



GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

NANOMEDICINAS PARA EL TRATAMIENTO PULMONAR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

NANOMEDICINES FOR THE PULMONARY TREATMENT OF
CYSTIC FIBROSIS

Autor/a: MARTA GARCÍA CARRASCO

Director/es: LORENA GARCÍA HEVIA
MÓNICA LÓPEZ FANARRAGA

Santander, a 20 de marzo de 2024

ÍNDICE

Resumen	3
Palabras clave	3
1. Fibrosis quística	4
1.1. Introducción	4
1.1.1. Descripción de la enfermedad	4
1.1.2. Patogénesis y clínica	5
1.2. Diagnóstico.....	8
1.3. Tratamientos actuales	9
2. Nanomedicina	13
2.1. Introducción.....	13
2.2. Ventajas de los nanomateriales en el tratamiento de la fibrosis quística	15
2.2.1. Pegilación	16
2.2.2. Mucolíticos	19
2.3. Nanomateriales en tratamiento sintomáticos	22
2.3.1. Infección bacteriana	22
2.3.2. Curcumina	25
2.4. Nanomateriales en la liberación de fármacos	27
2.4.1. Nanopartículas dirigidas y respondedoras de estímulos	30
2.5. Nanomateriales en terapia génica.....	31
2.5.1. Papel del ácido nucleico peptídico (PNA) unido a nanopartículas biodegradables en la reparación del ADN mutado	31
2.5.2. CRISPR/CAS9	32
2.5.3. Otras formas de abordar el gen	33
2.6. Nanomateriales en la fagoterapia	34
3. Conclusiones	37
4. Agradecimientos	38
5. Bibliografía	38

RESUMEN

La fibrosis quística es una enfermedad genética multisistémica causada por una mutación del gen CFTR, que participa en el transporte iónico y la regulación de líquidos en diferentes tejidos. Su disfunción ocasiona secreciones espesas que obstruyen diferentes órganos como pulmón o páncreas, aumentando su susceptibilidad a infecciones bacterianas recurrentes y perpetuando un círculo vicioso que desemboca en disfunción orgánica. Los tratamientos actuales se basan en un conjunto de terapias sintomáticas y moduladores del gen CFTR que son incapaces de corregir todos los defectos y presentan limitaciones en cuanto a biodisponibilidad y efectos secundarios. La nanomedicina nace para mejorar las estrategias actuales, presentando numerosos beneficios y resultados alentadores. Cabe destacar el papel que ejercen los diferentes nanomateriales en cuanto a atravesar las barreras biológicas, proteger la molécula encapsulada frente a la degradación, alcanzar el lugar diana para ejercer su acción e interactuar con células de los seres humanos gracias a su gran similitud. A pesar de dichos avances, se sigue requiriendo investigación adicional para comprender totalmente su impacto. En este trabajo se desarrollan las diferentes aplicaciones de la nanomedicina en el tratamiento de la fibrosis quística.

ABSTRACT

Cystic fibrosis is a multisystem genetic disease caused by a mutation of the CFTR gene, which is involved in ionic transport and fluid regulation in different tissues. Its dysfunction causes thick secretions that obstruct different organs such as the lung or pancreas, increasing their susceptibility to recurrent bacterial infections and perpetuating a vicious circle that leads to organ dysfunction. Current treatments are based on a set of symptomatic therapies and CFTR gene modulators, both unable to correct every single default and with limitations in terms of bioavailability and side effects. Nanomedicine was born to improve current strategies, presenting numerous benefits and encouraging results. It is worth highlighting the role played by different nanomaterials in terms of crossing biological barriers, protecting the encapsulated molecule against degradation, reaching the target site to exert its action and interacting with human cells thanks to their great similarity. Despite such advances, additional research is still required to fully understand its impact. In this work, the different applications of nanomedicine in the treatment of cystic fibrosis are developed.

PALABRAS CLAVE

Fibrosis quística, Gen CFTR, Nanomedicina, Nanomateriales.

KEYWORDS

Cystic fibrosis, CFTR gene, Nanomedicine, Nanomaterials.

1. FIBROSIS QUÍSTICA

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno autosómico recesivo multisistémico presente en aproximadamente 1/3500 nacimientos, que ocurre principalmente en la raza caucásica (1). Se produce como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR), localizado en el brazo largo del cromosoma 7, concretamente en 7q31.2. Se han identificado más de 1.900 mutaciones, de las cuales 'F508del' (la delección de tres bases que codifican la fenilalanina en la posición 508) es la más común (2).

Las mutaciones del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística son clasificados en grupos según cómo disminuye la proteína CFTR su síntesis, función o estabilidad. Esto ha sido fundamental en el desarrollo de terapias de moléculas pequeñas para tratar defectos subyacentes.

- 1) Las mutaciones de clase I (sin sentido) suelen ser codones de terminación prematuros que conducen a una proteína CFTR truncada y no funcional (por ejemplo, G542X y W1282X).
- 2) Las mutaciones de clase II, como F508del, provocan un plegamiento incorrecto de la proteína y una reducción de su llegada a la superficie celular.
- 3) Las mutaciones de clase III (de activación), como G551D, permiten la entrega adecuada de proteína a la superficie, pero el canal no se abre correctamente.
- 4) Las mutaciones de clase IV conducen a canales de proteínas en la superficie, que se abren correctamente, pero la conductancia aniónica general se reduce.
- 5) Las mutaciones de clase V provocan una transcripción de proteínas reducida y una menor producción de CFTR.
- 6) Las mutaciones de clase VI conducen a una estabilidad reducida de la proteína CFTR en la superficie celular (1).

Nanomedicinas para el tratamiento pulmonar de la fibrosis quística

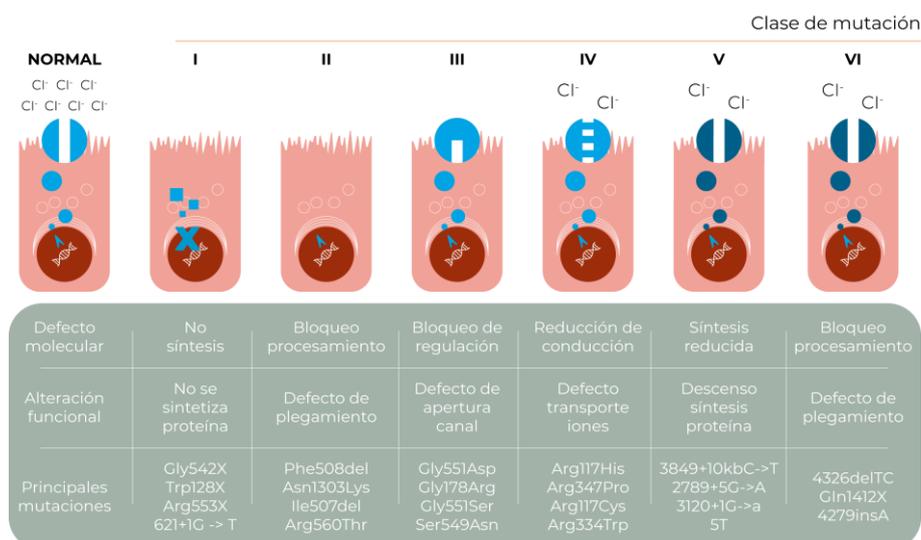


Figura 1. Genética de la fibrosis quística. Clasificación de las mutaciones de acuerdo con la alteración que se genera en la proteína CFTR (3).

La proteína CFTR regula un canal aniónico que, mediante su activación a través AMPc, transporta pasivamente iones cloruro a través de la membrana apical, regula la actividad de otros canales iónicos, manteniendo así un equilibrio de líquidos y electrolitos a través de las membranas mucosas, y secreta bicarbonato, que es vital para la regulación del pH y la defensa contra microorganismos invasores (4). Esta proteína se expresa en la membrana apical de las células epiteliales de los epitelios secretores de pulmón, páncreas, intestino, glándulas sudoríparas, conductos biliares y conductos deferentes (5). Centrándonos en su función principal, es decir, el movimiento de iones de cloruro desde el interior de la célula hacia el exterior, una vez que los iones de cloruro están fuera de la célula, atraen una capa de agua, que es importante para que los cilios pulmonares realicen un movimiento de barrido que desplaza la mucosidad fuera de las vías respiratorias. Cuando falla esta proteína, los iones de cloruro quedan atrapados dentro de la célula y el agua ya no es atraída hacia el espacio exterior, provocando que la mucosidad de las vías respiratorias se deshidrate y se espese, y por consiguiente que los cilios no puedan llevar a cabo su función (6). A todo esto, se suma una infiltración masiva de neutrófilos que producen elastasa y destruyen los tejidos, liberando también grandes cantidades de ácidos nucleicos y proteínas citosólicas que perpetúan a la hiperviscosidad del moco.

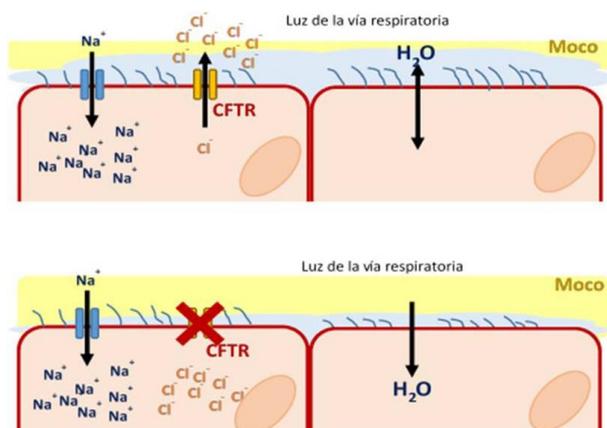


Figura 2. Representación esquemática de los canales iónicos de sodio y cloruro en la fibrosis quística, comparados con los mismos en células normales (7).

1.1.2. PATOGÉNESIS Y CLÍNICA

Las principales manifestaciones clínicas son enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática exocrina, elevación de cloro en sudor (conduciendo a una hidratación insuficiente lo que dificulta la eliminación de bacterias) e infertilidad en varones por azoospermia obstructiva.

Debido a que se altera el transporte iónico, en los pulmones se genera un auténtico círculo vicioso. Se produce una deshidratación de líquido en las vías aéreas y un aumento de la viscosidad de moco. Esto favorece la colonización bacteriana crónica que está asociada a una respuesta inflamatoria produciendo la obstrucción del flujo aéreo y conduciendo a la insuficiencia respiratoria e incluso provocando la muerte.



Figura 3. Fisiopatología de la afectación respiratoria en fibrosis quística (8).

En las expectoraciones de los pacientes los primeros patógenos que se aíslan son *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. Con la edad la bacteria dominante es *Pseudomonas aeruginosa* y perdura hasta el final de la vida. También se ha observado un

patógeno oportunista, *Burkholderia cenocepacia*, el cual contribuye al deterioro de la función pulmonar. Otros patógenos que se han observado en los pacientes son *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, micobacterias no tuberculosas y hongos.

Pseudomonas aeruginosa puede infectar de forma crónica el pulmón. La prevalencia de esta bacteria aumenta con la edad, alcanzando en la edad adulta casi el 70%. *Burkholderia cenocepacia* produce el síndrome de cepacia (presencia de neumonía necrosante y sepsis). Los pacientes que desarrollan este síndrome fallecen muy pronto. Además, esta bacteria es altamente transmisible. Se ha observado que *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cenocepacia* son resistentes a múltiples fármacos por lo que hace que el manejo de los pacientes que presentan estos patógenos sea complicado (9).

El 85% de los pacientes que fallecen por fibrosis quística, es debido a una complicación pulmonar, generalmente con infección secundaria, que produce una declinación progresiva de la función pulmonar con episodios de deterioro de sus síntomas que son conocidas como exacerbaciones (4).

También se ha observado que los pacientes con fibrosis quística tienen un mayor estrés oxidativo que los pacientes con otras enfermedades o sujetos sanos. El estrés oxidativo afecta a los componentes estructurales y funcionales de las células a nivel molecular debido a que hay un exceso de especies reactivas de oxígeno y se reducen las moléculas antioxidantes. Este desequilibrio redox induce a la inflamación crónica, contribuyendo al daño celular persistente y evita la remodelación de las vías respiratorias.

El desequilibrio redox produce la alteración de diversas vías de señalización como la vía NFκB (factor nuclear potenciador de las células B activadas) necesaria para la transcripción de diversas moléculas proinflamatorias. Y se observa una sobreexpresión de esta vía debido al aumento de producción de especies reactivas de oxígeno y por la estimulación bacteriana en la superficie celular. Además, los pacientes con fibrosis quística tienen una deficiencia de glutatión, el cual representa la primera línea de defensa del pulmón contra el estrés oxidativo y es fundamental para mantener un buen estado redox en las células.

La insuficiencia pancreática se debe a que la cantidad de cloro luminal es insuficiente para el intercambio con bicarbonato. Esto conlleva a la obstrucción de los conductos pancreáticos y a que disminuya el jugo pancreático provocando destrucción del tejido pancreático. En los pacientes adultos se observa otro rasgo con elevada prevalencia que es la pérdida de masa ósea (osteopenia y osteoporosis) y puede estar presente en el 75% de los que presentan la enfermedad.

Otra manifestación clínica con una prevalencia bastante alta es la diabetes mellitus relacionada con la fibrosis quística (CFRD), la presentan el 2% de los niños, el 19% de los adolescentes y el 40-50% de los adultos. Para detectar la CFRD se realiza la prueba de tolerancia anormal a la glucosa, aunque normalmente no se detecta antes de la pubertad. El diagnóstico se relaciona con un empeoramiento de la función pulmonar y un aumento de la

mortalidad. Se caracteriza por una pérdida parcial o disfunción de los islotes pancreáticos (conduciendo a una deficiencia de la secreción de insulina), inflamación basal crónica y un aumento del gasto energético.

También hay otras manifestaciones menos comunes como el síndrome de obstrucción intestinal distal. Se observa en pacientes mayores de 15 años y provoca el depósito de material fecal en el íleon distal y el colon proximal. Los pacientes presentan dolor abdominal, náuseas, capacidad limitada para defecar, etc. Es común en pacientes con genotipos menos graves y enfermedad pulmonar avanzada.

Existe una gran variación en los signos y síntomas entre la edad de inicio y el ritmo individual de progresión de la enfermedad, ya que esta depende del genotipo del paciente y del tiempo de evolución. Suele manifestarse en los primeros meses de vida con problemas respiratorios asociados a manifestaciones digestivas. Además, hay que tener en cuenta que en cada paciente la gravedad y el ritmo de progresión de la enfermedad varía considerablemente y estas variaciones también podrían relacionarse con las diferentes mutaciones del gen CFTR (9).

1.2. DIAGNÓSTICO

La fundación de fibrosis quística de Estados Unidos (CFF) publicó directrices de consenso en 2017 que establecen que se puede realizar un diagnóstico de fibrosis quística si un individuo tiene una presentación clínica compatible con la enfermedad, es decir, una prueba de detección neonatal positiva, características clínicas consistentes con la fibrosis quística (presencia de fenotipos característicos como enfermedad pulmonar y sinusitis crónica recurrente, anomalías nutricionales y gastrointestinales, anomalías urogenitales en los hombres y/o síndromes de agotamiento de sal), o antecedentes familiares positivos de fibrosis quística y evidencia de disfunción CFTR (p. ej., concentración de cloruro en el sudor ≥ 60 mmol/L) (10).

La evaluación de la disfunción del canal de conductancia de membrana de fibrosis quística es de fundamental importancia para definir el diagnóstico. Se observa mediante la prueba de sudor con una determinación anormal de cloruro, la presencia de mutaciones del CFTR causantes de la enfermedad o a través de la medición de diferencia de potencial nasal (DPN) o medición de la corriente intestinal (MCI) anormal.

La prueba del sudor es la más importante para confirmar el diagnóstico ante la sospecha clínica. Recientemente, se han desarrollado, a nivel internacional, nuevas pautas referidas a los criterios en el diagnóstico de fibrosis quística. Es así como, en presencia de una prueba del talón neonatal positiva o síntomas clínicos de fibrosis quística o historia familiar de fibrosis quística, se establece lo siguiente:

- Fibrosis quística confirmada: con determinación de cloruro en sudor ≥ 60 mmol/l o identificando 2 mutaciones causantes de fibrosis quística en trans y prueba del sudor con cloruro > 30 mmol/l.
- Fibrosis quística probable: cuando los valores de cloruro en sudor estén en el rango de 30-59 mmol/l en dos determinaciones diferentes. En estos casos, se deberá realizar el estudio extendido de mutaciones de CFTR, secuenciación y/o análisis funcional (DPN o MCI). Diagnóstico no resuelto.
- Fibrosis quística improbable: cuando el valor de cloruro en sudor esté por debajo de 30 mmol/l (11).

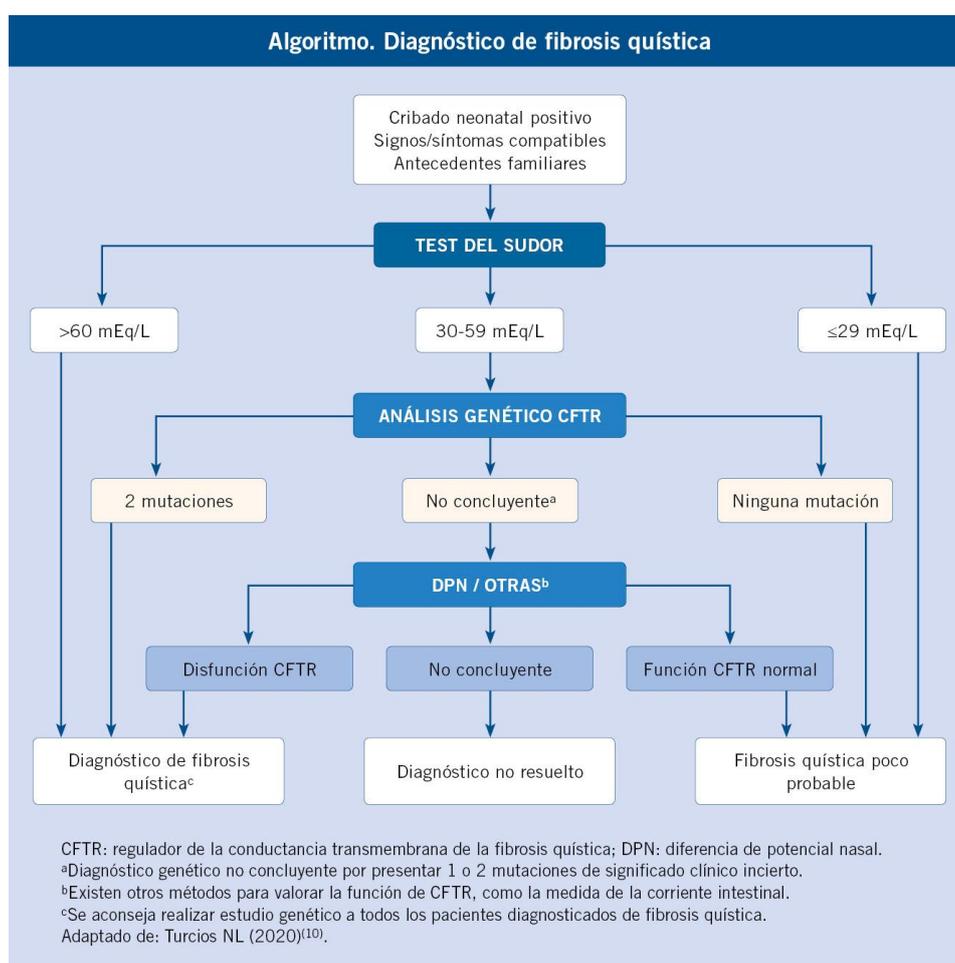


Figura 4. Algoritmo diagnóstico de la fibrosis quística (11).

1.3. TRATAMIENTOS ACTUALES

La siguiente figura resume las principales anomalías y enfoques de tratamiento en pacientes con fibrosis quística.

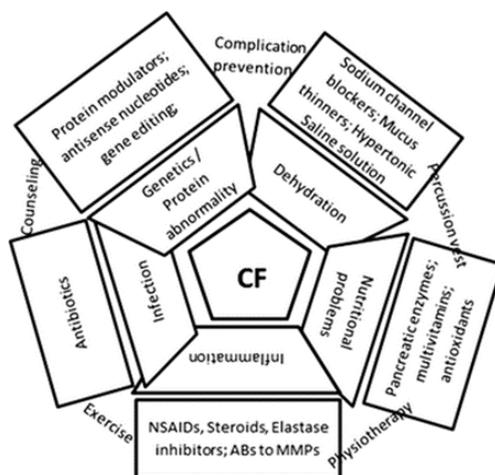


Figura 5: Las principales disfunciones fisiopatológicas y modalidades de tratamiento de los pacientes con fibrosis quística. Los cuadros trapezoidales internos representan las anomalías fisiopatológicas y los cuadros rectangulares externos representan los tratamientos principales. Los textos que conectan los recuadros exteriores muestran el manejo no farmacológico (2).

Los **objetivos del tratamiento** se pueden resumir en:

❖ Dirigidos al sistema respiratorio.

Con el fin de prevenir y controlar las infecciones pulmonares se recetan antibióticos, principalmente formas inhaladas de azitromicina, tobramicina, aztreonam y levofloxacino. Por otra parte, para el control de la inflamación de las vías respiratorias se utilizan antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), esteroides inhalados y sistémicos y cromolín.

Para reducir la viscoelasticidad y eliminar la mucosidad espesa y pegajosa de los pulmones y dilatar las vías respiratorias se emplean agonistas β inhalados con oxígeno humidificado y se recomienda una solución salina hipertónica del 3 al 6% y dornasa alfa.

Además, se recomienda ejercicio y fisioterapia, incluido un dispositivo de presión espiratoria positiva (PEP) o un dispositivo de oscilación de la pared torácica de alta frecuencia (un chaleco de percusión).

❖ Dirigidos al sistema gastrointestinal.

En cuanto a la prevención o tratamiento de obstrucciones intestinales, se recomienda rehidratación oral y laxantes osmóticos si presenta obstrucción incompleta; y enemas de contraste hiperosmolar si síndrome de oclusión intestinal distal (SOID) Además, según el estado de los vómitos, se podría utilizar una solución de lavado intestinal con electrolitos equilibrados o un enema que contenga diatrizoato de meglumina y diatrizoato de sodio. Para prevenir la recurrencia, se puede administrar regularmente polietilenglicol 3350 por vía oral durante 6 meses a 1 año.

Por otra parte, para el tratamiento de la insuficiencia pancreática, se pauta terapia de reemplazo de enzimas pancreáticas (PERT) que contiene múltiples combinaciones de proteasas, lipasas y amilasas.

❖ Basados en nutrición y electrolitos.

Para proporcionar una nutrición adecuada y prevenir la deshidratación, se recomienda una dieta rica en calorías y grasas, suplementos de vitaminas ADEK y minerales como fluoruro y zinc. Además, se administran suplementos de cloruro de sodio adaptados a la edad del paciente y a las condiciones ambientales (2).

❖ Basados en terapias moduladoras de CFTR.

Desde el momento en que se descubrió la fibrosis quística y se estudió su relación con el gen CFTR, las intervenciones terapéuticas solo tuvieron como objetivo minimizar los síntomas de la enfermedad y prevenir infecciones relacionadas con ella. Los moduladores de CFTR (como Ivacaftor , Lumacaftor , Elexacaftor y Trikafta) son moléculas pequeñas (pero no nanopartículas) que se dirigen a defectos genéticos específicos y han proporcionado nuevas vías hacia un tratamiento avanzado para pacientes con mutaciones de CFTR comunes y raras (1). Estos moduladores del CFTR se encargan de corregir y potenciar aquellos canales CFTR ineficientes de la superficie celular. En el aparato respiratorio regulan el intercambio iónico, por lo que disminuirán la densidad de las secreciones con la consecuente mejoría del drenaje bronquial y de la obstrucción al flujo aéreo, así como la reducción de las exacerbaciones respiratorias. Desde el punto de vista digestivo, mejoran la absorción intestinal y cuando se administran a edades muy tempranas pueden normalizar los niveles de elastasa fecal, evitando así la insuficiencia pancreática exocrina.

Estos fármacos se metabolizan por vía hepática, principalmente por el citocromo P450 3A4 (CYP3A4) y se eliminan por vía biliar. Es por ello que el uso concomitante con inductores o inhibidores potentes del CYP3A4 como los azoles o algunos macrólidos, deben ser evitados.

El **Ivacaftor** fue el primero de los moduladores en ser aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 2012. Está indicado en aquellos pacientes con fibrosis quística mayores de 6 años que posean la mutación G551D (12). Esta mutación hace que la proteína CFTR sea defectuosa por lo que no responde al canal ATP-dependiente. Ivacaftor supera este bloqueo activando CFTR mediante la apertura del canal independiente de ATP. La función de este fármaco consiste en aumentar la probabilidad de apertura del canal CFTR activado. En estudios realizados con Ivacaftor se ha observado como disminuyen las cantidades de cloro en el test del sudor y consigue una actividad del 35-40% de la función normal. Mejora la función pulmonar, síntomas respiratorios, exacerbaciones pulmonares y ganancia de peso (9). Hay que remarcar que el uso de este fármaco puede desencadenar una alteración hepática, por lo que hay que vigilar de forma periódica la función hepática.

El segundo modulador que se comercializó fue el **Lumacaftor/Ivacaftor**. Esta combinación está indicada para los pacientes homocigotos F508del mayores de 2 años. Lumacaftor actúa

moviendo la proteína defectuosa a su ubicación correcta e Ivacaftor modifica el tiempo de apertura de la puerta de cloruro, mejorando la conductancia de los iones de cloruro. Con este tratamiento se observó una mejora en la función pulmonar ya que los pacientes obtuvieron un aumento de FEV1 y disminuyeron las exacerbaciones pulmonares (9). Sin embargo, debido a la aprobación de otras combinaciones más recientes de mayor eficacia, tolerancia y seguridad, este modulador ha quedado relegado a aquellos niños de 2-5 años para los que aún no tiene indicación la triple terapia (12).

En 2019, la FDA aprobó el tercer modulador **Tezacaftor/Ivacaftor** para pacientes mayores de 6 años, homocigotos F508del y heterocigotos F508del combinados con una mutación de función residual, como P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711 + 3A → G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789 + 5G → A, 3272-26A → G, y 3849 + 10kbC → T). Tezacaftor es un corrector que se une a TMD1 (primer dominio transmembrana) y actúa aumentando la cantidad de proteína CFTR en la superficie celular e Ivacaftor aumenta el tiempo de apertura del canal de cloruro (9). Sin embargo, la mejoría funcional es modesta, aumenta el entorno a un 5% el volumen de aire que se expulsa durante el primer segundo de la espiración forzada (FEV1) y reduce las exacerbaciones respiratorias (12).

Por último, la triple terapia, la combinación **Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor** marca un antes y un después en la historia de la fibrosis quística (12). Combina Elexacaftor, un corrector de última generación, con Tezacaftor e Ivacaftor. Elexacaftor, al igual que Lumacaftor y Tezacaftor, ayuda a la proteína F508del-CFTR a adoptar la estructura adecuada para que pueda moverse a la superficie celular. La combinación de Elexacaftor con Tezacaftor/Ivacaftor mejora el rendimiento de la proteína CFTR sobre otros moduladores porque corrige un fallo adicional en el desarrollo de la proteína F508del-CFTR (4). Aprobada en España en diciembre 2021, está indicada en todos aquellos pacientes mayores de 6 años con fibrosis quística con una mutación F508del, lo que permite que un alto porcentaje de pacientes (75%) en Estados Unidos y norte de Europa tengan acceso al tratamiento y en torno un 40-60% en países mediterráneos. La mejoría clínica y funcional con este tratamiento es evidente. Se reduce notoriamente la tos y la broncorrea, mejora la función pulmonar (aumenta el FEV 1 en torno a un 10-15%), disminuye las exacerbaciones respiratorias y mejora la calidad de vida del paciente. Desde el punto de vista digestivo mejora la absorción intestinal y aumenta la ganancia ponderal (12).

En un estudio realizado por Barry et al. se incluyeron a varios pacientes mayores de 12 años con fibrosis quística y F508del suprimido o con cierta función residual. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente para recibir la triple terapia Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor durante 4 semanas o control activo (Ivacaftor o Tezacaftor - Ivacaftor) durante 8 semanas. Los resultados mostraron que los pacientes que recibieron triple terapia tuvieron una puntuación en el dominio respiratorio revisado de 10,3 en comparación con el control negativo (ausencia de moduladores CFTR) con una puntuación de 1,6 (las puntuaciones más altas indican una mejor calidad de vida). Solo un paciente tuvo efectos secundarios leves, como niveles elevados de aminotransferasas, que llevaron a la interrupción del tratamiento

durante el período de prueba. En otro estudio realizado por Keogh et al., se encontró que la administración de Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor en pacientes con fibrosis quística redujo en gran medida el número de días de hospitalización (de 8,4 días a 4,7 en un enfoque y de 7,2 a 6,4 en otro enfoque). Por tanto, podemos concluir que la triple terapia utilizada en pacientes con fibrosis quística conduce a una mejoría notable en varios aspectos de la enfermedad, tales como la calidad de vida y los días de hospitalización, en comparación con pacientes que usan la terapia estándar con dos fármacos.

Aunque los moduladores de CFTR han mostrado resultados prometedores hasta cierto punto, estos fármacos tienen varias limitaciones. En primer lugar, estas terapias de “rescate de proteínas” solo son aplicables a mutaciones específicas de CFTR, lo que no deja opciones para aproximadamente el 30% de los pacientes que no las presentan. En segundo lugar, alrededor del 17,2 % de los pacientes elegibles están obligados a interrumpir su tratamiento debido a efectos secundarios graves como cataratas, dolor orofaríngeo o elevación de transaminasas, o a la falta de indicios de mejora (4). Además, estos fármacos necesitan medicación adicional para el tratamiento de otros síntomas e incluso pueden interactuar con inductores e inhibidores del CYP3A y con ellos mismos. Por otra parte, debido a la estructura multidominio y al plegado secuencial del CFTR, un único fármaco no puede corregir todos los defectos de los diferentes dominios. Por ello, siempre será necesario utilizar combinaciones (7). Otra desventaja de la terapia con moduladores de CFTR es que actualmente, su coste es enorme, entre 150.000 y 250.000 euros por paciente al año (1).

Además de las barreras biológicas típicas para la administración de fármacos, como la biodisponibilidad limitada y los efectos secundarios sistemáticos, la fibrosis quística presenta un desafío adicional en forma de una capa mucosa espesa que bloquea el acceso a las células enfermas. Las terapias genéticas también deben evitar la respuesta inmune y penetrar más en la membrana nuclear (13).

En definitiva, los fármacos que existen actualmente para el tratamiento de la fibrosis quística presentan ciertos beneficios, pero no son suficientes para la completa remisión de la enfermedad. Por tanto, su eficacia limitada hace que esté en desarrollo una nueva terapia que ha permitido la mejora de todos estos límites en su manejo: la nanomedicina.

2. NANOMEDICINA

2.1. INTRODUCCIÓN

La nanomedicina, considerada como uno de los campos de las nanobiotecnologías con aplicaciones directas en medicina, se puede definir como la ciencia y la tecnología utilizada en el diseño y evaluación de sistemas complejos, a escala nanométrica, formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y, el segundo, es el propio sistema que permite una función especial relacionada con el

diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad. Estos nanomateriales incluyen componentes activos u objetos en el rango comprendido desde un nanómetro hasta cien nanómetros.

Los nanomateriales presentan numerosas ventajas; entre ellas, podemos destacar que son capaces de: **proteger la molécula encapsulada** frente a su eventual degradación desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción o absorción; **atravesar las barreras biológicas** como la piel, las mucosas gastrointestinal o respiratoria o, también, la barrera hematoencefálica; **alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana** donde la molécula debe ejercer su acción; alcanzar compartimentos intracelulares; y por último, **liberar la molécula activa** en su lugar de acción o absorción (14).

La interacción entre la nanotecnología y la medicina constituye una oportunidad para llevar a cabo nuevos tratamientos o mejorar los ya existentes. Las diferentes técnicas que forman parte de la nanotecnología manipulan átomos y moléculas, produciendo nanoestructuras artificiales que, siendo del mismo tamaño que las biomoléculas, pueden interactuar con células de los seres humanos (15).

Dos factores principales hacen que las propiedades de los nanomateriales difieran significativamente de las de otros materiales: el aumento de la superficie relativa y los efectos cuánticos. Estos factores pueden cambiar o mejorar propiedades como la reactividad, la resistencia y las características eléctricas. A medida que una partícula disminuye de tamaño, se encuentra una mayor proporción de átomos en la superficie que en el interior. Por tanto, las nanopartículas tienen una superficie por unidad de masa mucho mayor en comparación con las partículas más grandes (16).

Los **nanomateriales** con propiedades fisicoquímicas únicas ofrecen un gran potencial en muchos campos, particularmente en las ciencias biomédicas, incluidos los sistemas de administración de medicamentos y genes, el tratamiento del cáncer, sistemas de seguimiento, ingeniería de tejidos, etc. (17). En el campo del desarrollo de fármacos, los nanomateriales proporcionan importantes ventajas que pueden atribuirse a sus propiedades fisicoquímicas para lograr características de liberación controlada. La biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la no inmunogenicidad son las características más esenciales que deben aplicarse a los sistemas de administración de fármacos basados en nanomateriales (18). Las nuevas generaciones de nanoestructuras diseñadas, también conocidas como nanomateriales diseñados y funcionalizados, han abierto nuevas posibilidades en las aplicaciones de enfoques biomédicos como la detección biomolecular, la administración de fármacos, las imágenes biológicas y la terapia (17).

2.2 VENTAJAS DE LOS NANOMATERIALES EN EL TRATAMIENTO DE LAS FIBROSIS QUÍSTICA

La nanomedicina se emplea ampliamente para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades pulmonares. Proporciona nuevos materiales en el rango nanométrico con muchas aplicaciones potenciales en medicina clínica e investigación (16). En los últimos años, se han logrado avances notables, ofreciendo oportunidades para abordar desafíos clínicos históricos en enfermedades pulmonares, incluida la resistencia a múltiples fármacos, los efectos secundarios adversos de los agentes terapéuticos convencionales, nuevas imágenes y la detección más temprana de enfermedades (19).

Las infecciones bacterianas y las complicaciones pulmonares de la fibrosis quística provocan altas tasas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Por lo tanto, el tracto respiratorio se ha convertido en el objetivo principal para administrar terapias farmacológicas y genéticas. Como hemos mencionado anteriormente, uno de los mayores desafíos en el tratamiento de dicha enfermedad es penetrar en el moco espeso y pegajoso característico, que impide que los cilios eliminen las bacterias provocando infecciones.

Los **sistemas de administración de fármacos con nanomateriales** han demostrado ser útiles para mejorar la eficacia de fármacos basados en moléculas pequeñas y ácidos nucleicos. La encapsulación de agentes terapéuticos en nanopartículas aumenta la biodisponibilidad de fármacos con poca solubilidad, previene su degradación y permite su entrada en las células diana. Sin embargo, desde su entrada al torrente sanguíneo hasta que alcanzan su objetivo, las nanopartículas encuentran varios obstáculos que pueden impedir la eficiencia de estos sistemas. Algunos de estos obstáculos incluyen la eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS) y barreras extracelulares como la matriz extracelular (MEC) y el moco. Estas barreras biológicas pueden reducir significativamente la eficiencia de la administración de nanopartículas, lo que genera un aumento de los costos y de los efectos secundarios de las terapias previstas debido a la necesidad de dosis altas.

Al ingresar al torrente sanguíneo, las nanopartículas se someten a opsonización, que es un proceso en el que los anticuerpos, los componentes del complemento y otras proteínas se adsorben en la superficie de las nanopartículas, formando una corona de proteínas. Este proceso permite el reconocimiento de las nanopartículas por parte de los fagocitos que forman parte del sistema fagocítico mononuclear, que luego eliminarán rápidamente las nanopartículas del torrente sanguíneo. El grado de opsonización y, por lo tanto, el tiempo de eliminación, está fuertemente influenciado por las características de la superficie de las nanopartículas, como la carga y la hidrofobicidad. Incluso si las nanopartículas están diseñadas para retrasar efectivamente el tiempo de eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear, la capacidad de las nanopartículas para alcanzar las células objetivo se ve obstaculizada aún más por las barreras extracelulares que pueden encontrar. Una barrera extracelular importante es la matriz extracelular, una matriz estructural y protectora

compuesta de proteoglicanos, fibronectina, elastina, colágenos, lamininas y otras glicoproteínas.

La arquitectura del moco es una estructura de malla llena de un líquido de baja viscosidad compuesto principalmente de fibras de mucina altamente entrecruzadas por enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas. Además, la actina, el ADN y otras macromoléculas presentes en la capa mucosa crean barreras hidrofóbicas y electrostáticas que inhiben en gran medida la penetración de las terapias inhaladas (13). Las interacciones electrostáticas y el impedimento estérico, entendiendo por impedimento estérico la característica de la estructura molecular por la cual las moléculas tienen una ordenación espacial de sus átomos tal, que o bien impiden la reacción con otra molécula, o bien retardan su velocidad (20); pueden impedir que las nanopartículas crucen exitosamente la matriz extracelular y la capa mucosa debido a los dominios cargados, los dominios hidrofóbicos y/o el tamaño de los poros de la matriz (21).

La remodelación de la matriz extracelular es una característica común de muchas enfermedades que pueden impedir aún más el transporte de nanopartículas. En las vías respiratorias, el moco representa una barrera importante para la administración de fármacos en enfermedades pulmonares como la fibrosis quística. Los estudios han demostrado que el moco de los pacientes con dicha enfermedad contiene concentraciones más altas de enlaces disulfuro y ADN de células inmunes lisadas, lo que conduce a una mayor elasticidad del moco y a una reducción en la difusión de partículas (21).

Dos formas comunes de superar la barrera de entrega de la fibrosis quística son disminuir la adhesión de las partículas al moco recubriendo la superficie de las nanopartículas con polímeros inertes al moco, como el polietilenglicol, y reduciendo la viscoelasticidad de la mucosa con mucolíticos (13).

2.2.1. PEGILACIÓN

La modificación de la superficie de las nanopartículas con polietilenglicol (PEG) es un método comúnmente utilizado para abordar las preocupaciones anteriormente mencionadas. El polietilenglicol es un polímero biocompatible, hidrófilo y con carga neta neutra que, cuando se conjuga con la superficie de las nanopartículas, confiere propiedades sigilosas a las nanopartículas al proteger el núcleo de las nanopartículas de la adhesión a biomoléculas que pueden mejorar sustancialmente su estabilidad en el torrente sanguíneo. Por tanto, dicha técnica se ha utilizado ampliamente para mejorar el tiempo de circulación, la biodisponibilidad y la difusión de nanopartículas a través de barreras biológicas (21).

Varios estudios han demostrado que las nanopartículas con recubrimientos de polietilenglicol de alta densidad evitan la eliminación a través de sistema fagocítico mononuclear y pueden navegar con éxito a través de barreras extracelulares. Sin embargo, una desventaja de este enfoque es la reducción de la captación celular de nanopartículas pegiladas. Como otra forma

de abordar esto, los recubrimientos de polímeros ramificados, incluida la pegilación ramificada, han sido objeto de varios estudios que muestran un mayor tiempo de circulación y una disminución de las interacciones de las células inmunes cuando se recubren sobre nanotubos de carbono y nanopartículas poliméricas. Es probable que el aumento del tiempo de circulación de las nanopartículas pueda atribuirse a una mayor reducción en la unión de proteínas debido al impedimento estérico adicional de la arquitectura del polímero ramificado.

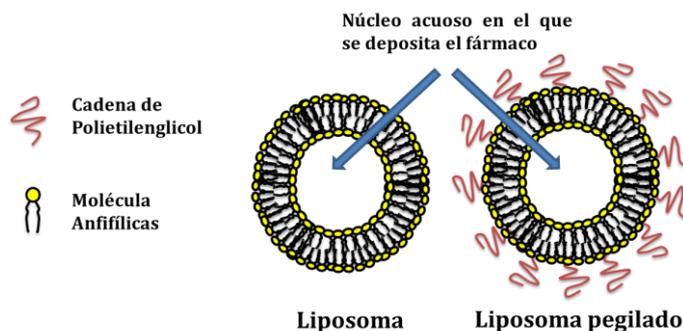


Figura 6. Molécula con cadenas de polietilenglicol, en la que el fármaco se deposita en el núcleo (22).

Cahn et al. investigaron si la combinación de polietilenglicol de alta densidad y ramificación de polímeros puede mejorar estas ventajas. Para ello, compararon nanopartículas pegiladas ramificadas de 4 brazos de alta densidad con nanopartículas pegiladas lineales de diferentes pesos moleculares. Los resultados mostraron que el polietilenglicol ramificado se puede recubrir con éxito sobre nanopartículas con una alta densidad comparable a la de los recubrimientos de polietilenglicol lineales. Estos recubrimientos de polietilenglicol ramificados de alta densidad proporcionaron diferentes beneficios, limitando eficazmente la adsorción de proteínas en suero, aumentando significativamente el perfil de difusión de las nanopartículas en la matriz extracelular y en el moco. Por tanto, las nanopartículas de polietilenglicol ramificadas de alta densidad pueden ser útiles para abordar los obstáculos en la administración de fármacos y presentar una oportunidad para lograr una mayor acumulación de nanopartículas en el sitio objetivo (21).

Suk et al. demostraron el efecto del recubrimiento de polietilenglicol sobre la capacidad de nanopartículas para penetrar la microestructura del moco de fibrosis quística. Compararon las difusividades, tasas de transporte y desplazamientos de nanopartículas recubiertas de polietilenglicol de 100, 200 y 500 nm de diámetro con las de nanopartículas no recubiertas. El recubrimiento de polietilenglicol aumentó la penetración de la barrera mucosa porosa para la partícula de 200 nm, en comparación con la partícula sin recubrimiento. Además, también se encontró que la pegilación aumenta la movilidad de las nanopartículas en las biopelículas

de *Burkholderia multivorans* y *Pseudomonas aeruginosa*, que son el resultado de infecciones bacterianas comunes en las vías respiratorias de los pacientes con fibrosis quística. Por tanto, demostraron la resistencia del polietilenglicol como nanomaterial para facilitar el transporte de la nanopartícula, además de aumentar la penetración de ésta en presencia de infecciones.

Craparo et al. investigaron más a fondo el efecto del grado de pegilación y la conformación de la cadena de polietilenglicol, y sintetizaron nanopartículas fluorescentes (FNP) que penetran en el moco para administrar ibuprofeno. Usaron α,β -poli(N-2-hidroxietil)-d,l-aspartamida (PHEA) para unir covalentemente rodamina B (RhB) y ácido poliláctico (PLA) para formar copolímeros injertados con un tamaño promedio de nanopartículas <200 nm., que además se recubrió con 0%, 2% u 8,5% de polietilenglicol. Su estudio demostró que a medida que aumenta la densidad de polietilenglicol, también aumenta la capacidad de penetración de las nanopartículas fluorescentes formadas por α,β -poli(N-2-hidroxietil)-d,l-aspartamida, rodamina B, ácido poliláctico y polietilenglicol (PHEA-RhB-PLA-PEG).

Porsio et al. además, desarrollaron nanopartículas fluorescentes de α,β -poli(N-2-hidroxietil)-d,l-aspartamida, rodamina B, ácido poliláctico y polietilenglicol (PHEA-RhB-PLA-PEG) con péptidos penetrantes de células (CPP) para administrar ivacaftor a través de la vía pulmonar, en presencia de moco artificial de fibrosis quística en células epiteliales bronquiales humanas. Promovieron la internalización de las células de ivacaftor dentro del pulmón mediante la introducción del péptido activador transcripcional transactivante (Tat), un tipo de péptido penetrante de células. Estas partículas lograron una penetración más rápida y una mayor liberación de ivacaftor (12 %) en comparación con el 6 % del control de ivacaftor libre. También se observó una mejora significativa (18,5 % frente a 5,3 %) en la captación celular de ivacaftor combinado en células epiteliales bronquiales humanas, con una viabilidad aproximadamente del 90 % después de 24 h en comparación con una viabilidad del 80 % para ivacaftor libre. A la luz de estos resultados, las nanopartículas fluorescentes pegiladas y decoradas con activador transcripcional transactivante muestran un gran potencial para administrar moduladores de CFTR mediante administración pulmonar para tratar pacientes con fibrosis quística (13), como se muestra en la figura 7.

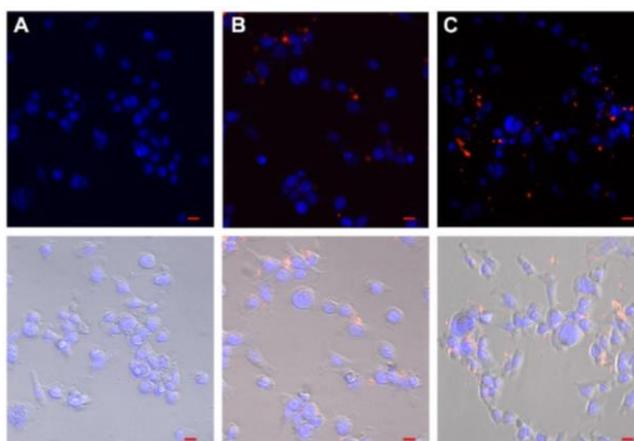


Figura 7. Nanopartículas que penetran células y moco integradas en formulaciones nano-micro para la administración pulmonar de ivacaftor en pacientes con fibrosis quística. Imágenes de microscopía de fluorescencia que describen la captación de (A) Ivacaftor libre, (B) Ivacaftor pegilado (nanopartículas fluorescentes) y (C) Ivacaftor- péptido activador transcripcional transactivante pegilado (nanopartículas fluorescentes) en células epiteliales bronquiales humanas después de 4 horas de incubación en presencia de moco artificial de fibrosis quística. Ivacaftor encapsulado en nanopartículas pegiladas con péptido activador transcripcional transactivante mostró la mayor localización en las células diana. Fila inferior: Brightfield superpuesto a imágenes fluorescentes (barra de escala: 20 μm) (13).

2.2.2. MUCOLÍTICOS

El moco de la fibrosis quística obstruye las vías respiratorias y causa infecciones pulmonares progresivas potencialmente mortales. Las mucinas, principal componente estructural del moco, son polisacáridos polianiónicos altamente sulfatados sobre una estructura proteica que se mantienen unidas principalmente por Ca^{2+} como contraión positivo, que en exceso no permite la expansión normal de la mucina a partir de las células caliciformes. Para poder expulsar el moco, debe ocurrir un desplazamiento de Ca^{2+} de los gránulos de mucina apretados para permitir la expansión molecular adecuada y evitar la mucostasis. En ausencia de un entorno rico en bicarbonato y sodio para eliminar y desplazar el Ca^{2+} , como ocurre en el caso de un transporte de iones disfuncional mediado por el regulador transmembrana de la fibrosis quística, las mucinas no pueden sufrir procesamiento postraduccion normal y expansión a su forma lineal, contribuyendo a un moco que es hiperviscoso, cohesivo y adhesivo al epitelio de la superficie.

Los tratamientos convencionales que modifican la salinidad y la hidratación han sido efectivos, pero no normalizan completamente la eliminación de mucosidad. La quelación de Ca^{2+} se ha investigado como una intervención para cambiar el entorno iónico local del moco de las vías respiratorias, pero aún no ha tenido éxito.

Courtney et al. investigaron que la poli (acetil, arginil) glucosamina (PAAG), una poliglucosamina de alto peso molecular que ha sido modificada químicamente con restos de arginina para proporcionar un polímero soluble altamente cargado positivamente interactúa preferentemente con los sulfatos de mucina. Debido al alto peso molecular del glicopolímero y debido a que la arginina exhibe interacciones únicas con los sulfatos, estas interacciones intermoleculares transitorias desplazan al Ca^{2+} para afectar la morfología de la mucina. PAAG interactúa con las mucinas de manera dependiente de Ca^{2+} para reducir la viscoelasticidad del moco y mejorar la obstrucción y el transporte de moco (23).

En otro estudio realizado por Suk et al., se descubrió que la N-acetilcisteína en combinación con un recubrimiento de polietilenglicol como nanomaterial, mejoraba la penetración a través del moco de la fibrosis quística. Además, Suk et al. evaluaron más a fondo la capacidad

de penetración de las nanopartículas en forma de varilla que tenían alrededor de 350 nm de longitud y 10 nm de diámetro a través del moco de fibrosis quística. Específicamente, la nanopartícula consistía en poli-l-lisina con 10 kDa de polietilenglicol y ADN no específico (nanopartícula CK₃₀PEG_{10k}/DNA). El moco derivado del paciente se trató con agentes mucolíticos, incluidos ADNasa humana recombinante y N-acetilcisteína, para probar la penetración de nanopartícula CK₃₀PEG_{10k}/DNA. Si bien la ADNasa humana recombinante sola no mejoró la penetración, la combinación de N-acetilcisteína y ADNasa humana recombinante demostró un aumento de 13 veces en las difusividades promedio de nanopartícula CK₃₀PEG_{10k}/DNA en comparación con el moco no tratado. Por tanto, podríamos concluir que el recubrimiento de los tratamientos sintomáticos convencionales con nanomateriales ayudaría a que estos pudiesen actuar de forma más eficiente.

Broughton-Head et al. desarrolló un ensayo de difusión para analizar las propiedades limitantes y potenciadoras de la difusión de los mucolíticos, como la ADNasa humana recombinante y la N-acetilcisteína. Midieron la penetración de nanoesferas fluorescentes de 200 nm a través de biogeles sintéticos compuestos de ADN, mucina y actina, que imitan la composición del moco de la fibrosis quística. Los resultados mostraron que los biogeles con 5 mg/ml de actina inhibieron significativamente la capacidad de la N-acetilcisteína y la ADNasa humana recombinante para mejorar la difusión de nanopartículas, en comparación con los biogeles con menores concentraciones de actina. Los autores concluyeron que la actina se une estrechamente a la ADNasa humana recombinante, reduciendo la actividad de ésta o atenuando los efectos potenciadores mucolíticos de la N-acetilcisteína (13).

En otro estudio, Namho Kim et al. presentaron una partícula penetrante de moco cargada de ADN sintético (ADN-MPP) capaz de proporcionar una expresión transgénica segura, generalizada y robusta en modelos *in vivo e in vitro* de enfermedades pulmonares mucoobstructivas. Investigaron la capacidad del ADN-MPP para mediar en la expresión del transgén informador y/o terapéutico en las vías respiratorias pulmonares de un modelo de ratón transgénico de enfermedades pulmonares mucoobstructivas (Scnn1b -Tg) y en cultivos de interfaz aire-líquido de células epiteliales bronquiales humanas primarias extraídas de un individuo con fibrosis quística. Se administró por vía intratraqueal un plásmido diseñado para silenciar la hiperactividad del canal de sodio epitelial (ENaC), que causa deshidratación de la superficie de las vías respiratorias y estasis de moco, a través de DNA-MPP para evaluar los efectos terapéuticos *in vivo* con o sin tratamiento previo con solución salina hipertónica, un agente rehidratante de moco de uso clínico. Como resultado, DNA-MPP exhibió una expresión de transgén informador marcadamente mayor en comparación con una formulación impermeable al moco en modelos *in vivo e in vitro* de enfermedades pulmonares mucoobstructivas. El ADN-MPP que transportaba plásmidos silenciadores de ENaC proporcionó una regulación negativa eficiente de ENaC y una reducción de la carga de moco en los pulmones de ratones Scnn1b -Tg, y se lograron impactos sinérgicos tanto en la eficacia de la transferencia genética como en los efectos terapéuticos cuando el ADN-MPP se complementó con solución salina hipertónica (24).

El poli (ácido sebácico) - polietilenglicol (PSA-PEG) es un copolímero de dibloque biodegradable que tiene componentes hidrófobos (PSA) e hidrófilos (PEG). Esto permite una partición suficiente de polietilenglicol de la superficie de las partículas para impartir un recubrimiento resistente al moco del núcleo de poli (ácido sebácico) hidrófobo, lo que permite que las nanopartículas de poli (ácido sebácico)-polietilenglicol penetren rápidamente a través del moco humano denso (Figura 8). Los estudios *in vitro* realizados por Rano et al. en muestras humanas (moco cervicovaginal) encontraron que la difusividad de un copolímero de poli (ácido sebácico)-polietilenglicol es mucho mayor que la de las nanopartículas de poli (ácido sebácico) y polietilenglicol individuales. En los pulmones, donde el espesor promedio del moco es de 30 μm , se encontró que >35 % de las nanopartículas de poli (ácido sebácico)-polietilenglicol cuando se administraban a humanos mediante transporte intranasal podían cruzar las capas de moco de 30 μm dentro de los 10 minutos posteriores a la administración. Las partículas de poli (ácido sebácico) sin recubrimiento tuvieron una baja eficiencia de penetración y <0,6% pudieron penetrar la misma capa de moco de 30 μm en 4 h. A partir de este experimento, se encontró que las nanopartículas de poli (ácido sebácico)-polietilenglicol eran capaces de penetrar el esputo de fibrosis quística (31 % después de 30 min) con respecto a las partículas de PSA no recubiertas (0,6 % después de 30 min). Por tanto, observamos cómo dichos recubrimientos de polietilenglicol son esenciales para la rápida penetración del moco viscoelástico denso como el del esputo de la fibrosis quística (4).

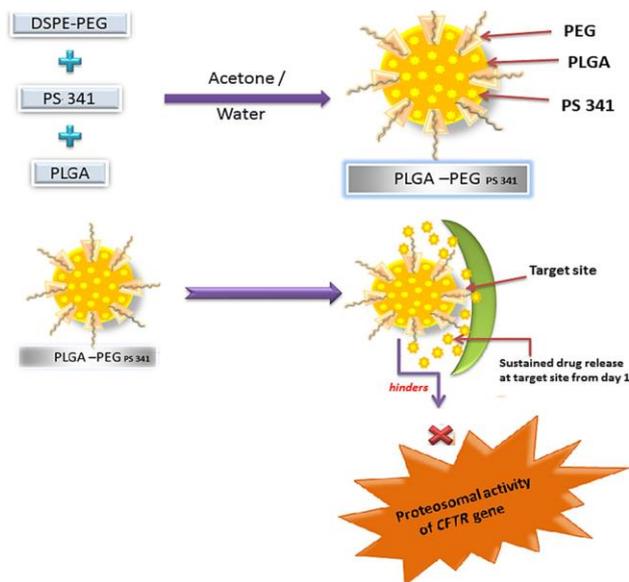


Figura 8. Nanopartículas de poli (ácido sebácico)-polietilenglicol que penetran la densa barrera mucosa en pacientes con fibrosis quística y alcanza su sitio objetivo (4).

2.3. NANOMATERIALES EN TRATAMIENTO SINTOMÁTICOS

2.3.1. INFECCIÓN BACTERIANA

Además de impedir que los tratamientos farmacológicos convencionales penetren en el epitelio pulmonar, el moco proporciona un caldo de cultivo para las bacterias. Las infecciones pueden exacerbar aún más la condición del paciente y causar inflamación. *Pseudomonas aeruginosa* es el microorganismo más frecuentemente encontrado en pacientes con fibrosis quística, y se ha demostrado que ciertas cepas adaptadas a entornos mucosos proliferan fácilmente y forman una biopelícula sobre la matriz extracelular de células epiteliales que recubren los pulmones. El método más común para tratar estas infecciones es mediante la inhalación de antibióticos, típicamente tobramicina. Sin embargo, en su forma libre, la tobramicina no puede alcanzar un nivel terapéutico porque se elimina rápidamente y no puede penetrar la membrana mucosa (13).

Para mejorar la administración de fármacos, Moreno-Sastre et al. desarrollaron lípidos nanoestructurados cargados de tobramicina (Tb-NLC) para evitar la membrana mucosa y aumentar la retención de tobramicina. Se descubrió que los lípidos nanoestructurados que se combinaron con tobramicina tenían 250 nm de diámetro mediante microscopía electrónica de transmisión y tenían un potencial zeta negativo, las cuales son propiedades de penetración de moco. Ambos lípidos nanoestructurados liberaron el 80% del fármaco en las primeras 24 horas, seguido de una liberación sostenida hasta 92 horas. Además, se demostró que los lípidos nanoestructurados tenían concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) similares a las de la tobramicina libre, lo que significa que la encapsulación no afectó sus propiedades antimicrobianas. En particular, los estudios de imágenes de biodistribución *in vivo* mostraron cualitativamente que los lípidos nanoestructurados cargados con el agente de imágenes infrarrojas, IR-783 (IR-NLC), pudieron permanecer en los pulmones en mayor medida que el IR-783 libre tanto a las 24 como a las 48 horas. Las señales de IR del IR-783 libre desaparecieron de los pulmones en 48 horas mediante eliminación hepática y renal, mientras que las señales de los IR-NLC se concentraron y mantuvieron en los pulmones (Figura 9). Además, en comparación con la tobramicina libre, ambos tipos de lípidos nanoestructurados cargados con tobramicina mostraron una mayor eficacia *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa*, así como un aumento en la penetración del moco *in vivo* y la distribución pulmonar en ratones (13). En conclusión, la tobramicina encapsulada por lípidos nanoestructurados mostró enormes ventajas con respecto a la tobramicina libre, demostrando una vez más la relevancia de la nanomedicina.

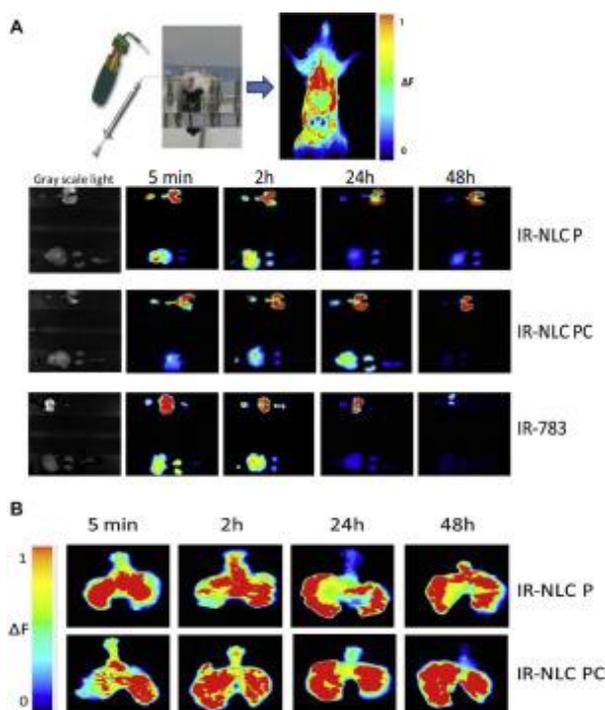


Figura 9. (A) Biodistribución de IR-NLC e IR libre después de la administración intratraqueal a ratones (órganos en la fila superior de izquierda a derecha: corazón, tráquea y pulmones; fila inferior de izquierda a derecha: vesícula biliar, hígado, riñones y bazo) en diferentes puntos temporales. (B) a biodistribución de IR-NLC en las vías respiratorias pulmonares. Los lípidos nanoestructurados muestran una mayor distribución pulmonar en comparación con el fármaco libre.

Diácono y col. desarrollaron un método diferente para encapsular tobramicina en nanopartículas con el mismo objetivo de aumentar la penetración de la membrana mucosa. Descubrieron una fuerte interacción entre el alginato y la tobramicina. Además del fármaco y el alginato, se añadió quitosano como polímero estabilizador y las nanopartículas se funcionalizaron con ADNasa para ayudar a descomponer los polímeros de ADN que contribuyen a la mucosidad. Las nanopartículas de tobramicina (T-NP), tanto funcionalizadas como no funcionalizadas con ADNasa, tenían alrededor de 500 nm de diámetro. También se descubrió que las nanopartículas tenían una baja citotoxicidad, con una tasa de supervivencia del 90 % después de 96 horas después de la incubación utilizando larvas de *Galleria mellonella*, un sistema modelo que imita la progresión de las infecciones humanas. Después de que *Galleria mellonella* fuera infectada con *Pseudomonas aeruginosa*, su tasa de supervivencia se duplicó con el tratamiento con nanopartículas de tobramicina en comparación con el grupo no tratado después de 96 horas (80 % frente a 40 %). En general, este estudio proporciona evidencia de que la incorporación de tobramicina en nanopartículas

a base de alginato y quitosano muestra eficacia contra las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en el tratamiento de la fibrosis quística (13).

Tripathi et al. sintetizaron nanobolas de plata de 12 nm, por sus propiedades antimicrobianas contra bacterias gramnegativas, incluida *Pseudomonas aeruginosa*, mezclando nitrato de plata y dodecilsulfato de sodio. Las nanobolas de plata presentan cargas positivas en sus superficies en solución, lo que las atrae hacia las bacterias gramnegativas. Sin embargo, la carga positiva también provoca interacciones más fuertes con el moco, disminuyendo la interacción que tienen con las bacterias. Las propiedades antimicrobianas de las nanobolas de plata se midieron en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 horas. Para cada tipo de bacteria, la densidad óptica disminuyó de una absorbancia de 0,5 sin nanobolas a 0,1 con 40 µg/mL de nanobolas, lo que indica efectos antimicrobianos exitosos (13).

Otro estudio fue llevado a cabo por Garbuzenko et al. tenía como objetivo verificar el concepto de que dos medicamentos lumacaftor e ivacaftor aprobados para la cura de la fibrosis quística podrían encapsularse en portadores de lípidos nanoestructurados (NLC) diseñados para su administración por inhalación a los pulmones. Demostró que la incorporación a nanoportadores no sólo mejora la penetración celular de los fármacos, sino que también mejora su efecto combinado en los procesos intracelulares, probablemente debido a sus propiedades farmacocinéticas similares. Este hecho se confirmó midiendo el flujo de salida de cloruro en células CFBE41o, que son generadas por transformación de células traqueobronquiales de pacientes con fibrosis quística. Los datos mostraron que las células tratadas con fármacos pegilados con lípidos nanoestructuados mejoraron en el transporte de iones con una concentración de 3 µM en comparación con la combinación de fármacos con la misma concentración. En parte, este efecto podría explicarse por la capacidad de dicha partícula para penetrar el moco y mejorar la administración del fármaco a través de la membrana celular de las células epiteliales bronquiales CFBE41o. En la segunda parte del estudio (*in vivo*), se administraron nanopartículas lipídicas diseñadas cargadas con ambos fármacos, lumacaftor e ivacaftor, a ratones mediante el método de inhalación utilizando un nebulizador de colisión. El tratamiento se aplicó en ratones homocigotos/homocigotos bitransgénicos Cftrtm1Unc Tg(FABPCFTR)1Jaw/J. Los resultados del estudio mostraron que la combinación de fármacos administrados con nanoportadores trató con éxito la fibrosis quística pulmonar, haciendo más pequeñas o inexistentes las regiones afectadas (25).

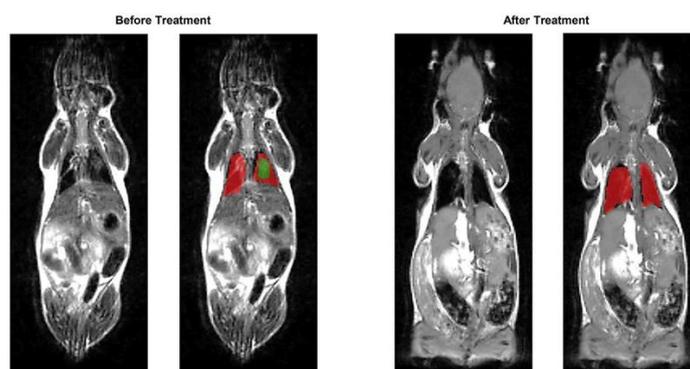


Figura 10. Imágenes de resonancia magnética representativas de ratones homocigotos/homocigotos bitransgénicos Tg(FABPCFTR)1Jaw/J con fibrosis quística antes y después del tratamiento. Los ratones fueron tratados dos veces por semana durante cuatro semanas mediante inhalación de portadores de lípidos nanoestructurados que contenían lumacaftor e ivacaftor. Los tejidos pulmonares normales están coloreados en rojo, mientras que los tejidos fibróticos, en verde (25).

2.3.2. CURCUMINA

La curcumina es el principal curcuminoide de los rizomas de la cúrcuma y presenta entre un 1,5 y un 3% de cúrcuma, siendo responsable del color amarillo extremo de la cúrcuma (26). La curcumina posee una amplia gama de actividades farmacológicas importantes que incluyen efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos (27). Esta sustancia actúa como un inhibidor de la bomba de ATPasa impulsado por un gradiente de calcio que se puede administrar por vía oral, siendo capaces de viajar a través del epitelio intestinal, obtener acceso sistémico y alcanzar el tejido deseado o ubicaciones intracelulares que son altamente objetivo de la terapia (4). Debido a que dicha sustancia tiene una baja biodisponibilidad y absorción, se han estudiado varias nanoformulaciones para la administración de una forma activa de dicha sustancia, llegando a la conclusión que las nanopartículas de curcumina poseen eficacias especiales tanto *in vivo* como *in vitro* para el tratamiento de la fibrosis quística. Además, proporciona una hoja de ruta a través de la cual niveles superiores de curcumina pueden resistir las condiciones del intestino cuando se administran por vía oral y llegar a los tejidos deseados para ejercer estas acciones locales potencialmente beneficiosas (28).

Una de las acciones propuestas para la curcumina en el tratamiento de la fibrosis quística sugiere que la curcumina puede actuar reduciendo los niveles de iones calcio en los orgánulos del retículo endoplasmático. Si esto es científicamente cierto, la entrega de nanopartículas que contienen curcumina al retículo endoplasmático y a los orgánulos asociados puede aumentar la disponibilidad local de este compuesto en su sitio de actividad funcional o cercano a él. Berger et al. informaron sobre el efecto estimulante de la curcumina sobre el funcionamiento del canal CFTR. Observaron que la curcumina reduce el tiempo de cierre del

canal y aumenta la actividad del canal CFTR (29). Además, se conoce que la curcumina modula negativamente la expresión del receptor tipo peaje 2 (TLR2) proinflamatorio que contribuye a ejercer su influencia antiinflamatoria. Por tanto, la nanocurcumina puede considerarse una posible estrategia nutricional para el tratamiento de la fibrosis quística (28).

En un estudio realizado en el Hospital Infantil Akbar de Irán, a un grupo de niños con todas las clases de fibrosis quística, se les administró una dosis máxima de 80 mg de nanocurcumina durante tres meses como suplemento nutricional. Los resultados principales del estudio se centraron en la inflamación, basándose en la interleucina-6, la interleucina-10 y el recuento de neutrófilos en hisopos nasofaríngeos, que mostraron una gran reducción de la inflamación después del tratamiento sin efectos secundarios (4).

Dragomir et al. evaluaron el efecto de la curcumina en células cultivadas de riñón de hámster bebé (BHK) transfectadas con $\Delta F508$ -CFTR y líneas celulares epiteliales nasales. El compuesto curcumina mostró un efecto positivo significativo en el transporte de cloruro mediado por células $\Delta F508$ -CFTR BHK o células CFBE en células epiteliales de las vías respiratorias (30).

En otro estudio se informó que la curcumina copolimerizada con polietilenglicol mejora la biodisponibilidad de la curcumina y la solubilidad en agua en las células epiteliales bronquiales humanas. Además, también se desarrollaron inhaladores de curcumina en polvo seco (DPI) mediante éter metílico-polietilenglicol (5 kDa), que demostró liberación sostenida de éste.

También se emplearon proliposomas secados con nanopulverizaciones para llevar curcumina a los pulmones. Se demostró que los proliposomas secados por aspersion cargados con curcumina tenían propiedades superiores de aerosolización que capacitaban al fármaco para acceder a regiones profundas de los pulmones. En comparación con la curcumina en polvo, se informó que la curcumina proliposomal tiene una alta absorción y una mayor duración media de residencia en los tejidos pulmonares.

Por otra parte, intentó mejorar la biodisponibilidad de la curcumina encapsulándola en nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) con un diámetro de 77 ± 16 nm. El estudio demostró que la curcumina encapsulada en ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA-cur) estaba más fácilmente biodisponible en comparación con la curcumina no encapsulada. La eficacia de curcumina encapsulada en ácido poliláctico-co-glicólico se validó en modelos de ratones que albergaban la mutación $\Delta F508$, y se demostró que dicha combinación de curcumina con el nanomaterial mencionado anteriormente mejoraba la eficacia del efecto de la curcumina.

Lababidi et al. desarrollaron una formulación de micropartículas mediante secado por aspersion que combina múltiples fármacos. Se utilizaron de forma sinérgica tres antibióticos, incluidos tobramicina, ciprofloxacina o azitromicina, N-acetilcisteína (NAC) y curcumina. Se probó la actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* y la combinación de N-acetilcisteína con nanopartículas de poli(ácido láctico- coglicólico) (PLGA) cargadas además con curcumina mostraron una actividad inhibidora significativa contra la liberación del factor

de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-8 e IL-1 β . Por otra parte, se evaluó el potencial de las formulaciones de nanopartículas de curcumina para atacar este microbio oportunista en pacientes con fibrosis quística. Se concluyó que una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanocurcumina inhibió la formación de biopelículas de la cepa ATCC 10,145 de *Pseudomonas aeruginosa* (28).

2.4. NANOMATERIALES EN LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

La capacidad de incorporar fármacos en nanosistemas muestra un paradigma en farmacoterapia que puede utilizarse para la administración de fármacos dirigidos a células. Los fármacos se pueden administrar a los sitios objetivo ya sea encapsulados dentro de la estructura de las nanopartículas, o adsorbidos/adheridos a la superficie de las estas (31). Se han utilizado como transportadores *in vivo* nanosistemas no específicos, como nanoportadores que están recubiertos con polímeros o albúmina y partículas lipídicas sólidas. Sin embargo, hoy en día los fármacos se pueden acoplar a nanoportadores específicos de células y/u órganos (16). Por tanto, los transportadores de fármacos son sistemas cuya función es transportar el fármaco hasta el lugar donde debe ser liberado de manera específica. Deben cumplir tres características; baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y vida media larga (15).

La nanomedicina permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva ya que posibilita la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, tamaño que permite a estos dispositivos atravesar poros y membranas celulares. Otra gran ventaja que ha aportado la nanomedicina a la liberación de fármacos es que se ve incrementada la efectividad del medicamento mediante el control preciso de la dosis requerida y del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto. Las nanopartículas, al ser liberadas de forma específica sólo en los órganos, tejidos o células dañadas, disminuyen la toxicidad asociada al fármaco. Por otra parte, al ser posible la liberación paulatina del medicamento de acuerdo con las necesidades del paciente, se consiguen disminuir los posibles efectos adversos que puedan producirse como consecuencia de la ingesta masiva del fármaco (15). Además, las estructuras de tamaño nanométrico tienen dimensiones comparables a las de moléculas biológicas como proteínas y carbohidratos, por lo que pueden interactuar fácilmente con ellos dentro y fuera de las células (31).

Existen distintos tipos de sistemas de liberación de fármacos, que se diferencian en su composición y estructura, pero todos tienen en común los mismos objetivos: ser capaces de transportar fármacos de manera específica y altamente controlada, evitar problemas relacionados con la solubilidad del fármaco, y proporcionar alternativas a las vías de administración tradicionales, mucho más invasivas. Los principales nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos en nanomedicina son las micelas, los liposomas, los

dendrímeros, las nanopartículas, los nanotubos y los conjugados poliméricos. Sus características principales se muestran a continuación.

Las **micelas** son agregados moleculares, con forma de esfera, constituidos por moléculas que tienen una parte polar o hidrofílica y otra apolar o hidrofóbica. En un medio acuoso, las partes apolares tenderán a protegerse del agua y formarán una estructura esférica con un núcleo hidrofóbico y una parte exterior hidrofílica. Este tipo de estructuras tiene un tamaño de 50 nm aproximadamente y se utilizan para el transporte y liberación de fármacos que no son solubles en agua. Los fármacos quedan atrapados en el interior de la micela, protegidos en el núcleo apolar de la misma. Una característica interesante que presentan estos sistemas es su capacidad para escapar de la acción de los macrófagos y por tanto permanecer en el organismo más tiempo del habitual para una partícula extraña circulando por el torrente sanguíneo.

En segundo lugar, encontramos los **liposomas**, vesículas formadas por bicapas lipídicas formadas por dos filas de lípidos enfrentadas por sus colas hidrofóbicas. En estas estructuras similares a membranas, se pueden incluir proteínas que actúan como canales por los que el fármaco se libera de forma específica mientras permanece protegido ante la posibilidad de sufrir una degradación prematura.

Por otra parte, los **dendrímeros** son macromoléculas con muchas ramificaciones, cuya forma y tamaño pueden ser controladas de forma muy precisa. Los dendrímeros poseen otras características como son su alta estabilidad y la capacidad de funcionalizar su superficie, que los convierten en buenos candidatos para el transporte de fármacos. Los agentes bioactivos, que deben transportarse, pueden encapsularse en el dendrímero o unirse a su superficie mediante interacciones químicas o físicas.

Las **nanopartículas** son partículas esféricas poliméricas. Dentro de esta clasificación se incluyen las nanocápsulas, que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica y las nanoesferas o sistemas matrices en los que el fármaco aparece disperso en la partícula.

Los **nanotubos de carbono** son estructuras cilíndricas compuestas por una o varias capas de grafito u otro material de carbono enrolladas sobre sí mismas. Pueden ser funcionalizados con péptidos bioactivos, proteínas, ácidos nucleicos o medicamentos, y pueden liberar su carga de manera específica en células diana. Al funcionalizar su superficie, los nanotubos de carbono muestran una baja toxicidad y no son inmunogénicos lo que les convierte en buenos sistemas de liberación controlada de fármacos.

Por último, encontramos los **conjugados poliméricos**, que son sistemas de liberación de fármacos que se dividen en dos grandes grupos, conjugados polímero-proteína y conjugados polímero-fármaco. Ambos están constituidos por una parte de polímero que consiste en repeticiones de diferentes entidades químicas, como ácidos poliglutámicos, polisacáridos, polietilenglicoles y otros. A estos polímeros se les une de covalentemente lo que será el

agente activo, mediante un enlace que debe ser estable durante el transporte, pero que también debe ser capaz de degradarse una vez alcanzada la diana a la que va dirigido el fármaco (15).

Sistema	Ventajas	Desventajas
Micropartículas convencionales	El proceso de elaboración es sencillo, con técnicas estandarizadas	Fluidificación y dispersión inestables Candidatas a ser fagocitadas por los macrófagos
Grandes micropartículas porosas	Menor tendencia a agregarse y a ser fagocitadas por los macrófagos Alta eficacia de aerosolización	Ausencia de método estandarizado de fabricación con poco control de la eficacia de encapsulación y liberación Dificultad para el escalado
Micropartículas hinchables	Menor fagocitosis por parte de los macrófagos	Fluidificación y dispersión inestables Dificultad para establecer el perfil de liberación del fármaco
Nanopartículas poliméricas	Elevada especificidad Evitan la fagocitosis por los macrófagos y facilitan el transporte transepitelial	Toxicidad pulmonar
Liposomas	Versatilidad en tamaño de vesícula y características físicas Capacidad de incorporar fármacos poco solubles, facilitando la liberación a los macrófagos alveolares, evitando la irritación local	Elevados costes de producción Salida de fármaco debido a la inestabilidad durante la liberación
Nanopartículas sólidas lipídicas	Biocompatibles y más estables que los liposomas para la nebulización, facilidad de escalado e inocuas	Menor capacidad de encapsular fármacos que los liposomas Perfil de liberación inestable Posibilidad de solidificar
Partículas porosas- agregados de partículas	Disminución de la agregación y elevada eficacia de aerosolización Elevada especificidad Escapan del aclaramiento de los macrófagos alveolares y facilitan el transporte transepitelial	No son fácilmente redispersables para su administración

Tabla 1: Tipos de micro y nanomateriales empleados para liberación pulmonar de fármacos (7).

Mediante el uso de la nanomedicina se ha conseguido hacer frente a algunos de los problemas que muestran los fármacos tradicionales, como la necesidad de añadir al principio bioactivo del medicamento ciertos excipientes que aumenten la solubilidad del fármaco; la naturaleza hidrofóbica de ciertos medicamentos hace que éstos puedan precipitar en un medio acuoso; la extravasación involuntaria de medicamentos citotóxicos produce daño en los tejidos; algunos medicamentos pueden ser eliminados muy rápidamente por órganos como el hígado, requiriéndose altas dosis del fármaco; otros medicamentos tienen distribuciones generalizadas por el organismo y pueden afectar a tejidos sanos; la distribución del medicamento por tejidos sanos produce efectos colaterales que limitan la cantidad de medicamento que puede ser liberada; concentraciones bajas de medicamentos en los tejidos diana producen una disminución de los efectos terapéuticos del fármaco (15).

2.4.1 NANOPARTÍCULAS DIRIGIDAS Y RESPONDEDORAS DE ESTÍMULOS

En los últimos años, la nanomedicina ha evolucionado hasta los llamados “sistemas inteligentes de administración de nanofármacos”, este campo se centra en dos áreas principales: los nanoportadores dirigidos y los nanoportadores que responden a estímulos. Los nanoportadores dirigidos están recubiertos en superficie por ligandos específicos, por

ejemplo, anticuerpos, péptidos y aptámeros, que tienen una afinidad alta y específica por objetivos en la superficie de tipos de células específicos. Los nanoportadores que responden a estímulos liberan su carga útil de manera sostenida y bien controlada en respuesta a estímulos específicos como el pH y el ultrasonido.

Otra aplicación desarrollada a partir del uso de nanoportadores inteligentes avanzados es la teranóstica, que utiliza estrategias de nanociencia para combinar diagnóstico y terapéutico en un solo agente para un órgano afectado por la enfermedad. Representa un ejemplo clásico de medicina de precisión que facilita el diagnóstico, la administración de medicamentos y la evaluación de la respuesta a las terapias administradas. Los teranósticos son extremadamente relevantes para la medicina respiratoria.

El rutenio tiene actividad anticancerígena. Sin embargo, el uso de rutenio como agente terapéutico ha sido limitado debido a problemas importantes relacionados con su perfil de toxicidad al administrarse por vía sistémica. Para abordar este problema, Chen F., et al. Diseñaron un sistema de administración de nanofármacos teranósticos dirigido cargado con complejo de rutenio (II) utilizando una proteína fluorescente verde mejorada y una proteína de fusión específica para atacar células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas. El monitoreo de fluorescencia en tiempo real reveló una acumulación significativa de nanopartículas en el tumor al tomar imágenes, lo que se asoció con una mejora doble en la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas in vivo.

En otro ejemplo, Chi Y.-H., et al. emplearon tres estrategias efectivas en un modelo murino in vivo teranósticos, con administración dirigida de fármacos y terapia combinada, encapsulando dos fármacos anticancerígenos, doxorubicina y vinorelbina, en dos sistemas de administración de fármacos liposomales dirigidos a péptidos que fueron decorado con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro como agente teranóstico. El análisis de resonancia magnética mostró una penetración tumoral significativa en ratones tratados con nanopartículas dirigidas, lo que condujo a una supervivencia general media mejorada del 40 % en comparación con las nanopartículas no dirigidas.

Más recientemente, se han desarrollado nanopartículas inteligentes para lograr la liberación controlada de cargas útiles del portador en el objetivo seleccionado. Debido al perfil metabólico desordenado de algunas enfermedades pulmonares, exhiben un rasgo característico único, como por ejemplo un entorno ácido mejorado (pH bajo). Numerosos estudios recientes han aprovechado esta característica distintiva mediante el diseño de una amplia gama de sistemas de administración de fármacos sensibles al pH con el objetivo de mejorar la administración de fármacos y la eficacia terapéutica.

La nanotecnología brinda la oportunidad de combinar diferentes estrategias en una única nanoplataforma. Zhang CY, et al. aplicaron enfoques de respuesta a estímulos de pH, administración de aerosoles pulmonares, ligandos dirigidos y respuesta a estímulos de pH en un sistema de administración de nanofármacos que transportaba la molécula 1 anti-adhesión

intercelular (anti-ICAM-1), que se usó en el tratamiento de lesión pulmonar aguda. La combinación de estas tres estrategias diferentes dio como resultado una administración significativa del fármaco a las células endoteliales objetivo, con una disminución significativa de la respuesta inflamatoria, lo que respalda esta nueva estrategia de nanopartículas inteligentes como una posible terapia antiinflamatoria (19).

2.5. NANOMATERIALES EN TERAPIA GÉNICA

Como ya mencionamos anteriormente, la proteína CFTR es un canal de cloruro cuya función es regular la secreción de iones cloruro fuera de determinadas células. Su alteración producirá un flujo anormal de líquido a través de las membranas epiteliales, produciendo moco espeso, una barrera importante para la administración de medicamentos. La mayoría de las terapias farmacológicas pueden aliviar temporalmente los síntomas de la fibrosis quística mediante un único mecanismo de acción y son adecuadas para tratar sólo un tipo particular de mutación CFTR. De ahí que la investigación actual en terapias génicas tenga como objetivo tratar la enfermedad restaurando el gen CFTR mutado. Gran parte de la investigación se centra en la delección $\Delta F508$, la mutación más común de la fibrosis quística (13).

2.5.1. PAPEL DEL ÁCIDO NUCLEICO PEPTÍDICO (PNA) UNIDO A NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES EN LA REPARACIÓN DEL ADN MUTADO.

Para corregir la mutación en el gen que conduce al desarrollo de la fibrosis quística, Piotrowski-Daspit et al. produjeron moléculas artificiales relacionadas con el ADN (PNA o ácidos nucleicos peptídicos). El ácido nucleico peptídico (PNA) es un análogo de oligonucleótido sintético, repelente de la degradación de proteasas y nucleasas, que se adhiere al ADN cerca de la región mutada y estimula las vías de reparación y recombinación del ADN en las células. Estas moléculas de ácido nucleico peptídico forman un triplete junto con el ADN del donante y ciertas nanopartículas biodegradables, que se usa para reparar $F508del$, la mutación que con más frecuencia ocasiona fibrosis quística. En modificaciones de ciertas secuencias, la reparación in vitro del flujo de cloruro prevaleció en el 25% de las células del epitelio nasal de ratón. Otro ensayo demostró la unión de dichas moléculas a los objetivos deseados.

Para evitar la degradación de las moléculas de ácido nucleico peptídico, se empaquetaron junto con ADN de donante en nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Luego, las nanopartículas que consisten en ADN del donante y otras moléculas de ácido nucleico peptídico se probaron en células epiteliales bronquiales de fibrosis quística (CFBE) con $F508del$. Para la corrección in vivo de $F508del$ murino, se diseñaron ADN y ácido nucleico peptídico de donantes modificados para apuntar y reparar el $F508del$. La unión de ciertos ácidos nucleicos peptídicos formadores de tripletes específicos de ratón (ya unidos a

nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) al ADN objetivo de ratones con fibrosis quística tratados mediante aplicación intranasal de suspensión de nanopartículas, expresó evidencia de cierto potencial nasal negativo en la luz sensible a amilorida, así como escasez de descarga de cloruro regulada por AMP, resultado de la mutación CFTR. Se descubrió que el gran potencial nasal negativo sensible a la amilorida disminuía y, por lo tanto, exhibía una naturaleza casi similar a la de una célula de tipo salvaje (4).

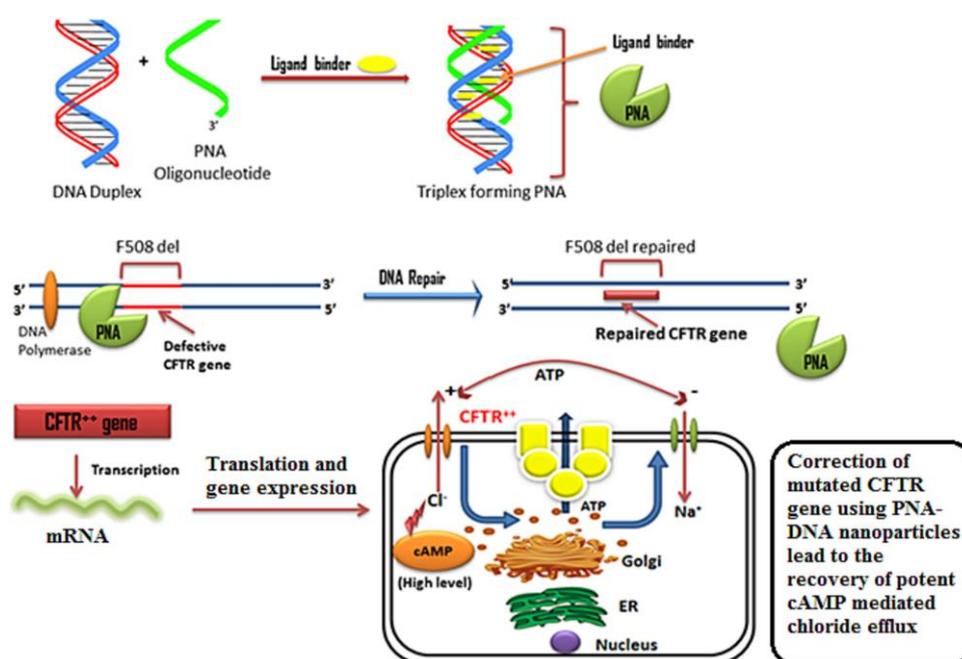


Figura 11. El uso de nanomateriales biodegradables cargados con moléculas de ácidos nucleicos peptídicos conduce a la corrección de la mutación de la fibrosis quística (4).

2.5.2. CRISPR/CAS9

El sistema de edición de genes de repetición palindrómica corta agrupada regularmente interespaciada (CRISPR)/ o sistema asociado a CRISPR (Cas) es una herramienta que avanza rápidamente para la corrección de genes en diferentes enfermedades genéticas. Sin embargo, su baja eficacia intracelular actúa como una barrera para el uso terapéutico. El desarrollo de las nanopartículas como modo de administración de fármacos ha supuesto un punto de inflexión en la administración del sistema CRISPR/Cas9, lo que ha dado lugar a una aplicación terapéutica prometedora.

Los nanoportadores, como las nanopartículas lipídicas sólidas catiónicas, las nanopartículas de ADN, los complejos lipídicos y las nanopartículas a base de oro, son plataformas de entrega que se han propuesto para el sistema CRISPR/Cas9. Las nanopartículas biodegradables similares a lípidos (LLN) son liposomas funcionales que apoyan eficientemente la liberación de carga CRISPR/Cas9 y el escape liposomal con toxicidad biológica reducida. Los

nanomateriales de ADN también se pueden utilizar como plataforma de entrega eficaz para el sistema CRISPR/Cas9. En un estudio realizado por Sun et al., se descubrió que cuando la superficie del complejo nanomolecular Cas9/sgRNA/DNA se recubría con polímero catiónico de polietilenimina, la captación celular y el escape endosómico en los pulmones de ratón eran sorprendentemente altos, con una eficiencia de edición del genoma de aproximadamente el 28%. Los nanovehículos basados en exosomas también han abierto nuevas vías para el suministro de tecnología de edición de genes como el sistema CRISPR/Cas9.

Las principales ventajas de CRISPR/Cas9 basado en nanopartículas sobre el uso de virus adenoasociado (AAV), adenovirus (AV) o edición de genes basada en lentivirus son su alta eficiencia de transfección y la activación de una respuesta inmune muy baja. Sin embargo, es necesario mejorar diferentes factores para aumentar la eficacia de este sistema terapéutico, como la estabilidad de CRISPR/Cas9 administrado en la sangre y la prevención de la degradación por nucleasas extracelulares. Además, el enfoque debería superar la barrera de la membrana celular y promover la absorción celular con éxito. También es importante transportar Cas9 al núcleo para su funcionamiento eficaz.

Por lo tanto, el desarrollo de nanoportadores programables seguros y eficientes para superar estos obstáculos necesita mucha más investigación y ensayos clínicos posteriores para diferentes enfermedades genéticas, incluida la fibrosis quística. El desarrollo de esta tecnología, que para la fibrosis quística aún se encuentra en una fase de investigación avanzada, pronto se centraría en aprovechar la eficiencia de la edición de genes en tejidos diana específicos con mayor estabilidad y biotoxicidad insignificante (4).

2.5.3. OTRA FORMA DE ABORDAR EL GEN CFTR

Aunque informes anteriores muestran que abordar directamente el gen CFTR puede ser un método eficaz para tratar la fibrosis quística, el uso de vectores inmunoestimulantes ha dificultado la administración a largo plazo de dosis terapéuticas. Oglesby et al. descubrieron que la sobreexpresión de microARN -145, -223 y -494 se correlacionaba con la incidencia de fibrosis quística. Fernández et al. desarrollaron un proceso para crear nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y quitosano que se cargaron con ácidos nucleicos bloqueados (mA) para apuntar, unir y bloquear la actividad de estos microARN. Oglesby et al. utilizaron métodos de doble emulsión y autoensamblaje para sintetizar partículas de PLGA y quitosano cargadas con dos LNA diferentes de 16 bases. Las nanopartículas tenían aproximadamente 200 nm de diámetro, lo que las hacía más propensas a ser endocitosadas que a ser objetivo de los monocitos. Estas nanopartículas se cargaron con LNA con hasta un 70% de eficiencia, y la nebulización para la administración pulmonar no afectó sus propiedades fisicoquímicas.

Alto et al. realizaron un ensayo clínico de fase IIb para determinar la eficacia de una terapia génica no viral para la fibrosis quística. El lípido catiónico GL67A comprende 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE); 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-n-(metoxi

[PEG5000]) (sal de amonio) (DMPE-PEG5000); y el lípido GL67. GL67A se mezcló con cantidades iguales del fármaco pGM169 (un plásmido que contiene el gen CFTR salvaje) para formar complejos y se administró a pacientes afectados por fibrosis quística una vez al mes durante un año con un nebulizador. Los resultados mostraron mejoras estadísticamente significativas en el FEV1 (3,7%), la FVC y el atrapamiento de gas en las tomografías computarizadas en comparación con el control de solución salina y, aunque no fueron significativos, se observaron resultados positivos en otros resultados secundarios independientemente de la edad, el sexo o la mutación CFTR. Sin embargo, las pequeñas mejoras cuantitativas no afectaron en gran medida la calidad de vida de las personas tratadas. Las mayores mejoras se observaron en sujetos con el FEV1 inicial más bajo y puede deberse a que una mayor obstrucción permite una mayor deposición y retención del fármaco en las vías respiratorias proximales (13).

2.6. NANOMATERIALES EN LA FAGOTERAPIA

La terapia con fagos consiste la aplicación de fagos líticos contra bacterias patógenas que conducen a su lisis y destrucción final de éstas. Esta aplicación de fagos, también llamada fagoterapia, representa una estrategia antibacteriana potencial que vale la pena explorar y presenta numerosas ventajas (32).

Los bacteriófagos son moléculas biológicas que pueden proporcionar una gran diversidad de propiedades fisicoquímicas que pueden examinarse para identificar nuevos recubrimientos superficiales que superen las barreras mucosas y celulares (34). Los bacteriófagos son virus que pueden atacar y matar bacterias. Los bacteriófagos que sufren un ciclo lítico se utilizan normalmente como agentes antimicrobianos (35). Durante el ciclo lítico de la infección, un fago se autorreplica inyectando su material genético en la bacteria objetivo, asumiendo el control de la maquinaria celular del huésped para sintetizar nuevos fagos. La progenie del fago se libera del huésped mediante lisis celular y el ciclo se reinicia (36).

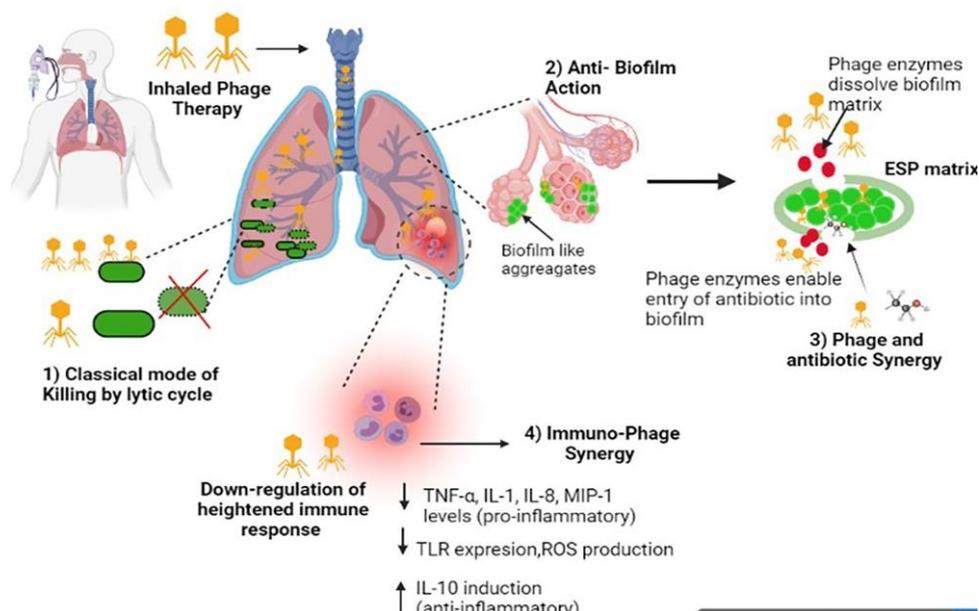


Figura 12. Ilustración esquemática de los múltiples mecanismos de los fagos contra las infecciones respiratorias (33).

Presentan numerosas ventajas. En primer lugar, los bacteriófagos se dirigen a las bacterias con alta especificidad siendo capaces de reconocer receptores específicos y, a menudo, se dirigen sólo a una o unas pocas especies. Esta alta especificidad indica que los bacteriófagos no afectarán a las células humanas ni a la flora intestinal y, por lo tanto, tendrán pocos efectos secundarios (35). Esta propiedad también se apoya en que los fagos están omnipresentes en la naturaleza y son comensales naturales del cuerpo humano y animal. Su naturaleza ubicua respalda el hecho de que son entidades inofensivas que no muestran efectos nocivos para las células eucariotas, incluso con títulos elevados (32). Por otra parte, los bacteriófagos también se pueden aislar y producir rápidamente contra cepas resistentes a los medicamentos, lo que significa que son agentes antimicrobianos que pueden evolucionar junto con sus cepas bacterianas objetivo (35). Además de estos puntos, los fagos exhiben la propiedad de autosoficarse, ya que pueden replicarse a expensas de la bacteria huésped. Esto contribuye a regular el número de fagos en relación directa con el nivel del patógeno, permitiendo su difusión en áreas cercanas hasta que la población del patógeno esté presente (32). Se han diseñado bacteriófagos (fagos), o virus que infectan bacterias, como sistemas de presentación para expresar combinaciones de hasta 10^9 péptidos o proteínas diferentes en sus proteínas de cubierta viral. Estos fagos presentadores de péptidos se pueden utilizar para la detección iterativa de alto rendimiento contra una variedad de objetivos para identificar recubrimientos peptídicos que tienen interacciones favorables con el moco para la penetración y otras funcionalidades deseadas (34).

Al igual que los antibióticos, las bacterias pueden desarrollar resistencia a un fago particular como mecanismo de defensa. Las bacterias pueden adquirir resistencia bloqueando los

receptores celulares para inhibir la adsorción de fagos, impidiendo la entrada de ADN/ARN de los fagos o degradándolos una vez que ingresan, o mediante otros sistemas de infección abortivos. En respuesta a los mecanismos antivirales bacterianos, los fagos evolucionan continuamente para eludir y retener las capacidades antibacterianas. El uso de mezclas de fagos se ha recomendado como estrategia para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia a fagos bacterianos. La formulación de mezclas de fagos implica algo más que la simple mezcla de dos o más fagos en una suspensión. El rendimiento óptimo se obtiene cuando los fagos individuales se complementan entre sí, es decir, cada fago se dirige a diferentes receptores de superficie. Al apuntar a múltiples receptores simultáneamente, la bacteria se ve presionada a desarrollar mutaciones en varios genes, y las posibilidades de que se produzcan mutaciones simultáneas son bajas. Sin embargo, el desarrollo de fagos en mezclas plantea otros desafíos, como las pruebas de estabilidad de cada fago en la mezcla para determinar la idoneidad de la formulación y una mayor complejidad de la farmacología que puede requerir una investigación preclínica extensa. Además, actualmente el coste asociado a la producción y purificación de fagos sería más elevado que el de los antibióticos.

La mayoría de los estudios clínicos informados hasta la fecha han utilizado nebulizadores para administrar formulaciones líquidas de fagos, probablemente debido a la facilidad de producción de las formulaciones. Los polvos secos se consideran el sistema de administración de medicamentos respiratorios de próxima generación, ya que proporcionan una estabilidad de almacenamiento prolongada sin requerir refrigeración (36).

Pabary et al. evaluaron la eficacia de un cóctel de fagos utilizando un modelo de ratón con infección pulmonar aguda por *Pseudomonas aeruginosa*. Tanto la exposición bacteriana como los fagos se administraron por vía intranasal. Se infectaron ratones tipo BALB/c con *Pseudomonas aeruginosa* y recibieron tratamiento con fagos mediante sonda nasal, ya sea simultáneamente, 24 horas después de la infección o 48 horas antes de la infección. La carga infecciosa se determinó en distintos momentos en muestras de líquido de lavado broncoalveolar. Se observó una eliminación completa de las bacterias en todos los ratones que recibieron administración simultánea. Se encontró eliminación bacteriana en el 86% y el 71% de los ratones que recibieron tratamientos retardados y profilácticos, respectivamente. El tratamiento con fagos evitó la propagación sistémica de bacterias independientemente del tiempo de administración.

Fothergill et al. desarrollaron un nuevo modelo de ratón con infección pulmonar crónica utilizando *Pseudomonas aeruginosa* con infección persistente durante 28 días. Se administró por vía intranasal una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* LESB65 a ratones hembra BALB/cOlaHsd. Las bacterias inoculadas colonizaron el tracto respiratorio superior, incluida la nasofaringe y los senos paranasales, lo que permitió la adaptación y la migración hacia los pulmones. Con la combinación adecuada, los autores podrían establecer infecciones crónicas del tracto respiratorio. Utilizando este modelo, Waters et al. probaron la eficacia del fago

PELP20 mediante la administración intranasal de dos dosis a las 24 horas y 36 horas después de la infección, seguidas de un recuento bacteriano en los tejidos pulmonares a las 48 horas. Se observó una eliminación completa de las bacterias en el pulmón. La administración de fagos a los 6 y 6,5 días después de la infección dio como resultado una eliminación completa de las bacterias en el 70% de los ratones y una reducción significativa en el otro 30% de los ratones.

Torres-Barceló et al. utilizaron el fago LUZ7 con estreptomycin en una concentración subletal contra *Pseudomonas aeruginosa*. La combinación fago-antibiótico disminuyó sustancialmente la carga bacteriana en comparación con la monoterapia y minimizó el desarrollo de mutantes resistentes al antibiótico o al fago. Coulter y cols. informaron que la aparición de células resistentes a antibióticos y fagos se redujo en un 60% y 99%, respectivamente, cuando se trató una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de 48 horas con una combinación de fago PB-1 y tobramicina. Chaudhry et al. encontraron resultados similares donde los fagos más ceftazidima, ciprofloxacina o tobramicina redujeron el número de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 resistente a los antibióticos en las biopelículas. Además, Knezevic et al. probaron la actividad antibacteriana del fago s-1 y la concentración subinhibitoria de ceftriaxona. Se observó sinergia entre fagos y antibióticos en todas las cepas objetivo con reducciones de 1,3 a 2,6 log 10 en el recuento bacteriano.

En general, la terapia con fagos inhalados ha demostrado ser muy eficaz para combatir infecciones agudas y crónicas en los pulmones. La administración intranasal ha sido la vía preferida para la administración pulmonar de fagos en animales debido a la conveniencia y facilidad de administración. Las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con fibrosis quística suelen ser polimicrobianas y aún no se dispone de ningún modelo de infección animal que pueda reflejar interacciones tan complejas entre los organismos microbianos. El desarrollo de modelos in vivo y/o ex vivo sería beneficioso para probar mezclas de fagos contra bacterias en un entorno de polimicrobioma (36).

3. CONCLUSIONES

La fibrosis quística es un trastorno autosómico recesivo que afecta principalmente a caucásicos, con una prevalencia de aproximadamente 1 de cada 3500 nacimientos. Está causada por diferentes mutaciones en el gen CFTR, siendo la 'F508del' siendo la más común. Dicho gen se encarga de la regulación del transporte de iones cloruro a través de la membrana y por tanto del mantenimiento del equilibrio de líquidos y electrolitos. Se manifiesta principalmente con síntomas respiratorios, digestivos e infertilidad masculina. Los tratamientos actuales se centran en prevenir infecciones, mejorar la función pulmonar y digestiva, y abordar las complicaciones asociadas. En las últimas décadas ha mejorado mucho su pronóstico debido a un diagnóstico precoz y el mejoramiento de los tratamientos.

Actualmente, se disponen de varios tratamientos sintomáticos y moduladores del CFTR, que muestran mejoras significativas en la calidad de vida de los pacientes, pero aún presentan limitaciones y desafíos. La nanomedicina ofrece prometedoras estrategias para abordar los desafíos que nos encontramos en la práctica clínica convencional. El uso de nanomateriales ofrece un amplio abanico de ventajas, como pueden ser la protección de las moléculas encapsuladas, mejoría de la eficacia de los fármacos y superación de las barreras biológicas como el moco espeso que poseen estos pacientes. Por otro lado, proporciona nuevos sistemas de administración capaces de transportar múltiples fármacos a un sitio celular específico y de manera sinérgica, potenciando así su acción. Estos avances en nanotecnología ofrecen nuevas oportunidades para mejorar la efectividad terapéutica, desarrollando terapias más específicas y personalizadas, y reduciendo la toxicidad y los efectos secundarios de los tratamientos actuales. Por este motivo, es necesario continuar la investigación en este campo para poder ofrecer el mejor tratamiento posible para los pacientes con fibrosis quística.

4. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento y admiración a mis tutoras, Lorena y Mónica. Gracias por vuestra dedicación y paciencia en todo momento durante la elaboración de este trabajo, además de por dejar plasmada la huella de vuestros conocimientos en él. Agradezco también a la Universidad de Cantabria la formación de calidad que me ha proporcionado durante estos años.

Asimismo, quiero agradecer a los pilares fundamentales de mi vida: mi familia, pareja y amigos. Gracias por el apoyo incondicional brindado durante toda mi vida y especialmente durante todos estos años de carrera, por animarme y por entender las horas dedicadas a esta. Sin ellos no hubiera llegado a ser la persona en la que me he convertido. Gracias siempre por creer en mí.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face [Internet]. Vol. 109, Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics. Blackwell Publishing Ltd; 2020 [cited 2023 Nov 30]. p. 893–9. <https://www.doi.org/10.1111/apa.15155>.
2. Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. J Transl Med [Internet]. 2017 Dec 27 [cited 2023 Nov 30];15(1):84. <https://www.doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9>.
3. Federación Española de Fibrosis Quística. ¿Qué es la fibrosis quística? [Internet]. [cited 2024 Jan 27]. <https://fibrosisquistica.org/que-es-la-fibrosis-quistica/>

4. Rano S, Bhaduri A, Singh M. Nanoparticle-based platforms for targeted drug delivery to the pulmonary system as therapeutics to curb cystic fibrosis: A review. Vols. 217–218, *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V.; 2024. <https://www.doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106876>.
5. T. JM, V. PF. Fibrosis quística en el adulto. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2015 May;26(3):276–84. <https://www.doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.06.004>.
6. Cystic Fibrosis Foundation. Basics of the CFTR Protein. [cited 2023 Dec 9]. <https://www.cff.org/research-clinical-trials/basics-cftr-protein>
7. Mo GM, Am RÁ, González-Rodríguez, MI. Fibrosis quística: tratamiento actual y avances con la nanotecnología [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 30]. <https://www.doi.org/10.30827/ars.v61i2.11358>.
8. A. López Neyra ALF. Fibrosis quística y sus manifestaciones respiratorias [Internet]. 2021. <https://cftr2.org>
9. Ortiz Sanz M. Fibrosis quística: mutaciones en el gen CFTR y estrategias de terapia génica. 2023 Jul 12 [cited 2024 Jan 27]. <https://hdl.handle.net/10612/17480>
10. Dickinson KM, Collaco JM. Cystic fibrosis. *Pediatr Rev*. 2021 Feb 1;42(2):55–65. <https://www.doi.org/10.1542/pir.2019-0212>
11. Castaños C, Pereyro S, Rentería F, Migliazza GM, Smith S, D’Alessandro V, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of patients with cystic fibrosis. Update. *Arch Argent Pediatr*. 2021 Feb 1;119(1):S17–35. <https://www.doi.org/10.1542/pir.2019-0212>.
12. Diab Cáceres L, Zamarrón de Lucas E. Cystic fibrosis: Epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. Vol. 161, *Medicina Clínica*. Ediciones Doyma, S.L.; 2023. p. 389–96. <https://www.doi.org/10.1016/j.medcli.2023.06.006>
13. Ong V, Mei V, Cao L, Lee K, Chung EJ. *Nanomedicine for Cystic Fibrosis*. Vol. 24, *SLAS Technology*. SAGE Publications Inc.; 2019. p. 169–80. <https://www.doi.org/10.1177/2472630318824334>
14. J.M. Irache. *Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas*. 2008. <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000100001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1137-6627.
15. González JM, López M, Ruiz G. VTM +: Nanomedicina [Internet]. [cited 2023 Dec 26]. <https://www.madrid.org/bvirtual/BVCM001699.pdf>
16. Pison U, Welte T, Giersig M, Groneberg DA. Nanomedicine for respiratory diseases. Vol. 533, *European Journal of Pharmacology*. 2006. p. 341–50. <https://www.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.068>.

17. Díez-Pascual AM. Surface Engineering of Nanomaterials with Polymers, Biomolecules, and Small Ligands for Nanomedicine. Vol. 15, Materials. MDPI; 2022. <https://www.doi.org/10.3390/ma15093251>.
18. Halwani AA. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. Vol. 14, Pharmaceutics. MDPI; 2022. <https://www.doi.org/10.3390/pharmaceutics14010106>.
19. Doroudian M, O' Neill A, Mac Loughlin R, Prina-Mello A, Volkov Y, Donnelly SC. Nanotechnology in pulmonary medicine. Vol. 56, Current Opinion in Pharmacology. Elsevier Ltd; 2021. p. 85–92. <https://www.doi.org/10.1016/j.coph.2020.11.002>.
20. Diccionario del Español de México (DEM). Conogasi [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 8]. <https://conogasi.org/t%C3%A9rminos/esterico/>
21. Cahn D, Duncan GA. High-Density Branched PEGylation for Nanoparticle Drug Delivery. Cell Mol Bioeng. 2022 Oct 1;15(5):355–66. <https://www.doi.org/10.1007/s12195-022-00727-x>.
22. Giovanna Lollo GRRDTMJA. Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras. 2011. https://analesranf.com/wp-content/uploads/2011/77_04/7704_07.pdf
23. Fernandez-Petty CM, Hughes GW, Bowers HL, Watson JD, Rosen BH, Townsend SM, et al. A glycopolymer improves viscoelasticity and mucociliary transport of abnormal cystic fibrosis mucus. JCI Insight. 2019;4(8). <https://www.doi.org/10.1172/jci.insight.125954>.
24. Kim N, Kwak G, Rodriguez J, Livraghi-Butrico A, Zuo X, Simon V, et al. Inhaled gene therapy of preclinical muco-obstructive lung diseases by nanoparticles capable of breaching the airway mucus barrier. Thorax. 2022 Aug 1;77(8):812–20. <https://www.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215185>.
25. Garbuzenko OB, Kbah N, Kuzmov A, Pogrebnyak N, Pozharov V, Minko T. Inhalation treatment of cystic fibrosis with lumacaftor and ivacaftor co-delivered by nanostructured lipid carriers. Journal of Controlled Release. 2019 Feb 28;296:225–31. <https://www.doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.025>.
26. Guo Y, An B, Lang Z, Zhou F, Zhang X, Wang H. Effects of curcumin on inhibiting the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells and relieving pulmonary arterial hypertension. Farmacia. 2020;68(2):307–12. <https://www.doi.org/10.31925/farmacia.2020.2.16>.
27. Alexa ID, Ilie AC, Prada G, Herghelegiu AM, Luca A, Rotaru TŞ, et al. A comprehensive behavioural assessment of curcumin's effect on inflammatory and non-inflammatory

- pain in mice. *Farmacia*. 2020;68(5):829–34. <https://www.doi.org/10.31925/farmacia.2020.5.8>.
28. Quispe C, Herrera-Bravo J, Khan K, Javed Z, Semwal P, Painuli S, et al. Therapeutic applications of curcumin nanomedicine formulations in cystic fibrosis. Vol. 11, *Progress in Biomaterials*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 321–9. <https://www.doi.org/10.1007/s40204-022-00198-3>.
 29. Berger AL, Randak CO, Ostedgaard LS, Karp PH, Vermeer DW, Welsh MJ. Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Feb 18;280(7):5221–6. <https://www.doi.org/10.1074/jbc.M412972200>.
 30. Dragomir A, Björstad J, Hjelte L, Roomans GM. Curcumin does not stimulate cAMP-mediated chloride transport in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 17;322(2):447–51. <https://www.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.146>.
 31. Velino C, Carella F, Adamiano A, Sanguinetti M, Vitali A, Catalucci D, et al. Nanomedicine Approaches for the Pulmonary Treatment of Cystic Fibrosis. Vol. 7, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2019. <https://www.doi.org/10.3389/fbioe.2019.00406>.
 32. Kaur S, Kumari A, Kumari Negi A, Galav V, Thakur S, Agrawal M, et al. Nanotechnology Based Approaches in Phage Therapy: Overcoming the Pharmacological Barriers. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2021. <https://www.doi.org/10.3389/fphar.2021.699054>.
 33. Wang X, Xie Z, Zhao J, Zhu Z, Yang C, Liu Y. Prospects of Inhaled Phage Therapy for Combatting Pulmonary Infections. Vol. 11, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021. <https://www.doi.org/10.3389/fcimb.2021.758392>.
 34. Leal J, Peng X, Liu X, Arasappan D, Wylie DC, Schwartz SH, et al. Peptides as surface coatings of nanoparticles that penetrate human cystic fibrosis sputum and uniformly distribute in vivo following pulmonary delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020 Jun 10;322:457–69. <https://www.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.032>.
 35. Chee E, García AJ. Biomaterial therapeutic strategies for treatment of bacterial lung infections. *Biofilm*. 2023 Dec 1;5. <https://www.doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100111>.
 36. Chang RYK, Wallin M, Lin Y, Leung SSY, Wang H, Morales S, et al. Phage therapy for respiratory infections. Vol. 133, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2018. p. 76–86. <https://www.doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.001>.