. Instituto Nacional de Estadística. *Número medio de años potenciales de vida perdidos por la causa de muerte. 2018*. [en línea] Consultado en marzo de 2021, Disponible en: <https://www.ine.es/up/PBN2zZG5>
- Jackman JA, Yoon BK, Ouyang L, Wang N, Ferhan AR, Kim J, et al. *Biomimetic Nanomaterial Strategies for Virus Targeting: Antiviral Therapies and Vaccines*. Advanced Functional Materials (2021);31(12):2008352
- Jurač K, Nabergoj D, Podgornik A. *Bacteriophage production processes*. Applied Microbiology and Biotechnology (2019); 103(2):685–94.
- Karch CP, Burkhard P, Matyas GR, Beck Z. *The diversity of HIV-1 fights against vaccine efficacy: How self-assembling protein nanoparticle technology may fight back*. Nanomedicine (2021);16(8):673–80.
- Karch CP, Doll TAPF, Paulillo SM, Nebie I, Lanar DE, Corradin G, et al. *The use of a P. falciparum specific coiled-coil domain to construct a self-assembling protein nanoparticle vaccine to prevent malaria*. Journal of Nanobiotechnology (2017);15(1):62.
- Klimek L, Kündig T, Kramer MF, Guethoff S, Jensen-Jarolim E, Schmidt-Weber CB, et al. *Virus-like particles (VLP) in prophylaxis and immunotherapy of allergic diseases*. Allergo Journal International (2018);27(8):245–255.
- Kojom Foko LP, Eya'ane Meva F, Eboumbou Moukoko CE, Ntomba AA, Ekoko WE, Ebanda Kedi Belle P, et al. *Green-synthesized metal nanoparticles for mosquito control: A systematic review about their toxicity on non-target organisms*. Vol. 214, Acta Tropica. Elsevier B.V.; (2021). p. 105792.
- Lohia N, Baranwal M. *An immunoinformatics approach in design of synthetic peptide vaccine against influenza virus*. Methods in Molecular Biology. (2020); 2131:229–43.
- Lu M, Huang Y. *Bioinspired exosome-like therapeutics and delivery nanoplatfoms*. Biomaterials (2020); 242.
- Marcandalli J, Fiala B, Ols S, Perotti M, de van der Schueren W, Snijder J, et al. *Induction of Potent Neutralizing Antibody Responses by a Designed Protein Nanoparticle Vaccine for Respiratory Syncytial Virus*. Cell (2019);176(6):1420-1431.e17.
- Moruno Rodríguez, Á. (2017). *Resistencia a antibióticos en España*. [en línea] Consultado en marzo de 2021. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/11713>
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Introducción a la microbiología médica*. In: Microbiología Médica. 9th ed. Barcelona: Elseiver; (2021). p. 2–5.

- Nevagi RJ, Toth I, Skwarczynski M. *Peptide-based vaccines*. In: Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering. Elsevier Inc.; 2018. p. 327–58.
- Nguyen QD, Kikuchi K, Maity B, Ueno T. *The versatile manipulations of self-assembled proteins in vaccine design*. International Journal of Molecular Sciences. (2021); 22(4):1–21.
- Nooraei S, Bahrulolum H, Hoseini ZS, Katalani C, Hajizade A, Easton AJ, et al. *Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers*. Journal of Nanobiotechnology (2021);19(1):59.
- Nuñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Vilar-Pineda J, Martínez-Espinosa JC, de la Fuente-Hernández J, Castaño VM. *Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices* (2014) Vol. 9, International Journal of Nanomedicine. Dove Press; p. 3999–4006.
- Oechslin F. *Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy*. Viruses (2018); 10(7).
- Pájaro Castro, N., Olivero Verbel, J., y Redondo Padilla, J. (2013). *Nanotecnología aplicada a la medicina*. Guillermo de Ockham, 11, 125–133.
- Pan C, Wu J, Qing S, Zhang X, Zhang L, Yue H, et al. *Biosynthesis of Self-Assembled Proteinaceous Nanoparticles for Vaccination*. Advanced Materials (2020);32(42):2002940.
- Park BW, Zhuang J, Yasa O, Sitti M. Multifunctional Bacteria-Driven Microswimmers for Targeted Active Drug Delivery. ACS (2017);11(9):8910–23.
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, S., Balogh, L. P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., Bosi, S., Carril, M., Chan, W. C. W., Chen, C., Chen, X., Chen, X., Cheng, Z., Cui, D., Du, J., Parak, W. J. (2017). *Diverse Applications of Nanomedicine*. ACS Nano, 11(3), 2313–2381.
- Qian C, Liu X, Xu Q, Wang Z, Chen J, Li T, et al. *Recent progress on the versatility of virus-like particles*. Vaccines (2020); 8(1):139.
- Qiao J, Qi L. *Recent progress in plant-gold nanoparticles fabrication methods and bio-applications*. Vol. 223, Talanta. Elsevier B.V.; (2021). p. 121396.
- Qidwai A, Pandey A, Kumar R, Shukla SK, Dikshit A. *Advances in biogenic nanoparticles and the mechanisms of antimicrobial effects* (2018)., Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. Indian Pharmaceutical Association; Vol. 80. p. 592–603.
- Rai R, Bai J. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. (2011) *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* [en línea]. Consultado en abril de 2021; Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.459.8922yrep=replytype=pdf>
- Saadi M, Karkhah A, Nouri HR. *Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches*. Infection, Genetics and Evolution. 2017 Jul 1; 51:227–34.

- Sánchez Núñez, M. L., Eiros Bouza, J. M., Arbizu Rodríguez, R., y Rozada García, S. (2018). *Surveillance of antibiotic consumption in Spain: The importance of the DHD indicator*. In *Atencion Primaria* (Vol. 50, Issue 3, pp. 199–200).
- Syomin B v., Ilyin Y v. *Virus-Like Particles as an Instrument of Vaccine Production*. *Molecular Biology* (2019);53(3):323–34.
- Tao P, Zhu J, Mahalingam M, Batra H, Rao VB. *Bacteriophage T4 nanoparticles for vaccine delivery against infectious diseases*. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2019); 145:57–72.
- Wang L, Hu C, Shao L. *The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future*. Vol. 12, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd.; 2017. p. 1227–49.
- White HE., Orlova E. *Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function*. In: Savva R, editor. *Bacteriophages - Perspectives and Future* [online]. IntechOpen; 2020 [consultado el 19 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://bit.ly/344GSID>
- Wu Y, Norberg PK, Reap EA, Congdon KL, Fries CN, Kelly SH, et al. *A Supramolecular Vaccine Platform Based on  $\alpha$ -Helical Peptide Nanofibers*. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. (2017);3(12):3128–32
- Zalewska-Piątek B, Piątek R. *Bacteriophages as Potential Tools for Use in Antimicrobial Therapy and Vaccine Development*. *Pharmaceuticals* (2021); 14(4):331.
- Zhao G, Chandrudu S, Skwarczynski M, Toth I. *The application of self-assembled nanostructures in peptide-based subunit vaccine development*. *European Polymer Journal* (2017); 93:670–81.
- Zhu J, Ananthaswamy N, Jain S, Batra H, Lewry DA, Richards ML, et al. *A Universal Bacteriophage T4 Nanoparticle Platform to Design Multiplex SARS-CoV-2 Vaccine Candidates by 2 CRISPR Engineering*. *bioRxiv* (2021); 2021.01.19.427310.