

RESUMEN EXTENSO

En las últimas décadas se ha dado un aumento alarmante de bacterias resistentes a los antibióticos. El uso irresponsable y el abuso de los que hacemos de ellos son las principales razones para el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias. Estos caracteres que confieren resistencias se pueden adquirir a través de la mutación y/o debido al intercambio o transferencia del material genético entre distintos microorganismos, además de la capacidad de algunas bacterias para formar biopelículas, que incrementa 1000 veces más su resistencia, consiguen desarrollar varios mecanismos que pueden “neutralizar” los antibióticos. El uso de los antibióticos crea una presión de selección eliminando a todas las bacterias no resistentes y formando una población inmune al agente antimicrobiano al poderse dividir sin competencia.

Las infecciones bacterianas son una de las principales causas de muerte en todo el mundo y están asociadas con la mayor tasa de morbilidad y mortalidad. Los aumentos de las infecciones de las bacterias resistentes causan efectos directos sobre la salud. Actualmente, es uno de los principales problemas para la salud pública causando enfermedades que son difíciles de tratar, muertes y enormes pérdidas financieras, así como la falta de desarrollo de nuevos antibióticos hacen que la resistencia bacteriana sea un gran problema que nos concierne a todos. Se estima que 700000 personas mueren globalmente al año de infecciones producidas por microbios patógenos comunes que han desarrollado resistencia a antimicrobianos tradicionales. La resistencia bacteriana conlleva un gasto económico en los servicios sanitarios con más de \$20 billón al año. Se predice que, en 2050, 10 millones de personas morirán anualmente por infecciones causadas por microbios patógenos resistentes a los antimicrobianos tradicionales, superando las muertes ocasionados por cáncer, diabetes o problemas cardiovasculares con un coste económico mundial de \$100 trillón anual.

Entre las bacterias multiresistentes, se encuentra *P. aeruginosa*, bacteria oportunista Gram-negativa, que es una causa frecuente de infecciones nosocomiales debido a su alta prevalencia y patogenicidad. Posee un gran número de factores de virulencia asociados a ella, produce exotoxinas, enzimas, lipopolisacáridos que pueden dañar o matar las células y/o degradar los componentes celulares. Causa entre un 60-70% de queratitis en personas que usan lentes de contacto además de producir otras infecciones oculares como la conjuntivitis bacteriana, escleritis, dacriocistitis, celulitis orbital o endoftalmitis pudiendo originar la pérdida de visión, perforación ocular e incluso pérdida del globo ocular.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar materiales antibacterianos nanoestructurados destinados a prevenir la propagación de bacterias y la ocurrencia de infecciones, además de la prevención de biopelículas bacterianas. El fundamento del trabajo consiste en la integración de una innovadora combinación de biopolímeros, nanopartículas (NPs) y componentes

antibacterianas e irradiación sonoquímica para desarrollar superficies nanoestructuradas en materiales de silicona basados en nuevas terapias híbridas con modos de acción complementaria.

Para poder lograr este objetivo, se han elegido dos estrategias. La primera es la combinación de NPs de cobre antibacterianas y el biopolímero biocompatible ácido hialurónico y la segunda es la combinación de zwitteriónico antiincrustante metacrilato de sulfobetaína y péptido antibacteriano polimixina B. Estos enfoques novedosos apuntan a erradicar el patógeno bacteriano y prevenir la adhesión de la bacteria y la formación de biopelículas, y la posterior aparición de infección bacteriana.

Así mismo, es importante que estos materiales sean altamente efectivos y también biocompatibles sin producir toxicidad en las células humanas o afectar sus morfologías, es decir, debe existir compatibilidad con las células para su posterior uso para lentes de contacto terapéuticas.

Las NPs presentan muchas ventajas, entre ellas, la creación de películas delgadas de NPs sobre un material sólido, poseen la misma o mayor eficacia a menor dosis comparada con sus formas libres o en escala macro, mayor internalización del dicho compuesto e interacción con diversas células gracias a su alta relación área/volumen. Todo ello la convierte en una estrategia para superar y mejorar los antibióticos tradicionales.

El método utilizado para la obtención de las NPs es mediante la aplicación del ultrasonido, parte del espectro de sonido con una frecuencia mayor al oído humano. Son capaces de producir ondas que genera constantemente la creación, expansión y destrucción de microburbujas conocido como la cavitación. Estas burbujas creadas colapsan violentamente y envían ondas de choque que produce fuerte adherencia a la sustancia circundante. La sonificación de soluciones acuosas ofrecen la ventaja de poder combinar diferentes compuestos en un solo, asimismo la producción simultánea de recubrir el sustrato sólido presente en el medio. Por ello se aplica en diferentes campos industriales ya que es un proceso económico, mejora la productividad y el rendimiento.

Las partículas metálicas del cobre son conocidos por ser agentes antimicrobianas fuertes, aunque sus mecanismos de acción no se comprenden completamente. Pero se hipotetiza que, debido a su capacidad para captar y ceder electrones, las nanopartículas de Cu (NPs Cu) se oxidan al interactuar con la membrana celular debido a la mayor concentración de O₂ en el medio celular. Sus mecanismos de acciones son variables: causan la ruptura de la pared, disrupción de la membrana citoplasmática, aumento del estrés oxidativo, produce alteraciones en las síntesis de las proteínas y daños en las enzimas funcionales y por último motiva la muerte y degradación de ADN celular.

El ácido hialurónico (AH), es un polisacárido natural, biocompatible y biodegradable con muchos beneficios sobre los tejidos celulares, además de ello, el AH, ha demostrado una marcada inhibición del crecimiento bacteriano sobre las superficies en las que se encuentra porque exhibe propiedades contra la adhesión y la formación de biopelícula. Al ser un biopolímero natural que se encuentran en muchas estructuras celulares sirve para mejorar la biocompatibilidad en la síntesis

de nanopartículas metálicas y reducir así su toxicidad en la célula ya que pueden usarse como agentes reductores de la sal que presentan las partículas metálicas.

En este experimento, también hacemos uso de la polimixina B que ejerce su efecto antimicrobiano a través de su acción detergente catiónica sobre las membranas celulares fijando su porción catiónica a la porción aniónica de la membrana de las bacterias Gram-negativa. Posteriormente, la porción de ácido graso de la polimixina B se disuelve en la región hidrófoba de la membrana celular bacteriana. Esto da como resultado una alteración en la estructura de la membrana celular que subsecuentemente conducirá a la muerte celular.

Un zwitterion es un compuesto químico eléctricamente neutro, pero con carga positiva y negativas en diferentes átomos. son compuestos polares y hidrofílicas. El polímero zwitteriónico de metacrilato de sulfobetaina (SBMA) ha demostrado tener acciones antiadhesiva gracias a las fuertes interacciones electrostática con las moléculas de agua. Evitan la adhesión de las bacterias, previniendo la formación de biopelículas mediante su carga, pueden formar una capa muy hidratada y minimiza los dipolos.

La funcionalización de los nuevos recubrimientos multifuncionales nanoabilitables sobre materiales de silicona con la combinación de nanopartículas de Cu y AH-ADH, y SBMA, combinado con polimixina B, utilizando ultrasonoquímica para producir un recubrimiento en un solo paso. En las que evaluamos subsecuentemente sus actividades antibacterianas, sus capacidades contra la formación de biopelícula sobre la superficie de las láminas de siliconas y por último analizaremos la toxicidad frente a líneas celulares de fibroblastos y queratinocitos.

La aplicación de ambos compuestos en la superficie de silicona mejoró sus propiedades antibacterianas y antibiopelículas. Los materiales nanoestructurados híbridos diseñados demostraron una aumentada actividad antibacteriana y una reducción de la viabilidad celular del 99.9%, comparado con la silicona prístina.

En los ensayos de anticolonización, en los que se evalúa la capacidad de las bacterias para formar una biopelícula en un material, las siliconas recubiertas solo con AH-ADH y la SBMA muestran mayor actividad de anticolonización que las siliconas control de Cu y polimixina B, lo que demuestra que son los principales compuestos contra la formación de biopelícula sobre la superficie de la silicona. Aunque estas cualidades son más evidentes en los complejos formados, con mayor énfasis en SBMA y polimixina B.

Los resultados del ensayo de la actividad antibacteriana de las siliconas recubiertas con la hibridación de las NPs de Cu con AH-ADH obtuvimos 3.2 logs de reducción de concentración de bacterias, con una equivalencia de 99.9% de efectividad contra la *P. aeruginosa*, aunque en el ensayo de inhibición de biopelículas, la deposición de NPs de Cu y AH-ADH sobre la superficie de la silicona mostró una ligera reducción de la viabilidad de las células bacterianas dentro de las estructuras de biopelículas, aunque pudiendo deberse por diferentes causas a los que no tuvimos

suficiente tiempo para investigar. En las hibridaciones con SBMA con polimixina B fueron en general muy positivas, demostró un efecto sinérgico y las nanoestructuras producidas eran capaces de eliminar la *P. aeruginosa*. En los ensayos de la actividad antibacteriana obtuvimos 8 logs de reducción y una excelente inhibición contra la formación de biopelículas sobre la superficie de las siliconas, reduciendo en 4 logs la concentración bacteriana en la silicona. Los resultados de tinción de cristal violeta y Live/Dead kit ensayos demostraron una capacidad elevada de los recubrimientos híbridos anticolonización e impidieron la formación de biopelículas en casi un 100 % en SBMA con polimixina B. Tanto la hibridación de AH-ADH con Cu y SBMA con polimixina B mostraron una buena biocompatibilidad, en los ensayos de citotoxicidad con las células humanas utilizadas.

Estos compuestos novedosos pueden ser aplicados en múltiples campos de la biomedicina, tomando en consideración que hay un aumento del uso de prótesis e implantes artificiales en diversos ámbitos, como remedio para evitar las infecciones asociadas a estas prácticas. Concretando sus usos en el campo de la salud ocular, creemos que estos compuestos pueden ser útiles como tratamientos superficiales en lentes de contacto, enfatizando en especial las de uso prolongado como las lentes de contacto terapéuticas y en las prótesis oculares.

Por último, al tratarse de unos compuestos y técnicas novedosas aún queda muchas investigaciones que se pueden llevar a cabo para un mayor entendimiento y un mejor análisis de sus comportamientos, además, de las actividades de estos compuestos en diferentes escenarios y a largo plazo