

¿Cápsulas con virus? Una nueva forma de combatir a *Pseudomonas aeruginosa* en la fibrosis quística pulmonar

Gerardo García-González¹, Patricia Martínez-Flores², Joselyn García², David Armando Encinas-Basurto², Josué Juárez², Gerardo Erbey Rodea-Montealegre³, Luis Quihui-Cota⁴, Marco Antonio López-Mata²

1 Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

2 Posgrado en Nanotecnología, Departamento de Física, Universidad de Sonora, Unidad Centro, Hermosillo, Sonora, México.

3 Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México

4 Departamento de Nutrición Pública y Salud, Coordinación de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México.

marco.lopezmata@unison.mx

Resumen

La Fibrosis Quística Pulmonar (FQP) es una enfermedad que se caracteriza por la producción excesiva de moco, el cual suele obstruir y dificultar el proceso respiratorio. Lo anterior crea un nicho propicio para el desarrollo de infecciones bacterianas, que junto con la respuesta inflamatoria provoca una pérdida progresiva de la función pulmonar. Aunque la antibioticoterapia es el tratamiento recomendado para la FQP, la acción bactericida de estos compuestos se ve limitada debido a la matriz moco-bio-película generada por el hospedero y el patógeno, respectivamente. Si a lo anterior se le suma la resistencia de las bacterias a los antibióticos, nos encontramos con una suma de factores que no abonan en la recuperación de los pacientes con FQP. Por

lo anterior, el presente artículo aborda la situación de la FQP y algunas perspectivas sobre los posibles tratamientos basados en el uso de biomateriales, con propiedades mucolíticas (alginato) y mucoadhesivas (quitosano), como matriz de soporte, transporte y liberación de bacteriófagos viables-específicos contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves:

fibrosis quística pulmonar, biomateriales, *Pseudomonas aeruginosa*

Fibrosis Quística (FQ)

Durante el medievo se creía que, si un niño tenía sabor salado al momento de besarlo, significaba que ese niño estaba hechizado y que era inminente su muerte. Posteriormente, durante los siglos XIX y XX, pasamos

de niños hechizados a las razones que establecía la evidencia científica. Las primeras asociaciones a la FQ se relacionaron con un problema pancreático y posteriormente a problemas de tipo intestinal, debido a que el cuadro clínico era similar al que se presentaba en la enfermedad celíaca. Sin embargo, estas asociaciones exclusivas terminaron cuando Fanconi, en 1936, describió por primera vez la FQ (bronquiectasia) diferenciándola de la enfermedad celíaca. Posteriormente, Anderson, en 1938, usó el término “fibrosis quística del páncreas” para referirse al estado de mucosidad espesa generalizada [44]. En México, según datos de la Asociación Mexicana de FQ, anualmente nacen en promedio 400 niños con esta enfermedad, de los cuales el 15 % tiene la oportunidad de ser diagnosticado a tiempo; el resto fallece antes de cumplir los 4 años de edad, debido a complicaciones respiratorias o nutricionales [2]. Se ha estimado que cerca de 3000 individuos con FQ no cuentan con las opciones terapéuticas adecuadas y esto repercute en su calidad de vida. En los países desarrollados, el avance de la medicina en el contexto diagnóstico o terapéutico ha logrado incrementar la esperanza de vida promedio a 45.1 años [39]; sin embargo, en México se siguen buscando mejores alternativas de tratamiento para aumentar el pronóstico por arriba de los 40 años de edad.

Actualmente, se sabe que la FQ es una enfermedad congénita de carácter autosómico recesivo que se caracteriza por afectar diferentes sistemas del organismo y cuyo origen radica en la mutación del gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR*, por sus siglas en inglés) [18, 37]. En consecuencia, esto induce modificaciones en el canal *CFTR*, que

alteran su función en el control del transporte de iones cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-), lo que favorece la deshidratación del tejido y, con ello, la acumulación excesiva de moco y el engrosamiento de los tejidos, alterando de esta forma el espacio físico de los conductos del organismo [3, 51]. La FQ es considerada una enfermedad multisistémica en la que los defectos en la proteína *CFTR* repercuten principalmente en el inadecuado funcionamiento de los pulmones, páncreas, vesícula biliar, testículos y glándulas sudoríparas [22]. Por lo tanto, esto trae consigo un espectro amplio de manifestaciones clínicas entre las que se encuentran la esterilidad en varones, la desnutrición o los problemas respiratorios, en donde estos últimos representan la principal causa de morbimortalidad en los pacientes [13, 56].

Fibrosis Quística Pulmonar y *Pseudomonas aeruginosa*

La fibrosis quística pulmonar (FQP) es la entidad clínica más estudiada dentro de la FQ, debido a que la producción excesiva de moco obstruye y dificulta el proceso respiratorio, produciendo bronquiectasias y la disminución de la actividad de las células ciliadas [8, 52] [Figura 1]. Este exceso de moco promueve el desarrollo de infecciones, ya sean bacterianas, virales o fúngicas, que junto con la respuesta inmunológica intrínseca contribuyen a la exacerbación del problema respiratorio, provocando la pérdida progresiva de la función pulmonar [53].

La mayoría de las infecciones que padecen los pacientes con FQP suelen ser ocasionadas por bacterias [23], las cuales encuentran en la mucosidad desregulada de las vías respiratorias inferiores, un entorno rico en nutrientes y las condiciones microambien-

tales que permiten su establecimiento, desarrollo y colonización del tejido afectado [19, 35]. Dentro de los principales patógenos bacterianos asociados a FQ se encuentran *Staphylococcus aureus*, seguido por *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* y, en menor grado, algunos miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y micobacterias no tuberculosas, las cuales recientemente se han aislado de pacientes con FQP [36].

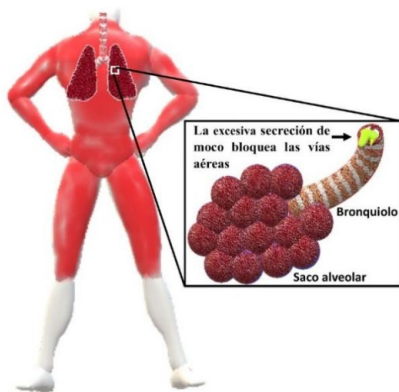


Figura 1. Esquema de la obstrucción de las vías respiratorias provocada por el exceso de secreción de moco en la FQP

Hablando puntualmente de *P. aeruginosa*, se trata de una bacteria en forma de bacilo Gram negativo que es reconocida por sus características bioquímicas distintivas que resaltan durante su cultivo, como lo son la liberación de pigmentos difusibles como la pioverdina y la piocianina, así como por la producción de alginato (exopolisacárido) [Figura 2A]. Si bien es cierto que *P. aeruginosa* es un microorganismo distribuido de manera natural en el medio ambiente, al mismo tiempo es considerado como un importante patógeno oportunista, que en el caso de FQP, la hipermucosidad favorece la proliferación de esta bacteria [47]. Además, se ha evidenciado que las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ son altamente virulentas, caracterizadas

por formación de biopelícula (polisacáridos, DNA extracelular y proteínas), sistema de comunicación de *quórum sensing*, flagelinas, piocianina, pioverdina, proteasas, lipasas, elastasas, exotoxinas, lipopolisacáridos, sistema de secreción tipo 3, fimbrias, entre otros factores moleculares de virulencia [27]. Estos factores, en conjunto, forman la matriz en la que la bacteria queda embebida y dificulta la eliminación del patógeno con los tratamientos convencionales [Figura 2B] [49]. A pesar de que *P. aeruginosa* no está asociada con infecciones bacterianas en los primeros estadios de la FQP, la infección por *P. aeruginosa* cuenta con la mayor tasa de morbimortalidad y con mayor número de ingresos hospitalarios debido a la disfunción que ocasiona con su invasión y colonización [Figura 2C] [16]. Se ha observado que las infecciones por *P. aeruginosa* presentan una mayor incidencia sobre los grupos de jóvenes y adultos, a diferencia de los grupos pediátricos, indicando que la FQP se desarrolla como un proceso de infección crónica, afectando la calidad de vida de los pacientes [17].

Actualmente, los esquemas terapéuticos contra *P. aeruginosa* se basan en el uso de antibióticos como la tobramicina, colistina, levofloxacino, ciprofloxacino y aztreonam, en primer lugar [15, 36], acompañados de agentes mucolíticos como la DNAsa y N-acetilcisteína, para mejorar la eficacia terapéutica de los antibióticos [14]. Sin embargo, la eficacia del tratamiento con antibiótico usado contra *P. aeruginosa* puede tener una acción limitada debido a la presencia de biopelícula, la cual impide la penetración del antibiótico que, en conjunto con la hipersecreción de moco, forman una barrera física que limita el tratamiento antibacteriano. Por lo anterior, algunas estrategias de tratamiento

se han enfocado en el rompimiento de la biopelícula y del moco, para facilitar su expectoración y con ello, procurar la oportuna recuperación de los pacientes [11, 36].

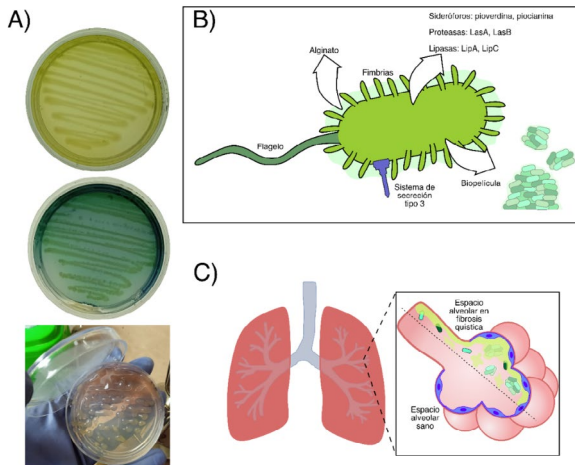


Figura 2. (A) Características del cultivo de *P. aeruginosa*, (B) esquematización de la bacteria embebida en la biopelícula y (C) representación del establecimiento de la bacteria en el espacio alveolar

Los bacteriófagos contra *P. aeruginosa*

La fagoterapia es el concepto que se ha designado para referirse al uso de estas partículas virales con un propósito terapéutico la cual, a su vez, puede utilizarse en combinación con antibioticoterapia convencional e incluso algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado efectos sinérgicos [9, 34]. En este sentido, el uso de bacteriófagos (BACs) es una alternativa terapéutica que ha llamado la atención debido a que son virus que infectan de manera específica a las bacterias y tienen la capacidad de destruirlas [25, 36]. En el caso particular, para el tratamiento de FQP se ha explorado el uso de BACs específicos para *P. aeruginosa* (Figura 3A), ya que su efecto antibacteriano ha sido demostrado *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, e inclusive su potencial capacidad de penetración en la biopelícula (Figura 3B) [10]. Debido a la usual coexistencia de diferentes bacterias en un individuo

con FQ, una forma de aumentar la eficacia de la fagoterapia ha sido mediante la utilización de “cócteles” de BACs que consisten en la combinación de diferentes virus que puedan eliminar distintas especies o cepas bacterianas en un mismo sitio de infección (Figura 3C) [9, 35].

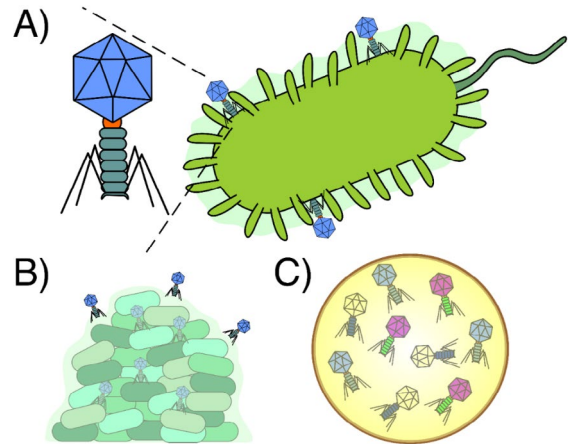


Figura 3. Representación gráfica de bacteriófagos y su mecanismo de infección sobre una bacteria. (A) Esquematización de la fijación específica, (B) penetración sobre la biopelícula y (C) formación de un cóctel de BACs para el incremento de la eficacia fagoterapéutica

La administración de BACs en los pacientes con FQ es un tópico que continúa en desarrollo y que busca aprovechar las principales ventajas de la fagoterapia, tales como su abundancia, omnipresencia en la naturaleza, el efecto nulo sobre las células del hospedero y su capacidad de eliminar de manera específica células bacterianas. Particularmente, dirigiendo el efecto bactericida hacia patógenos resistentes a múltiples antibióticos. A pesar de ello, la eficacia de la fagoterapia usada contra infecciones bacterianas presentes en la FQP también pudiera tener algunas limitaciones terapéuticas debido a: *i*) las características intrínsecas de esta enfermedad, en donde la hiperproducción de moco representa una barrera física y química que podría impedir la acción de los BACs [40], *ii*) las características intrínsecas

de las partículas virales, las cuales son de gran tamaño y pueden ser eliminadas por el sistema inmunológico primario [28] y *iii*) los métodos de manejo y administración de los BACs (nebulización, inhalación de polvos y vaporización) pueden afectar la viabilidad de las partículas virales. Con base en lo anterior, la nanotecnología ofrece alternativas para superar estos inconvenientes mediante el diseño y fabricación nanopartículas basadas en biopolímeros, los cuales pueden funcionar como matrices de soporte con la finalidad de atrapar las partículas virales protegiéndolas de factores físicos y fisiológicos, conservando su viabilidad y su potencial terapéutico. Además, estos bionanomateriales particulados podrían tener la propiedad para transportar y liberar a los BACs en un sitio de interés determinado y mejorar así la acción de la fagoterapia [40].

Biomateriales anti-*P. aeruginosa* enfocados hacia el tratamiento de la FQP

Algunos biomateriales funcionales (quitosano, alginato y algunos lípidos), se han elaborado con el fin de ofrecer nuevas alternativas de tratamiento para pacientes con FQP infectados con *P. aeruginosa*. En esta estrategia se busca modular las condiciones de la producción anormal de moco y la respuesta inmune del organismo, para evitar generar un nicho propicio para el establecimiento, colonización y persistencia de la bacteria [55]. Con estas estrategias, es posible afectar los factores moleculares de virulencia del microorganismo y reducir la capacidad intrínseca de la bacteria para resistir la acción de los antibióticos [7]. La Secretaría de Salud de México [50] recomienda que las infecciones por *P. aeruginosa* se combatan con antibióticos, independientemente de la presencia o ausencia de síntomas, muy

a pesar de la ya conocida resistencia bacteriana a los fármacos [50]. Incluso, si después de dos intentos de erradicación no se ha logrado la descolonización de *P. aeruginosa*, se recomienda el uso de tobramicina en solución como una terapia crónica pulmonar (TCP). Otras TCPs recomendadas son el uso de α -dornasa (DNasa), solución salina hipertónica 7.0 % y esteroides inhalados. Sin embargo, se ha evidenciado que los antibióticos anti-*Pseudomonas* inhalados muestran poca penetración, focalización y generalmente es inactivada su acción debido a su retención en el esputo, lo que limita su acción en el tejido pulmonar [5].

Estas limitaciones han motivado la búsqueda de nuevos biomateriales que ayuden en el esquema del TCP de pacientes con FQ. Siendo los sistemas de liposomas, así como los sistemas micro y nanoparticulados, los más utilizados para la encapsulación y liberación de compuestos bioactivos *in situ*. La idea de generar sistemas liposomales con antibióticos encapsulados han surgido con el objetivo de prolongar su vida media y realizar una liberación controlada y sostenida en el sitio de acción y, a la vez, reducir la concentración del fármaco utilizado. Los liposomas son estructuras de moléculas anfipáticas que se autoensamblan en forma de bicapa esférica, que se conserva por la organización que mantienen los grupos hidrofílicos hacia el ambiente acuoso exterior y otros grupos que se disponen hacia el interior (hidrófobos). La organización de los liposomas es muy similar a las membranas celulares y es por eso que son considerados muy efectivos para transportar y administrar antimicrobianos con buen índice terapéutico y con efectos adversos mínimos [21, 33]. Además, su naturaleza anfifílica se ha aprovechado en la industria farmacéutica

para encapsular y transportar moléculas de diferentes polaridades. Los tratamientos basados en liposomas con antibióticos han demostrado ser muy efectivos para reducir el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa in vitro*, así como la disminución de la formación de biopelícula [20]. Sin embargo, en los ensayos in vivo no se han encontrado diferencias significativas entre liposomas con amikacina vs. tratamiento convencional con tobramicina, que han sido aplicados por inhalación con el objetivo de atender infecciones pulmonares graves [5]. Por otro lado, también se han elaborado nanopartículas cargadas con antibiótico como una alternativa de uso en la TCP, entre ellas se encuentran las nanopartículas de cristal líquido de lípidos de monoacilglicerol y diestearato de glicerilo-ploxámero 188-miglyol812, las cuales han sido usadas para encapsular tobramicina [38]. Otros sistemas nanoparticulados con tobramicina junto con N-acetilcisteína también han mostrado efecto inhibitorio de la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* y se ha observado una disminución significativa en la viscosidad del moco en pacientes con FQ [43]. Aunque se han obtenido avances importantes en la elaboración de materiales sintéticos con antibióticos, la recomendación general de los estudios es reducir la toxicidad que presentan estas nanopartículas sobre las células de mamíferos.

Por otra parte, los biopolímeros son considerados como buenos candidatos para la elaboración de biomateriales dirigidos a tratar las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQP. Entre las mejores opciones se encuentran los polisacáridos como el alginato (ALG) y quitosano (QS), ya que su naturaleza hidrofílica, los hace plausibles de ser nebulizados

o maleables en varias formas que pueden ser usadas para la TCP. El ALG es un polisacárido que se encuentra naturalmente en la pared celular de algas marrón y bacterias como *Azotobacter sp.* y *Pseudomonas sp.* Químicamente, el ALG está compuesto por residuos de ácido β -D-manurónico y α -L-gulurónico, unidos por enlaces glucosídicos 1,4 [46]. Por sus características químicas y disponibilidad, ha sido muy utilizado para la generación de diversos materiales asociados con aplicaciones clínicas y biomédicas, ya que es un biopolímero no tóxico, biocompatible, biodegradable, bioestable y de naturaleza hidrofílica. Adicionalmente, se ha demostrado que el ALG puede funcionar como una biomolécula con capacidad de encapsular, transportar y donar sustancias bioactivas hacia el tejido pulmonar [58]. Por lo anterior, algunos estudios se han enfocado en las propiedades que contienen los oligómeros ricos en ácido gulurónico ($G < 85\%$), el cual ha demostrado que puede alterar las propiedades viscoelásticas del esputo y mejorar el tratamiento con antibióticos contra *P. aeruginosa* [31]. Los grupos funcionales que posee la estructura del ALG también le permite mezclarse fácilmente con otros biopolímeros, pudiendo llegar a formar una red de entrecruzamiento que le permite mejorar sus propiedades, en especial, cuando se une con el QS [54]. Por otro lado, el QS es un polisacárido derivado de la quitina, el cual ha sido utilizado para la elaboración de biomateriales transportadores de fármacos dirigidos a atender las enfermedades infecciosas pulmonares [57]. Este biopolímero se elige principalmente por su naturaleza polianiónica, biodegradable, biocompatible y por sus propiedades antibacterianas, anticancerígenas y mucoadhesivas, lo que le permite tener una afinidad alta por las cargas negativas de la interfaz

de la mucosa, generalmente ricas en ácidos siálicos [42]. Además, la estructura química del QS posee grupos funcionales que le funcionan para enlazar químicamente a otras moléculas, generando nuevos derivados de quitosano con propiedades fisicoquímicas y biológicas específicas, como el O-palmitoil QS, el O-acil QS, o la N-carboxymetil QS, entre otros [4, 59]. Kolonko *et. al.*, [30] desarrollaron nanocápsulas de QS cargadas con capsaicina y ARNm en la superficie que fueron dirigidas hacia líneas celulares con mutación en el gen CFTR, lo anterior con el objetivo de corregir los canales alterados de cloruro epitelial que son los responsables de provocar el desequilibrio osmótico. Otros biomateriales elaborados con QS han seguido la ruta de encapsulación de antibióticos, y han demostrado que dosis orales de QS administradas a ratas inducidas con fibrosis pulmonar idiopática fueron capaces de atenuar la fibrosis pulmonar y el grado de inflamación sobre el tejido en un modelo animal [29]. En este mismo sentido, Ortiz *et. al.*, [41] desarrollaron microcápsulas de QS como un sistema de transporte y entrega de la dapsona, la cual presentó un adecuado depósito en las partes más profundas del pulmón y mostró baja toxicidad *in vivo*. Patel *et. al.*, [42] desarrollaron nanopartículas híbridas de QS uniendo químicamente la enzima ALGiasa en su superficie. Lo que permitió, la internalización de la nanopartícula a través de moco y la liberación del fármaco de manera controlada y sostenida, disminuyendo la proliferación de la *P. aeruginosa*. Por otro lado, si se mezcla ALG con QS es posible obtener una nanopartícula que, según el protocolo de fabricación puede tratarse de un sistema particulado híbrido de carga aniónica o catiónica con la capacidad de cargar y transportar agentes bactericidas (fármacos o BACs) [1, 24, 32].

La Figura 4 muestra una estrategia general adaptada para fabricación de nanopartículas compuestas de ALG-QS en las cuales es posible encapsular un antibiótico o BACs. En este caso particular, los agentes bactericidas se mezclan previamente con la disolución de QS, con la finalidad de que estos agentes queden atrapados en la red polimérica de QS y posteriormente se adicionan, gota a gota, a una disolución de ALG, bajo sonicación constante. Durante este proceso se realiza un entrecruzamiento iónico entre las moléculas de ALG y QS, promoviendo la formación de nanopartículas ALG-QS. Por ejemplo, Hills *et. al.*, desarrollaron un sistema de liberación de fármacos basado en ALG-QS cargado con tobramicina para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* [24]. Por otra parte, Rotman *et. al.*, diseñaron un sistema particulado termorresponsivo basado en ALG-QS como matriz de carga, transporte y liberación de BACs. Con base a los resultados obtenidos, demostraron que la matriz biopolimérica liberó de manera continua partículas virales, conservando su viabilidad [48].

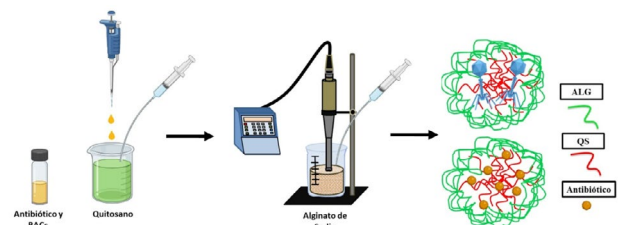


Figura 4. Representación esquemática del protocolo de fabricación de nanopartículas basadas en ALG-QS cargadas con antibióticos y/o BACs

Algunos tratamientos aplicados en modelos animales donde han usado BAC o cócteles de BACs encapsulados en QS y/o ALG, dirigido contra bacterias que ocasionan diarrea [12, 45] y otras afecciones [26], han mostrado buena eficacia. Pero son limitados los estudios clínicos asociados con esquemas del TCP de pacientes con FQ donde se usen bio-

materiales con BACs encapsulados en QS o ALG. Si bien es cierto que estas investigaciones abren una ventana novedosa sobre este conocimiento y el avance en el desarrollo de biomateriales, esto va acompañado con la exigencia social de demostrar que dichos biomateriales son eficaces contra bacterias patógenas, y de librar las barreras químicas y físicas que impone el entorno pulmonar y bacteriano. Por lo tanto, se requiere de una mayor atención tanto de la naturaleza de la matriz de cubierta como del o los BACs que se pretenden usar. Aunque algunas terapias con BAC aplicadas *in vivo* han demostrado eficacia, se ha observado que esta depende de factores asociados con la concentración de fagos y bacterias presentes en el sitio de la infección, evasión de la bacteria (resistencia) y la permanencia intracelular, e incluso se ha observado que los BACs pueden interactuar directamente con células de mamíferos [6], lo que representan retos importantes por atender y estudiar.

Conclusiones

Los estudios asociados con el desarrollo de diversos biomateriales con el objetivo de crear un tratamiento funcional contra la infección ocasionada por *P. aeruginosa* en pacientes FQP se han probado principalmente *in vitro* y la mayoría de estos biomateriales aún se basan en el uso de antibióticos, los cuales no aseguran la correcta eliminación de la infección bacteriana e incluso abonan a los problemas de resistencia a los antibióticos en pacientes con esta problemática. Aunado a lo anterior, los esquemas de tratamiento implementados sobre estos pacientes suelen ser largos y suelen generar efectos adversos debidos a que los tratamientos suelen llegar de manera subóptima. Otras barreras terapéuticas importantes, que son retos que se deben de

considerar al momento de crear biomateriales dirigidos para tratar la FQP, es lograr que dicho material tenga el tamaño adecuado y la capacidad de evadir la fagocitosis mediada por macrófagos. Asimismo, se debe considerar que los biomateriales tengan la capacidad de liberar, permear y eliminar el grosor de la capa de mucosa-biopelícula en el sitio de la infección pulmonar. En este sentido, la nanotecnología pudiera desempeñar un papel importante en el diseño y desarrollo de bionanomateriales (basados en ALG-QS) cargados con BACs específicos, con los cuales se pretende aumentar la eficiencia de los tratamientos anti-*P. aeruginosa* que suelen asociarse a los cuadros más severos de la FQP.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONAHCyT por el financiamiento al proyecto CF-2023-G-41.

Referencias

- [1] Abdallah S. Abdelsattar, Fatma Abdelrahman, Alyaa Dawoud, Ian F. Connerton, and Ayman El-Shibiny. 2019. Encapsulation of *E. coli* phage ZCEC5 in chitosan–alginate beads as a delivery system in phage therapy. *AMB Express* 9,1 (June 2019), 87. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0810-9>
- [2] AMFQ. 2017. Sobre Fibrosis Quística. Retrieved from <http://fibrosisquistica.org.mx/~h4u3f3d9/sobre-la-enfermedad/>
- [3] Dorothy H Andersen. 1938. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *American Journal of Diseases of Children* 56, 2 (August 1938), 344–399. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1938.01980140114013>
- [4] Mohamed E.I. Badawy, Entsar I. Rabea, Tina M. Rogge, Christian V. Stevens, Walter Steurbaut, Monica Höfte, and Guy Smagghe. 2005. Fungicidal and Insecticidal Activity of O-Acyl Chitosan Derivatives. *Polym. Bull.* 54, 4 (July 2005), 279–289. <https://doi.org/10.1007/s00289-005-0396-z>
- [5] Diana Bilton, Tacjana Pressler, Isabelle Fajac, John Paul Clancy, Dorota Sands, Predrag Minic, Marco Cipolli, Ivanka Galeva, Amparo Solé, Alexandra L. Quittner, Keith Liu, John P. McGinnis, Gina Eagle, Renu Gupta, Michael W. Konstan, Sabine Renner, Christiane Knoop, Anne Malfroot, Lieven Dupont, Kristine Desager, Frans De Baets, Miroslava Bosheva, Vania Nedkova, Ivan Galabov, Ivanka Galeva, Andreas Freitag, Nancy Morrison, Pearce Wilcox, Tanja Pressler, Yves Martinet, Raphael Chiron, Isabelle Fajac, Stephan Dominique, Philippe Reix, Anne Prevotat,

- Isabelle Sermet, Isabelle Durieu, Rainald Fischer, Rudolf Huber, Doris Staab, Uwe Mellies, Wolfgang Sextro, Tobias Welte, Heinrike Wilkens, Urte Sommerwerk, Burkhard Bewig, Ilias Inglezos, Stavros-Eleftherios Doudounakis, Olga Bede, Ferenc Gönczi, Rita Újhelyi, Edward McKone, Paul McNally, Vincenzina Lucidi, Marco Cipolli, Mario La Rosa, Laura Minicucci, Rita Padoan, Giovanna Pisi, Rolando Gagliardini, Carla Colombo, Inez Bronsveld, Ewa Sapiejka, Henryk Mazurek, Dorota Sands, Grażyna Górnicka, Iwona Stelmach, Halina Batura-Gabryel, Marta Rachel, Predrag Minic, Jaroslava Orosova, Branko Takac, Anna Feketova, Carmen Martinez, Gloria Garcia Hernandez, Jose Ramon Villa-Asensi, Silvia Gartner, Amparo Sole, Anders Lindblad, Martin Ledson, Diana Bilton, Joanna Whitehouse, Alan Smyth, Ian Ketchell, Timothy Lee, and Gordon MacGregor. 2020. Amikacin liposome inhalation suspension for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 19, 2 (2020), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.08.001>
- [6] Katie Bodner, Arin L. Melkonian, and Markus W. Covert. 2021. The Enemy of My Enemy: New Insights Regarding Bacteriophage–Mammalian Cell Interactions. *Trends in Microbiology* 29, 6 (June 2021), 528–541. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.10.014>
- [7] Kathirvel Brindhadevi, Felix LewisOscar, Eleftherios Mylonakis, Sabarathinam Shanmugam, Tikendra Nath Verma, and Arivalagan Pugazhendhi. 2020. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry* 96, (September 2020), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
- [8] Alan S. Brody. 2004. Early morphologic changes in the lungs of asymptomatic infants and young children with cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 144, 2 (February 2004), 145–146. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.11.008>
- [9] Rachel Yoon Kyung Chang, Theerthankar Das, Jim Manos, Elizabeth Kutter, Sandra Morales, and Hak-Kim Chan. 2019. Bacteriophage PEV20 and Ciprofloxacin Combination Treatment Enhances Removal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Isolated from Cystic Fibrosis and Wound Patients. *AAPS J* 21, 3 (April 2019), 49. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0315-0>
- [10] Rachel Yoon Kyung Chang, Theerthankar Das, Jim Manos, Elizabeth Kutter, Sandra Morales, and Hak-Kim Chan. 2019. Bacteriophage PEV20 and Ciprofloxacin Combination Treatment Enhances Removal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Isolated from Cystic Fibrosis and Wound Patients. *AAPS J* 21, 3 (May 2019), 49. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0315-0>
- [11] Michael E. Chirgwin, Margaret R. Dedloff, Alina Maria Holban, and Monica C. Gestal. 2019. Novel Therapeutic Strategies Applied to *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Materials* 12, 24 (January 2019), 4093. <https://doi.org/10.3390/ma12244093>
- [12] Joan Colom, Mary Cano-Sarabia, Jennifer Otero, Javier Arriñez-Soriano, Pilar Cortés, Daniel Maspocho, and Montserrat Llagostera. 2017. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep* 7, 1 (January 2017), 41441. <https://doi.org/10.1038/srep41441>
- [13] Kris De Boeck, Matijn Weren, Marijka Proesmans, and Eitan Kerem. 2005. Pancreatitis Among Patients With Cystic Fibrosis: Correlation With Pancreatic Status and Genotype. *Pediatrics* 115, 4 (April 2005), e463–e469. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1764>
- [14] Jill Deacon, Sharif M. Abdelghany, Derek J. Quinn, Daniela Schmid, Julianne Megaw, Ryan F. Donnelly, David S. Jones, Adrien Kissenpfennig, J. Stuart Elborn, Brendan F. Gilmore, Clifford C. Taggart, and Christopher J. Scott. 2015. Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: Formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *Journal of Controlled Release* 198, (January 2015), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.022>
- [15] Claire Edmondson and Jane C. Davies. 2016. Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 7, 3 (May 2016), 170–183. <https://doi.org/10.1177/20406223166641352>
- [16] Julia Emerson, Margaret Rosenfeld, Sharon McNamara, Bonnie Ramsey, and Ronald L. Gibson. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 34, 2 (2002), 91–100. <https://doi.org/10.1002/ppul.10127>
- [17] Katherine B. Frayman, David S. Armstrong, Rosemary Carzino, Thomas W. Ferkol, Keith Grimwood, Gregory A. Storch, Shu Mei Teo, Kristine M. Wylie, and Sarath C. Ranganathan. 2017. The lower airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease: a longitudinal analysis. *Thorax* 72, 12 (December 2017), 1104–1112. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209279>
- [18] Laura de Castro e Garcia, Lucas Montiel Petry, Pedro Augusto Van Der Sand Germani, Luiza Fernandes Xavier, Paula Barros de Barros, Amanda da Silva Meneses, Laura Menestrino Prestes, Luana Braga Bittencourt, Marina Puerari Pieta, Frederico Friedrich, and Leonardo Araújo Pinto. 2022. Translational Research in Cystic Fibrosis: From Bench to Beside. *Front. Pediatr.* 10, (May 2022), 881470. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.881470>
- [19] Anthony M. George, Peter M. Jones, and Peter G. Middleton. 2009. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiology Letters* 300, 2 (November 2009), 153–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01704.x>
- [20] Vinod Ghodake, Jyoti Vishwakarma, Sirisha L. Vavilala, and Vandana Patravale. 2020. Cefoperazone sodium liposomal formulation to mitigate *P. aeruginosa* biofilm in Cystic fibrosis infection: A QbD approach. *International Journal of Pharmaceutics* 587, (2020), 119696. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119696>
- [21] Azucena Gonzalez Gomez and Zeinab Hosseinidou. 2020. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS Infect. Dis.* 6, 5 (May 2020), 896–908. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.9b00357>
- [22] Oussama Hallouch, John Marinos, Florence Thibault, Kim-Nhien Vu, Jean Chalaoui, Patrick Bourgouin, Laurence Péloquin, Véronique Freire, François Tremblay, and Carl Chartrand-Lefebvre. 2022. Cystic fibrosis in the 21st century: what every radiologist should know. *Clinical Imaging* 84, (April 2022), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2022.02.004>

- [23] Freya. Harrison. 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153, 4 (2007), 917–923. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004077-0>
- [24] Marcus Hill, Matthew Twigg, Emer A. Sheridan, John G. Hardy, J. Stuart Elborn, Clifford C. Taggart, Christopher J. Scott, and Marie E. Migaud. 2019. Alginate/Chitosan Particle-Based Drug Delivery Systems for Pulmonary Applications. *Pharmaceutics* 11, 8 (August 2019), 379. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080379>
- [25] Sami Hraiech, Fabienne Brégeon, and Jean-Marc Rolain. 2015. Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status. *Drug Design, Development and Therapy* 9, (July 2015), 3653–3663. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S53123>
- [26] Margaret O. ILOMUANYA, Nkechi V ENWURU, Emanuella ADENOKUN, ABIGAIL FATUNMBI, Adebowale ADELUOLA, and Cecilia I IGWILO. 2022. Chitosan-Based Microparticle Encapsulated *Acinetobacter baumannii* Phage Cocktail in Hydrogel Matrix for the Management of Multidrug Resistant Chronic Wound Infection. *Turk J Pharm Sci* 19, 2 (April 2022), 187–195. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.72547>
- [27] Irene Jurado-Martín, Maite Sainz-Mejías, and Siobhán McClean. 2021. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 6 (January 2021), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- [28] Sandeep Kaur, Anila Kumari, Anjana Kumari Negi, Vikas Galav, Shikha Thakur, Manish Agrawal, and Vandana Sharma. 2021. Nanotechnology Based Approaches in Phage Therapy: Overcoming the Pharmacological Barriers. *Frontiers in Pharmacology* 12, (2021). Retrieved February 13, 2024 from <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.699054>
- [29] You-Seok Kim, Qiang Li, Hwa-Young Youn, and Dae Young Kim. 2019. Oral Administration of Chitosan Attenuates Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *In Vivo* 33, 5 (September 2019), 1455–1461. <https://doi.org/10.21873/invivo.11624>
- [30] A. Katharina Kolonko, Janes Efung, Yadira González-Espinosa, Nadine Bangel-Ruland, Willy van Driessche, Francisco M. Goycoolea, and Wolf-Michael Weber. 2020. Capsaicin-Loaded Chitosan Nanocapsules for wtCFTR-mRNA Delivery to a Cystic Fibrosis Cell Line. *Biomedicines* 8, 9 (September 2020), 364. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090364>
- [31] Silke van Koningsbruggen-Rietschel, Jane C. Davies, Tacjana Pressler, Rainald Fischer, Gordon MacGregor, Scott H. Donaldson, Knut Smerud, Nils Meland, Jann Mortensen, Marie Ø Fosbøl, Damian G. Downey, Astrid H. Myrset, Hugo Flaten, and Philip D. Rye. 2020. Inhaled dry powder alginate oligosaccharide in cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover phase 2b study. *ERJ Open Research* 6, 4 (October 2020). <https://doi.org/10.1183/23120541.00132-2020>
- [32] Jaya Lakkakula, Arpita Roy, Karan Krishnamoorthy, Saad Alghamdi, Mazen Almeahmadi, Pratik Gujarathi, Prachi Pansare, Mamdouh Allahyani, Osama Abdulaziz, Kamini Velhal, Most Chand Sultana Khatun, and Md Jamal Hosain. 2022. Alginate-Based Nanosystems for Therapeutic Applications. *Journal of Nanomaterials* 2022, (September 2022), e6182815. <https://doi.org/10.1155/2022/6182815>
- [33] Danielle E. Large, Rudolf G. Abdelmessih, Elizabeth A. Fink, and Debra T. Auguste. 2021. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews* 176, (2021), 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>
- [34] Yu Lin, Diana Quan, Rachel Yoon Kyung Chang, Michael Y.T. Chow, Yuncheng Wang, Mengyu Li, Sandra Morales, Warwick J. Britton, Elizabeth Kutter, Jian Li, and Hak-Kim Chan. 2021. Synergistic activity of phage PEV20-ciprofloxacin combination powder formulation—A proof-of-principle study in a *P. aeruginosa* lung infection model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 158, (January 2021), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.11.019>
- [35] Jim Manos. 2021. Current and Emerging Therapies to Combat Cystic Fibrosis Lung Infections. *Microorganisms* 9, 9 (September 2021), 1874. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091874>
- [36] Jim Manos. 2021. Current and Emerging Therapies to Combat Cystic Fibrosis Lung Infections. *Microorganisms* 9, 9 (September 2021), 1874. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091874>
- [37] Kelly A. Mason and Alan D. Rogol. 2022. Trends in Growth and Maturation in Children with Cystic Fibrosis Throughout Nine Decades. *Front. Endocrinol.* 13, (July 2022), 935354. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.935354>
- [38] María Moreno-Sastre, Marta Pastor, Amaia Esquisabel, Eulàlia Sans, Miguel Viñas, Aarne Fleischer, Esther Palomino, Daniel Bachiller, and José Luis Pedraz. 2016. Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. *International Journal of Pharmaceutics* 498, 1 (2016), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.028>
- [39] National Guideline Alliance (UK). 2017. Cystic Fibrosis: Diagnosis and management. National Institute for Health and Care Excellence (NICE), London. Retrieved December 30, 2023 from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK464183/>
- [40] Renee N. Ng, Anna S. Tai, Barbara J. Chang, Stephen M. Stick, and Anthony Kicic. 2021. Overcoming Challenges to Make Bacteriophage Therapy Standard Clinical Treatment Practice for Cystic Fibrosis. *Frontiers in Microbiology* 11, (2021). Retrieved January 15, 2024 from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.593988>
- [41] Manoel Ortiz, Denise Soledade Jornada, Adriana Raffin Pohlmann, and Sílvia Stanisçuaski Guterres. 2015. Development of Novel Chitosan Microcapsules for Pulmonary Delivery of Dapsone: Characterization, Aerosol Performance, and *In Vivo* Toxicity Evaluation. *AAPS PharmSciTech* 16, 5 (October 2015), 1033–1040. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0283-3>
- [42] Krishna Kumar Patel, Muktanand Tripathi, Nidhi Pandey, Ashish Kumar Agrawal, Shilpkala Gade, Md Meraj Anjum, Ragini Tilak, and Sanjay Singh. 2019. Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis.

- International Journal of Pharmaceutics 563, (2019), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.051>
- [43] Ewelina Piktel, Urszula Wnorowska, Joanna Depciuch, Dawid Lysik, Mateusz Cieśluk, Krzysztof Fiedoruk, Joanna Mystkowska, Magdalena Parlińska-Wojtan, Paul A Janmey, and Robert Bucki. 2022. N-Acetyl-Cysteine Increases Activity of Peanut-Shaped Gold Nanoparticles Against Biofilms Formed by Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Infect Drug Resist* 15, (March 2022), 851–871. <https://doi.org/10.2147/IDR.S348357>
- [44] Paul M. Quinton. 1999. Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective. *Physiological Reviews* 79, 1 (January 1999), S3–S22. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S3>
- [45] Golnar Rahimzadeh, Majid Saeedi, Mahmood Moosazadeh, Seyyed Mohammad Hassan Hashemi, Amirhossein Babaei, Mohammad Sadegh Rezai, Kosar Kamel, Kofi Asare-Addo, and Ali Nokhodchi. 2021. Encapsulation of bacteriophage cocktail into chitosan for the treatment of bacterial diarrhea. *Sci Rep* 11, 1 (August 2021), 15603. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95132-1>
- [46] Raha Ahmad Raus, Wan Mohd Fazli Wan Nawawi, and Ricca Rahman Nasaruddin. 2021. Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 16, 3 (2021), 280–306. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.001>
- [47] Nicole Reyne, Alexandra McCarron, Patricia Cmielewski, David Parsons, and Martin Donnelley. 2023. To bead or not to bead: A review of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection models for cystic fibrosis. *Frontiers in Physiology* 14, (2023). Retrieved January 30, 2024 from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1104856>
- [48] S. G. Rotman, V. Post, A. L. Foster, R. Lavigne, J. Wage-mans, A. Trampuz, M Gonzalez Moreno, W. -J. Metsemakers, D. W. Grijpma, R. G. Richards, D. Eglin, and T. F. Moriarty. 2023. Alginate chitosan microbeads and thermos-responsive hyaluronic acid hydrogel for phage delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 79, (January 2023), 103991. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103991>
- [49] Don B. Sanders, Zhanhai Li, Anita Laxova, Michael J. Rock, Hara Levy, Jannette Collins, Claude Ferec, and Phillip M. Farrell. 2014. Risk Factors for the Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease throughout Childhood. *Annals ATS* 11, 1 (January 2014), 63–72. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201309-303OC>
- [50] Secretaría de Salud. DETECCIÓN, DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO INTEGRAL DE FIBROSIS QUISTICA. gov. mx. Retrieved August 26, 2022 from <http://www.gob.mx/salud/cnegr/documentos/deteccion-diagnostico-y-tratamiento-integral-de-fibrosis-quistica>
- [51] Michal Shteinberg, Iram J. Haq, Deepika Polineni, and Jane C. Davies. 2021. Cystic fibrosis. *Lancet* 397, 10290 (June 2021), 2195–2211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3)
- [52] Michal Shteinberg, Iram J. Haq, Deepika Polineni, and Jane C. Davies. 2021. Cystic fibrosis. *Lancet* 397, 10290 (June 2021), 2195–2211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3)
- [53] Michal Shteinberg, Iram J. Haq, Deepika Polineni, and Jane C. Davies. 2021. Cystic fibrosis. *Lancet* 397, 10290 (June 2021), 2195–2211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3)
- [54] Kokkarachedu Varaprasad, Tippabattini Jayaramudu, Vimala Kanikireddy, Claudio Toro, and Emmanuel Rotimi Sadiku. 2020. Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. *Carbohydrate Polymers* 236, (2020), 116025. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116025>
- [55] Cecilia Velino, Francesca Carella, Alessio Adamiano, Maurizio Sanguinetti, Alberto Vitali, Daniele Catalucci, Francesca Bugli, and Michele Iafisco. 2019. Nanomedicine Approaches for the Pulmonary Treatment of Cystic Fibrosis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, (2019). Retrieved August 26, 2022 from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00406>
- [56] Michael Wilschanski and Peter R. Durie. 2007. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut* 56, 8 (August 2007), 1153–1163. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.062786>
- [57] Thiago Medeiros Zacaron, Mariana Leite Simões e Silva, Mirsiane Pascoal Costa, Dominique Mesquita e Silva, Allana Carvalho Silva, Ana Carolina Morais Apolônio, Rodrigo Luiz Fabri, Frederico Pittella, Helvécio Vinícius Antunes Rocha, and Guilherme Diniz Tavares. 2023. Advancements in Chitosan-Based Nanoparticles for Pulmonary Drug Delivery. *Polymers* 15, 18 (January 2023), 3849. <https://doi.org/10.3390/polym15183849>
- [58] A. Zahoor, Sadhna Sharma, and G. K. Khuller. 2005. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 4 (October 2005), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.012>
- [59] M Gulrez Zariwala, Harshada Bendre, Anatoliy Markiv, Sebastien Farnaud, Derek Renshaw, Kevin MG Taylor, and Satyanarayana Somavarapu. 2018. Hydrophobically modified chitosan nanoliposomes for intestinal drug delivery. *Int J Nanomedicine* 13, (September 2018), 5837–5848. <https://doi.org/10.2147/IJN.S166901>