

Polímeros biodegradables con moléculas biológicamente activas para la prevención de infecciones en dispositivos biomédicos

E. Sanchez-Rexach, E. Meaurio, J.R. Sarasua

Departamento de Ingeniería Minera y Metalúrgica y Ciencia de los Materiales, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Bilbao, España, evagloria.sanchez@ehu.es

Resumen

Casi la mitad de las infecciones nosocomiales (aquellas contraídas durante la hospitalización) están asociadas a la utilización de dispositivos biomédicos. Son infecciones difíciles de tratar y muchas de ellas, implican la extracción del dispositivo. Un factor esencial es la formación de biofilm alrededor del implante, ya que constituye una fuerte barrera bacteriana frente a los antibióticos. Para prevenir las infecciones en este tipo de dispositivos, se han usado dos estrategias: la biofuncionalización superficial del implante con un péptido antifouling que evite la adhesión de las bacterias que forman el biofilm, y la formación de dispersiones sólidas amorfas (ASDs) constituidas por mezclas polímero-fármaco miscibles y con fuertes interacciones intermoleculares, para una liberación controlada del fármaco durante la etapa de curación. El uso de polímeros biodegradables, permite que el implante pueda ser absorbido por el cuerpo tras finalizar su función.

1. Introducción

Los materiales poliméricos han ido desplazando paulatinamente a materiales tan tradicionales como los metales o los cerámicos en el campo de la medicina. El uso de biopolímeros supone un gran avance, ya que, además de ser materiales preparados para actuar con sistemas biológicos, poseen una gran versatilidad en cuanto a propiedades mecánicas y de biodegradación.[1] Combinando estos materiales con moléculas biológicamente activas, se pueden fabricar dispositivos biomédicos capaces de prevenir infecciones, con la ventaja de que pueden degradarse dentro del cuerpo después de cumplir con su cometido, lo que supone una mejora en la calidad de vida de los pacientes.

La principal causa de infecciones en dispositivos biomédicos es la formación de biofilm, que consiste en una red bacteriana muy resistente a los antibióticos.[2] En estos casos, la bacteria responsable de la infección crece adherida sobre la superficie del implante formando comunidades de bacterias, y una vez que el biofilm se ha establecido, los tratamientos antibióticos resultan poco efectivos, porque las bacterias se hayan protegidas dentro del biofilm. Dado que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos, la mayoría de las veces se hace necesario sustituir el implante. Es especialmente importante evitar la formación de biofilm en implantes ortopédicos, porque una infección en estos casos, supondría una segunda cirugía para extraer la prótesis.

Por otro lado, la liberación controlada de fármacos implica conseguir la cantidad correcta, en el momento

adecuado y en lugar preciso. Con la mayoría de los sistemas convencionales para la administración de un fármaco, el nivel de dicha sustancia en el organismo alcanza un valor máximo y después cae hasta un mínimo, siendo necesaria la aplicación de una nueva dosis. Además, si el máximo o el mínimo de concentración del fármaco en el medio se sitúan por encima del nivel de toxicidad o por debajo del nivel mínimo efectivo, se pueden producir de forma alternante períodos de toxicidad y de ineficacia. Esta situación es particularmente problemática si ambos niveles (toxicidad y efectividad) están muy próximos. En este punto, los sistemas poliméricos presentan la ventaja de que son capaces de mantener la concentración del fármaco entre esos dos niveles a partir de una única dosis, así como de liberarla de una forma continua en un tiempo determinado.

En medicina, existen múltiples ejemplos de dispositivos poliméricos liberadores de fármacos. Por ejemplo, el poli(metil metacrilato) (PMMA) se usa como cemento para la fijación de prótesis y puede ir cargado con antibióticos como la tobramicina o el sulfato de gentamicina, con el fin de prevenir la osteomielitis.[3] Del mismo modo, polímeros biodegradables como la poli- ϵ -caprolactona (PCL), las polilactidas (PLA) o copolímeros lactida-glicolida (PLGA) son habituales en la fabricación de stents.[4] Un *stent* es un dispositivo con forma de tubo que se inserta en un conducto obstruido (coronario, urinario, etc.), para desbloquearlo y mantenerlo abierto. Los primeros stents metálicos suponían una solución a corto plazo, ya que la presencia de un material extraño provoca la agregación plaquetaria que da lugar a una nueva obstrucción, conocida como "restenosis". Los stents coronarios liberadores de fármacos han conseguido reducir hasta en un 70 % los casos de restenosis.[5]

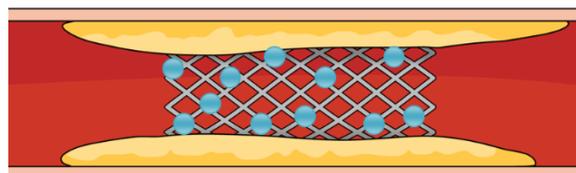


Figura 1. Stent liberador de fármaco

En este trabajo se han usado dos vías para combatir las infecciones: la liberación controlada de fármacos desde los dispositivos, y la creación de superficies antifouling que evite la formación de biofilm en los mismos. El material que se ha elegido como candidato para la fabricación de dispositivos biomédicos, ha sido el polímero biodegradable PCL. Por una parte, se han formado mezclas miscibles con el antibiótico cloranfenicol (CAM) para su liberación de forma controlada desde la matriz polimérica y por otra, se ha recubierto el biopolímero con un tripéptido sintético con carácter antifouling capaz de interferir con la primera etapa de la formación del biofilm.

2. Sistemas poliméricos para la liberación controlada de fármacos: estudio de miscibilidad, interacciones, cinéticas de liberación y actividad antibacteriana

La efectividad de un dispositivo liberador de fármaco depende de la forma en la que el fármaco es liberado, determinada por la interacción con la matriz polimérica. Un sistema ideal presenta una liberación brusca inicial que responda al elevado riesgo de infección durante la intervención, seguido de una liberación sostenida dentro del intervalo terapéutico deseado para prevenir las infecciones microbianas en el implante durante la fase de curación. Este mecanismo de liberación se da en los sistemas polímero-fármaco.

Las dispersiones sólidas amorfas (ASDs) buscan dispersar los fármacos en estado amorfo dentro de la matriz polimérica, ya que un fármaco en estado amorfo presenta una solubilidad y por tanto una biodisponibilidad mucho mayores que en estado cristalino.[6] Las ASDs más estables son aquellas en las que la mezcla polímero-fármaco es miscible y presenta fuertes interacciones intermoleculares. En este tipo de sistemas se puede llegar a suprimir totalmente la cristalización del fármaco, debido a que las interacciones específicas entre las cadenas poliméricas y los grupos funcionales del fármaco, reducen la movilidad molecular y a su vez, la recristalización.

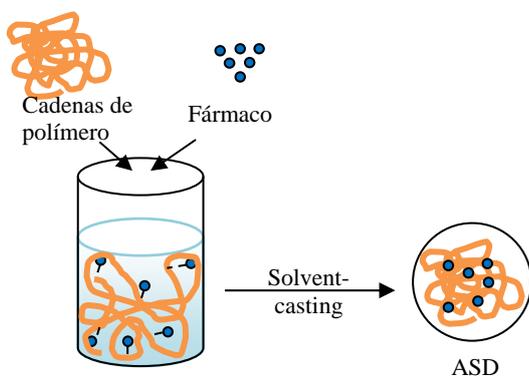


Figura 2. Formación vía solvent-casting de las dispersiones sólidas amorfas (ASDs)

2.1. Mezclas de PCL con el antibiótico cloranfenicol

La PCL es un polímero semicristalino ampliamente usado en la producción de dispositivos biomédicos, cuya degradación puede durar desde varios meses hasta años dependiendo del peso molecular, cristalinidad y condiciones de degradación, haciéndolo adecuado para aplicaciones biomédicas a largo plazo, como implantes. Por otra parte, el cloranfenicol (CAM) es un antibiótico de amplio espectro capaz de tratar efectivamente infecciones causadas por bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Escherichia coli*;^[7] sin embargo, es un fármaco poco hidrosoluble y administrado por vía oral, puede permanecer sin disolver en el tracto gastrointestinal, de manera que no es absorbido por el organismo y termina siendo excretado.

La miscibilidad del sistema PCL/CAM se analizó por calorimetría diferencial de barrido (DSC), atendiendo al criterio de una temperatura de transición vítrea (T_g) única e intermedia a las de los componentes puros, y a través de la morfología esferulítica por AFM, para determinar qué composiciones forman las dispersiones sólidas amorfas más estables. Se encontró que, en sistemas miscibles, la movilidad de las cadenas poliméricas durante el proceso de cristalización se ve reducida debido a las interacciones moleculares con el fármaco. En el caso de la mezcla PCL/CAM, la estructura hexagonal de las esferulitas de la PCL se ve deformada por las interacciones específicas que se dan entre los grupos carbonilo del polímero y los grupos hidroxilo del fármaco ($-C=O \cdots H-O-$).

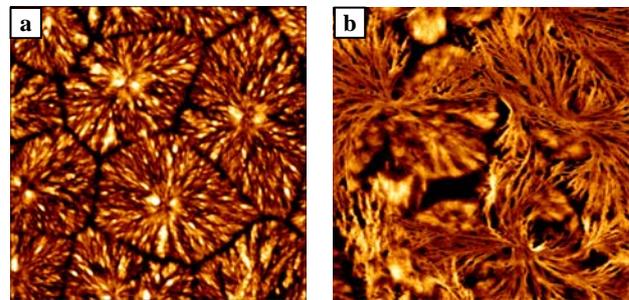


Figura 3. Imagen topográfica de AFM: a) esferulitas de PCL, y b) PCL/CAM 50/50 donde los límites de las esferulitas de la PCL se ven distorsionados por las interacciones específicas con el cloranfenicol

La cinética de liberación fue estudiada midiendo la concentración de fármaco liberado a determinados intervalos de tiempo, desde filmes de PCL/CAM inmersos en una solución buffer a 37 °C que simula el plasma humano, mediante espectroscopía UV-Vis. En el sistema PCL/CAM 95/5, donde todo el antibiótico se encuentra en estado amorfo debido a las fuerzas intermoleculares establecidas entre ambas especies, un 40 % del fármaco se libera en los primeros 10 minutos, seguido de una liberación constante. La solución penetra en la matriz polimérica provocando su hinchamiento; ésta se ensancha, y el cloranfenicol es liberado por difusión. Este mecanismo responde a un sistema ideal de liberación de fármacos para dispositivos biomédicos, ya que la

liberación brusca inicial sirve para hacer frente al riesgo de infección durante la implantación, y la posterior liberación constante a una concentración terapéutica efectiva, para contrarrestar una posible infección latente.[8]

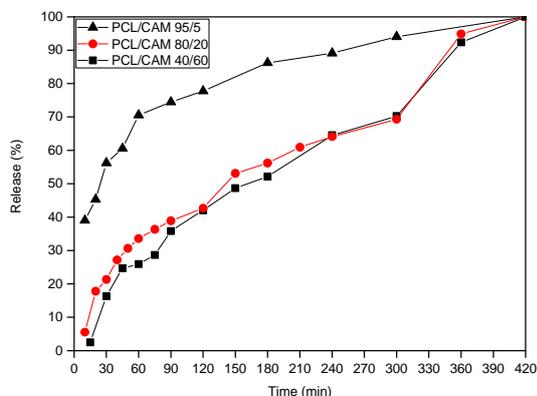


Figura 4. Perfil de liberación para muestras de PCL/CAM obtenidas por solvent-casting de 1 cm² y 100 μm de espesor, inmersas en 100 ml de PBS a 37°C durante 7 h

La actividad antibacteriana del sistema polímero-fármaco, se estudió mediante el método de difusión en agar. En primer lugar, se sumergieron muestras del sistema PCL/CAM 50/50 en solución buffer a 37 °C durante 24 horas, para asegurar la liberación de todo el antibiótico. Posteriormente, se vertieron gotas del líquido resultante de la liberación sobre placas de agar en las que previamente se había inoculado una capa de la bacteria *Escherichia Coli*, bacteria frecuente en infecciones del tracto urinario asociadas al cateterismo. Finalmente, se compararon las zonas de inhibición generadas con los controles negativo (líquido resultante de sumergir muestras de PCL en PBS) y positivo (disolución de cloranfenicol de 1 mg/ml).[9]



Figura 5. Inhibición bacteriana en agar: a) control negativo – PBS en el que ha estado PCL; b) control positivo – disolución de 1 mg/ml de cloranfenicol; y c) PBS con el antibiótico liberado de la muestra PCL/CAM 50/50 con una concentración de CAM de 0,7 mg/ml

Los resultados confirmaron que la miscibilidad aumenta la concentración de antibiótico amorfo, y aumenta por tanto su biodisponibilidad y poder bactericida.

3. Biopolímeros con propiedades antifouling: PCL modificado con un tripéptido sintético biocompatible que interfiere en la formación de biofilm

El biofouling se define como la acumulación de microorganismos indeseables, como bacterias, hongos, diatomeas, algas, plantas o animales, que se adhieren a las superficies. En el caso de bacterias, este proceso deriva en la formación de una red bacteriana llamada biofilm resistente a los antibióticos. La formación de biofilm en dispositivos biomédicos puede generar graves infecciones, especialmente frecuentes durante la estancia hospitalaria. Los materiales antifouling alteran las propiedades de las superficies, para prevenir la acumulación de microorganismos sobre los sustratos.

En este trabajo se empleó un tripéptido biocompatible con carácter antifouling, el cual, cuenta en su estructura con un grupo DOPA (principal componente del pegamento natural que usan los moluscos para agarrarse a las rocas) que le dota de la capacidad de adherirse espontáneamente a las superficies en medio básico, y que cuenta también con grupos fluorados que le proporcionan la cualidad antiadherente. De esta forma, las superficies recubiertas con este péptido sintético son capaces de hacer frente al perjudicial proceso de biofouling.[10]

Con el objetivo de investigar la actividad antifouling de superficies de PCL recubiertas con péptido, se sumergieron durante 2 horas muestras del polímero obtenidas por casting en disoluciones de 2 mg/ml de péptido en medio básico.



Figura 6. Imagen de TEM correspondiente a un filme de PCL modificado superficialmente con el péptido antifouling

Las superficies, tanto de PCL (control) como las de PCL modificadas con péptido, fueron incubadas durante una noche a 37 °C en un medio de cultivo (TSB) que contenía 10⁷ CFU/ml de *E. coli*. Posteriormente, las colonias formadas durante la incubación fueron arrastradas de las superficies y cultivadas sobre placas agar durante 15 horas a 37 °C. Como último paso, se procedió al recuento

de las colonias formadas, para poder comparar el número de colonias adheridas a las superficies de PCL con las que se habían pegado a las de PCL recubiertas con péptido.

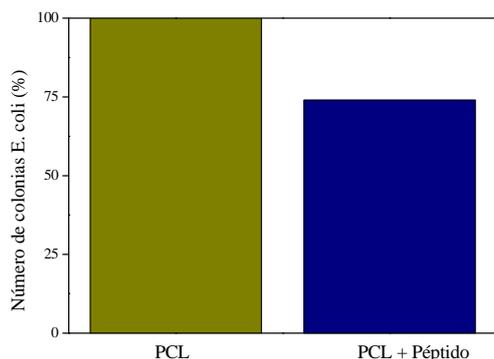


Figura 7. Comparativa de colonias de *E.coli* adheridas a las superficies de PCL recubiertas de péptido antifouling

Se observó una reducción en la formación de colonias de *E. coli* de un 26 %.

4. Conclusiones

En los últimos años, los dispositivos médicos han pasado de ser un mero soporte, a ser aparatos inteligentes que ayudan con el proceso de curación. La ingeniería biomédica se está enfocando en la fabricación de implantes bioactivos, es decir, con una funcionalidad adicional que ayude a la recuperación del paciente. En el caso de los dispositivos liberadores de fármacos biodegradables, el reto está en diseñar el perfil de liberación del fármaco, las propiedades mecánicas y la velocidad de degradación del dispositivo, para cada problemática. Hay que saber dónde, cuándo y cuánto fármaco es necesario en cada caso.

En este contexto, los materiales poliméricos ofrecen todo un mundo de posibilidades y permiten mejorar sustancialmente la eficacia de los medicamentos, dirigiéndolos hacia el objetivo y reduciendo los efectos secundarios que acarrearán una dosis excesiva.

La combinación de los polímeros biodegradables con moléculas biológicamente activas, tiene un gran potencial en cuanto a mejorar la efectividad de nuevos fármacos, y ese valor añadido que se le aporta a los dispositivos biomédicos es claramente interesante tanto clínicamente como comercialmente.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda económica del Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO (MAT2016-78527-P) y a la EU iPROMEDAI COST Action TD1305.

Referencias

- [1] Fernández J, Etxeberria A, Sarasua JR. In vitro degradation studies and mechanical behavior of poly(ϵ -caprolactone-co- δ -valerolactone) and poly(ϵ -caprolactone-co-L-lactide) with random and semi-alternating chain microstructures. *European Polymer Journal*, 71, 2015, pp 585-595.
- [2] Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem. Soc. Rev.*, 35 (9), 2006, pp 780-789.
- [3] Baro M, Sanchez E, Delgado A, Perera A, Evora C. In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J. Controlled Release*, 83 (3), 2002, pp 353-64.
- [4] Sanchez-Rexach E, Meaurio E, Sarasua JR. Recent developments in drug eluting devices with tailored interfacial properties. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.005>.
- [5] Kukreja N, Onuma Y, Serruys PW. Future directions of drug-eluting stents. *J. Interv. Cardiol.*, 22, 2009, pp 96-105.
- [6] Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, 12(23), 2007, pp 1068-1075.
- [7] Kalita S, Devi B, Kandimalla R, Sharma KK, Sharma A, Kalita K, Katakai AC, Kotoky J. Chloramphenicol encapsulated in poly- ϵ -caprolactone-pluronic composite: nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2015, pp 2971-2984.
- [8] Teja SB, Patil SP, Shete G, Patel S, Bansal AK. Drug-excipient behavior in polymeric amorphous solid dispersions. *J. Excipients and Food Chem.*, 4 (3), 2013, pp 70-94.
- [9] Thomas MB, Metoki N, Geuli O, Sharabani-Yosef O, Zada T, Reches M, Mandler D, Eliaz N. Quickly Manufactured, Drug Eluting, Calcium Phosphate Composite Coating. *Chemistry Select*, 2, 2017, pp 753 - 758.
- [10] Maity S, Nir S, Zada T, Reches M. Self-assembly of a tripeptide into a functional coating that resists fouling. *Chem. Commun.*, 50, 2014, pp 11154-11157.