

## Vectorización de agentes antiinflamatorios a macrófagos para potenciar su actividad utilizando micropartículas

Villa Hermosilla Mónica Carolina<sup>1</sup>, Negro Álvarez Sofía<sup>1</sup>, Montejo Rubio Consuelo<sup>2</sup>, Hurtado Marcos Carolina<sup>2</sup>, Fernández Carballido Ana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de Salud. Universidad San Pablo-CEU Universities, Av. de Montepríncipe, s/n, 28668 Madrid, España.

\*Correspondencia: mcvhermosilla@ucm.es

### 1. Introducción

El sistema inmunitario, frente a una lesión en los tejidos, se activa produciendo una respuesta inflamatoria regulada por macrófagos [1]. Una estrategia interesante para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas es dirigir micropartículas (MPs) de PLGA cargadas con agentes antiinflamatorios a macrófagos. Entre los agentes empleados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide [2, 3] o la artritis idiopática juvenil [4, 5], se encuentran el celecoxib y la sulfasalazina. El celecoxib (CXB) es un antiinflamatorio no esteroideo selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), que constituye en este momento una excelente opción para el manejo de los síntomas tanto en artritis reumatoide como en osteoartritis y dolores agudos. La sulfasalazina (SSZ) es un antiinflamatorio no esteroideo y se engloba dentro de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD). Puede disminuir el dolor y la hinchazón de la artritis, prevenir el daño articular y reducir el riesgo de discapacidad a largo plazo. El objetivo del presente trabajo es desarrollar dos formulaciones de micropartículas, una con SSZ y otra con CXB; cuyas características sean óptimas para ser fagocitadas por macrófagos [6] y ejercer su actividad antiinflamatoria en su interior.

### 2. Material y métodos

#### 2.1. Elaboración y caracterización de micropartículas

Para la elaboración de las formulaciones se empleó el polímero PLGA Resomer<sup>®</sup> 502. El método utilizado fue la evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. Se prepararon MPs blancas (MPs-0), MPs cargadas con SSZ (MPs-S) y MPs cargadas con CXB (MPs-X). También se prepararon MPs con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (MPs-F), para los estudios de fagocitosis. Las formulaciones cargadas con los agentes antiinflamatorios (MPs-S, MPs-X), incorporaron el activo en un porcentaje del 5 % respecto al polímero. Mientras que las MPs-F la FITC se incorporó al 10 %. Las MPs se caracterizaron atendiendo a su diámetro medio y distribución de tamaño (difracción de rayo láser), aspecto morfológico (microscopía de barrido), eficacia de encapsulación (EE %) y estudios de cesión. Los ensayos de cesión se realizaron a una temperatura de 37 °C con agitación constante, y como medio de disolución para los estudios de las MPs-S se empleó únicamente tampón fosfato (PBS) a pH=7,4 y para las MPs-X se adicionó lauril sulfato sódico (LSS) al 3 %. Los estudios de cesión se realizaron durante 72 h, por ser el tiempo empleando en la evaluación de la actividad antiinflamatoria en macrófagos.

#### 2.2. Estudios en macrófagos

La línea celular de macrófagos de ratón RAW264,7 fue la seleccionada para todos los es-

tudios en macrófagos. Las células fueron previamente tratadas con lipopolisacárido.

La evaluación de la captación de MPs por parte de macrófagos se realizó con la formulación cargada con agente fluorescente (MPs-F). Para ello, los macrófagos fueron incubados con las MPs durante 2, 3 y 5 horas. Las muestras obtenidas a estos tiempos se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de ambas formulaciones se realizó en cultivos celulares de macrófagos cuantificando el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Se evaluaron las formulaciones cargadas con los activos (MPs-S y MPs-X), y sus correspondientes soluciones (SSZ-sol y CXB-sol). Para ello, los macrófagos se incubaron con las diferentes formulaciones durante 72 horas. En todos los casos, la concentración del activo empleado fue de 1 mg/mL. El medio de cultivo se analizó mediante ELISA para cuantificar la concentración TNF- $\alpha$ . Por último, para evaluar la inhibición de la expresión génica de los macrófagos tras las 72 h, se realizó un análisis de PCR-RT con cebadores específicos y cuantificados por software de densitometría ImagenJ a partir de una electroforesis en gel de agarosa.

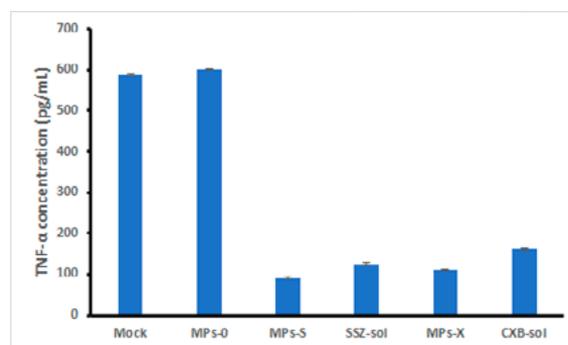
### 3. Resultados y discusión

Las cuatro formulaciones de MPs (MPs-S, MPs-X, MPs-0 and MPs-F) presentaron una superficie lisa y homogénea. En todos los casos se observaron poblaciones monodispersas con tamaños de partícula óptimos para ser fagocitados por macrófagos [6]:  $3,99 \pm 0,41 \mu\text{m}$  para MPs-0,  $3,98 \pm 0,91 \mu\text{m}$  para MPs-F,  $4,09 \pm 0,64 \mu\text{m}$  para MPs-S y  $4,40 \pm 0,57 \mu\text{m}$  para MPs-X. Los valores de eficacia de encapsulación obtenidos fueron del 1 % para las MPs-F, 80 % para las MPs-S y del 85 % para las MPs-X.

En los ensayos de cesión, se muestra un burst inicial a las 6 h de más del 60 % para la formulación MPs-S y de 7 % para la formulación MPs-X. Esa liberación va seguida de una liberación prácticamente total a las 72 horas para la MPs-S. Sin embargo, para la MPs-X la liberación inicial va seguida de una liberación sostenida de manera que las 72 horas sólo se ha liberado el 20 % del CXB.

En los ensayos de captación de las micropartículas cargadas con el agente fluorescente FITC (MPs-F), se observó la presencia de las MPs en el interior del macrófago a las 2 h de la incubación.

La actividad antiinflamatoria de las formulaciones (MPs-S, MPs-X, SSZ-sol y CXB-sol) se evaluó midiendo la concentración de TNF- $\alpha$  a las 72 horas (Fig.1). La presencia de MPs blancas (MPs-0) da lugar a un ligero incremento en la concentración de TNF- $\alpha$  a las 72 h respecto al control negativo. Por el contrario, se observó una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) cuando se evaluaron los activos en solución (SSZ-sol y CXB-sol) y en las MPs (MPs-S y MPs-X). Los mejores resultados se obtuvieron cuando los agentes antiinflamatorios se incluyeron en las micropartículas.



**Fig. 1:** Valores medios de TNF- $\alpha$  a las 72 horas, de las formulaciones MPs blancas (MPs-0) MPs con SSZ (MPs-S), SSZ en solución MPs con CXB (MPs-X), CXB en solución y el control (Mock).

Los resultados obtenidos concuerdan con la reducción en los valores relativos de la expresión génica de TNF- $\alpha$ , obtenidos tras las 72h por ser parte del mecanismo de acción de los activos.

### 4. Conclusiones

Las micropartículas de sulfasalazina y celecoxib elaboradas con PLGA son rápidamente fagocitadas por los macrófagos RAW 264,7. En las condiciones estudiadas, las micropartículas de sulfasalazina y las de celecoxib consiguen una mejor respuesta antiinflamatoria, cuando son fagocitadas por los macrófagos, que cuando estos fármacos son evaluados en solución.

### Agradecimientos

Grupo de investigación "Administración Parenteral de Medicamentos" de la Universidad Complutense de Madrid (Grupo 910939).

### Referencias bibliográficas

1. Pan F, et al. *Lupus*. 2018;27:1898-902.
2. Weinblatt, ME. et al. *J Rheuma*. 1999;26: 2123-30.
3. Fidahic M, et al. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017. Accessed 01 September 2021.
4. Van Rossum MA, et al. *Annu. Rheum Dis*. 2007;6:1518-24.
5. Shi CL, et al. *Indian Pediatr*. 2021;58:162-8.
6. Hirota K, et al. *J Control Release*. 2017;119:69-76.

Este trabajo debe ser citado como:

Villa Hermosilla MC, Negro Álvarez S, Montejo Rubio C, Hurtado Marcos C, Fernández Carballido A. Vectorización de agentes antiinflamatorios a macrófagos para potenciar su actividad utilizando micro-partículas. *Rev Esp Cien Farm*. 2021;2(2):262-4.