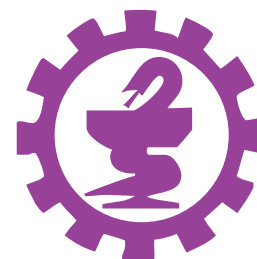


Cosmética



Eficacia en los productos cosméticos

Un enfoque celular

M. Reina del Pozo y S. Castel Gil

Celltec-UB, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona

La regulación europea que define el desarrollo y comercialización de los productos cosméticos hace un énfasis especial en la necesidad de demostrar la efectividad de los productos cosméticos, en un entorno en el que, debido a la prohibición de uso de modelos experimentales animales, sólo es posible el estudio en modelos alternativos (*in silico*, *in vitro*, en cultivo, etc.) o en voluntarios sanos. Dentro de los métodos alternativos, la utilización de los modelos celulares adquiere cada vez más importancia por los grandes avances que se producen en la comprensión de los complejos procesos moleculares que regulan y controlan el devenir de la célula, individualmente y dentro de los tejidos

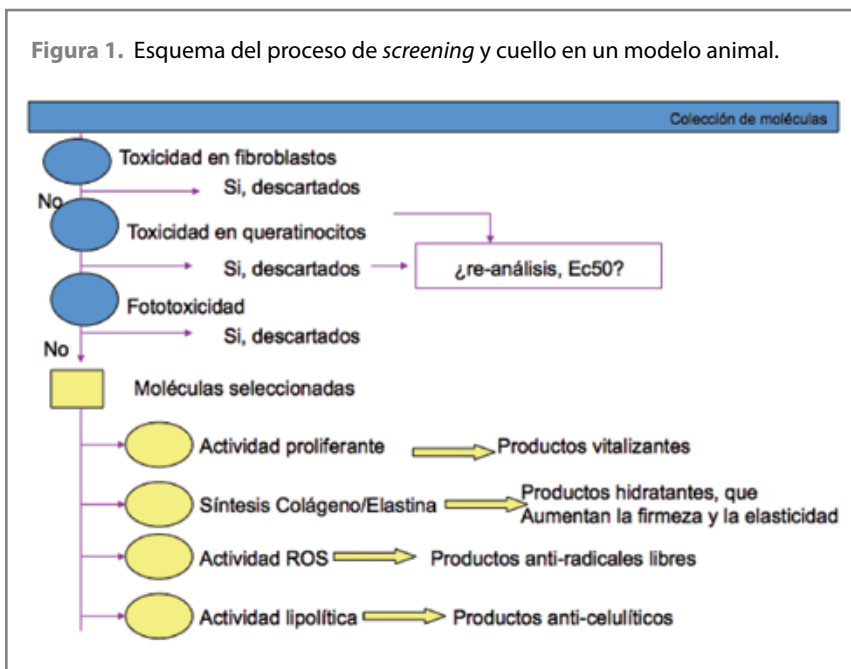
Regulation European that defines the development and commercialization of the cosmetic products does a special emphasis in the need to demonstrate the efficiency of the cosmetic products, in an environment in which, due to the prohibition of use of experimental animal models, only the study is possible in alternative models (*in silico*, *in vitro*, *in culture*, etc.) or in healthy volunteers. Inside the alternative methods, the utilization of the cellular models acquires increasingly importance for the big advances that take place in the comprehension of the complex molecular processes that they regulate and control to develop of the cell, individually and inside the fabrics

Podemos leer en la Guideline for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products de COLIPA [1] que la búsqueda de evidencias que permitan apoyar las reivindicaciones de efectividad cosmética han de formar parte integral del desarrollo del producto cosmético, y no solo como apoyo a la comunicación de la efectividad del producto. En el mismo documento, describe los tipos de estudios disponibles, tanto sobre voluntarios humanos como los ensayos *ex vivo* e *in vitro*. En los estudios *ex vivo*, muestras de material humano (cabello, muestras superficiales de piel -*tape strips*-, microflora dérmica...) son analizados en el laboratorio. Los estudios *in vitro* son aquellos realizados en el laboratorio en medios artificiales, y comprenden todo tipo de análisis instrumentales en fracciones celulares o tisulares, así como en cultivos celulares. Este último modelo, los cultivos celulares, se ha desarrollado muy extensamente en los últimos años y, en sentido amplio, comprende desde aquellos cultivos de células individuales de un único tipo celular diferenciado (por ejemplo, fibroblastos dérmicos, queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans...), como combinaciones de dos o más tipos celulares en estructuras incluso muy organizadas tridimensionalmente, como los modelos de piel reconstituida. Algunos de estos modelos han sido validados por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) para la evaluación de la seguridad de los productos cosméticos. Nos referiremos a estos sistemas, simples o complejos, como sistemas celulares en cultivo.

Históricamente la utilización de sistemas celulares en cultivo ha sido considerada una técnica compleja, más propia de los laboratorios académicos que de los laborato-

rios de evaluación de propiedades de las empresas cosméticas. Dos razones podrían explicarlo. La primera es la propia dificultad de la técnica, la necesidad de instalaciones estériles y de un personal con experiencia en esta metodología. Por otra parte, los modelos celulares más interesantes para esta aplicación no son fáciles de aislar y cultivar y, frecuentemente, requieren de aislamientos sucesivos, periódicos, al tratarse de cultivos primarios o líneas primarias de corta duración. Sin embargo, en los últimos años varios hechos han facilitado en gran medida la aplicación amplia de esta tecnología, entre los que destacarían la aparición de proveedores comerciales de los modelos celulares más comunes (fibroblastos, queratinocitos, melanocitos), así como de empresas que suministran los modelos complejos integrados en *kits* de relativamente fácil manejo (Skinethics, Mattek, StratiCell...). Además, en los últimos años una nueva tecnología, basada en la utilización de las células madre adultas (aSC), embrionarias (hESC) o pluripotentes inducidas (IPS), ha abierto la posibilidad de disponer de modelos diferenciados complejos con mucha mayor facilidad, e incluso con la posibilidad de disponer de paneles de células de diferentes individuos con fenotipos dérmicos diversos. Podríamos destacar en este ámbito los recientes avances tecnológicos en la generación de IPS publicados esta misma semana por el grupo de Obokata [2].

Los sucesivos avances en la comprensión del funcionamiento de las células, de sus procesos intracelulares y de las interacciones que establecen entre los diferentes tipos celulares en el tejido, han permitido identificar posibles dianas de interés para el desarrollo de activos o productos cosméticos. La aplicación de técnicas genómicas para comparar los genes que están activos en la piel joven y que dejan de estar presentes en la piel vieja están permitiendo identificar toda una serie de dianas para el



tratamiento cosmético de los síntomas de la edad en la piel [3-5].

Un ejemplo que podría ilustrar este fenómeno es el de las sirtuínas. Las sirtuínas son unas enzimas intracelulares implicadas en la modificación de la estructura de la cromatina, a la que modifican provocando la aparición/desaparición de ciertas señales epigenéticas. Se describió su función en el año 2000 [6-7], y se relacionó la sobreexpresión de sirtuínas con el rejuvenecimiento celular, especialmente debido a que se pudo demostrar su activación en situaciones de restricción calórica [8] en las que se retrasa la aparición de los síntomas del envejecimiento. Por ejemplo, estudios empleando tanto explantes de piel *ex vivo* como cultivos de células dérmicas [9] demuestran el papel de ciertos activos, biopéptidos, como activadores de Sirtuina1, y describen un incremento significativo de la resistencia al daño en el DNA (inducida por radiación UV), así como una mejora de síntomas dérmicos relacionados con la edad (reducción de rugosidad dérmica, aumento de firmeza, densidad y homogeneidad, reducción de la pigmentación...). Así pues, información novedosa sobre un nuevo mecanismo molecular permite identificar una posible diana para el

desarrollo de nuevos activos cosméticos, al mismo tiempo que aporta los métodos analíticos (*western blot*, inmunolocalización, PCR de tiempo real, metilación de cromatina...) para poder medir el efecto del activo en sistemas de células en cultivo.

A continuación se describirán tres aproximaciones experimentales realizadas por los autores para la evaluación de la efectividad cosmética, empleando, en todos, los casos, sistemas celulares en cultivo.

EJEMPLO 1. IMPLEMENTACIÓN DE UNA CASCADA DE SCREENING DE MEDIO RENDIMIENTO DE ACTIVOS COSMÉTICOS EMPLEANDO MODELOS CELULARES

Una de las necesidades presentes en la industria de desarrollo farmacéutico es el de disponer de sistemas suficientemente sensibles para poder determinar el efecto de una nueva molécula disponible en muy pequeñas cantidades, del orden de nanogramos o picogramos. Esto ha llevado al desarrollo de numerosos sistemas, tanto basados en células como en extractos de las mismas, en ensayos bioquímicos, enzimáticos..., que permitan analizar la respuesta que inducen miles o decenas de miles de moléculas al día. Estos sistemas

desarrollados para los procesos HTS de la industria de discovery farmacéutica pueden ser aplicados, adaptados, a la caracterización de compuestos o preparados de acción cosmética. Con esta idea en mente se desarrolló e implementó entre los años 2001 a 2003 un procedimiento de análisis de efectividad cosmética que se aplicó a colecciones de extractos de plantas y nuevas entidades químicas.

Este procedimiento tiene dos partes. En la primera se determinan los parámetros de seguridad. El objetivo es escoger entre la colección de sustancias a evaluar aquellas que no sean citotóxicas. En la segunda parte se determinan las propiedades cosméticas de los productos seleccionados.

En la primera parte se utilizan modelos celulares dérmicos, especialmente fibroblastos y/o queratinocitos proliferantes, que se mantienen en placas de cultivo de 96 pocillos.

Sobre estas células se aplican concentraciones predefinidas (2) de los compuestos a tratar, y se determinan sucesivamente parámetros de seguridad, como la citotoxicidad/fototoxicidad medida por el test WST-1 (toxicidad mitocondrial) [10], incorporación de rojo neutro (toxicidad en la ruta endocítica) [11], etc. Aquellos productos que presenten citotoxicidad extrema son descartados, mientras que los que presenten una citotoxicidad media son reevaluados, determinándose la dosis letal 50 (IC50). En función de este valor, pueden ser rescatados para análisis posteriores, empleando la máxima concentración no citotóxica.

En la segunda fase se emplean diferentes modelos celulares y ensayos en función de la reivindicación cosmética que se busque. Una lista ilustrativa, no exhaustiva, se puede ver en la Tabla 1. Como ejemplo, podríamos

evaluar en cultivos de 10.000 melanocitos (pocillo de 0,32 cm²) la capacidad de síntesis de melanina después de la aplicación del producto, o la capacidad de inhibición de la síntesis de melanina después de aplicar el producto sobre melanocitos activados con sustancias activadoras de la síntesis de melanina, como, por ejemplo, forskolina. Este ensayo, dependiendo del diseño experimental, permite identificar productos pigmentadores y despigmentadores.

La aplicación de varios de los ensayos, modelos celulares y diseños experimentales disponibles, permite definir, para cada uno de los productos de acción cosmética evaluados, un vector en los que cada uno de los elementos del vector contiene información sobre una efectividad cosmética concreta. De este modo se pueden clasificar cientos o miles de productos, tanto extractos como principios activos complejos o moléculas puras, definiendo un "perfil de actividad cosmética" que oriente el desarrollo posterior, regulatorio, del producto en cuestión, aumentando su probabilidad de éxito.

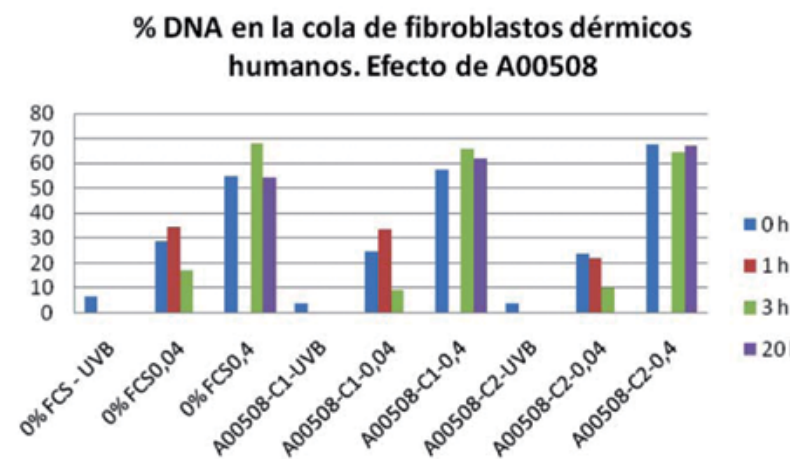
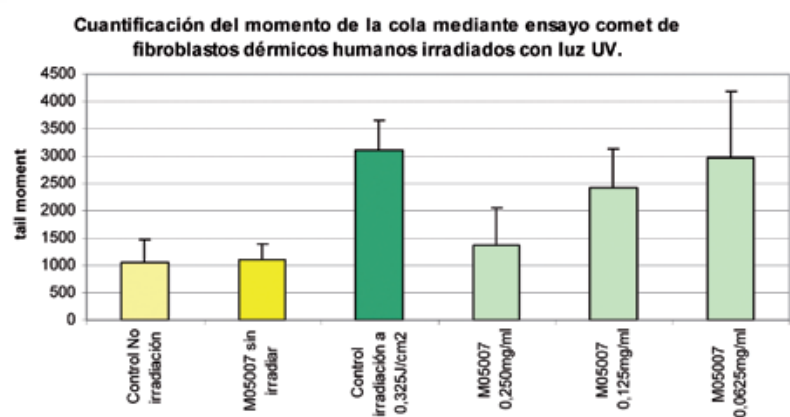
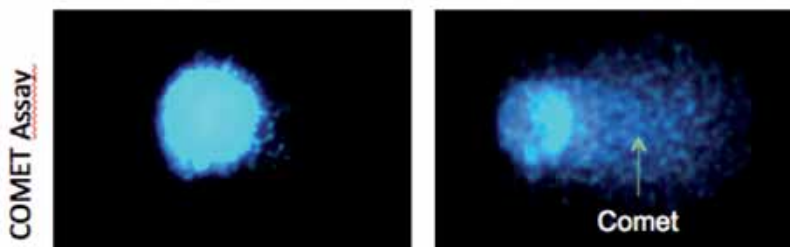
EJEMPLO 2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA O REGENERADORA DEL DNA

Es ampliamente conocido que un aumento de exposición a la luz solar induce cambios indeseables en la piel y el interior de las células. Uno de los agentes considerados es la radiación ultravioleta (UV), aunque algunos autores también asignan un cierto papel a otras regiones del espectro electromagnético, como la radiación infrarroja (IR) [12-13]. Muchos productos cosméticos se aplican en superficies de la piel expuestas de manera natural a la radiación solar, tanto en situaciones de corta exposición como de larga duración e intensidad (por ejemplo, productos solares). Así pues, la evaluación no solo de la seguridad en esas situaciones (posible fototoxicidad), sino de mecanismos que puedan reducir, limitar o compensar los

Tabla 1.

Test / Ensayo	Ejemplo de aplicación / Reivindicación
Citotoxicidad (mitocondrial)	Toxicidad
Citotoxicidad (membrana plasmática)	Toxicidad
Proliferación y activación celular	Actividad vitalizante
Análisis de la matriz extracelular (elastina)	Elasticidad
Análisis de la matriz extracelular (colágenos)	Firmeza
Análisis de la matriz extracelular (hialurónico, PG)	Hidratación
Niveles de aparición de radicales libres (ROS)	Anti-edad
Metabolismo de glucosa en adipocitos	Anticelulítico
metabolismo de ácidos grasos en adipocitos	Anticelulítico
Inhibición de la diferenciación adipocitaria	Anticelulítico
Ensayo de adhesión celular	Actividad vitalizante
Absorción percutánea	Penetración dérmica
Activación de la síntesis de melanina	Efecto pigmentante
Inhibición de la síntesis de melanina	Efecto despigmentante

Figura 2. COMET. (A) Núcleos intacto y fragmentado (ver comet) (B) Determinación del tamaño de la cola en fibroblastos dérmicos tratados e irradiados con UV: M05007 presenta efecto protector de la radiación UV (C) Determinación del tamaño de la cola en fibroblastos dérmicos irradiados con UV y posteriormente tratados: A00508 tiene efecto reparador



ABREVIATURAS

- ECVAM:** European Center for Validation of Alternative Methods (<http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/home>)
- aSC:** células madre adultas
- hESC:** células madres embrionarias
- IPS:** células madres pluripotentes inducidas
- UV:** radiación ultravioleta
- IR:** radiación infrarroja

En el estudio de todos estos mecanismos moleculares se han desarrollado estrategias experimentales de gran potencia, pero que en general permiten determinar el efecto solo sobre uno de los muchos mecanismos implicados. Esto, desde el punto de vista del *screening* de efectividad cosmética dificulta en gran medida su aplicación. Como ejemplo de aplicación de una de las metodologías proceso-específicas en el daño en el DNA, podríamos citar la detección de dímeros de timina mediante anticuerpos específicos y cuantificación por técnicas de análisis de imagen.

Por eso, es de gran interés disponer de algunos ensayos, como puede ser el ensayo COMET (en realidad "Single Cell Electrophoresis Assay"), descrito por Ostling and Johansson en 1984 y modificado por diversos autores [14]. Este es un método simple que permite medir la aparición de roturas en la molécula de DNA en el interior del núcleo de las células eucariotas. Las células teñidas con un colorante que se une al DNA se incluyen en una matriz de agarosa sobre un cubreobjetos, y se someten a un campo eléctrico. Los fragmentos de DNA liberados por las roturas escapan del núcleo celular a través de los complejos de poro, formando una estructura de "cola de cometa" de DNA libre hacia el ánodo. El tamaño de la cola formada es proporcional a la fragmentación provocada en la molécula de DNA. Un producto a evaluar tendrá un efecto protector si las células expuestas al agente lesivo (por ejem-

efectos nocivos sobre la calidad de la piel de un exceso de radiación solar, son un objetivo de la industria cosmética y, entre ellos, los que permiten proteger al DNA o contribuir a una mayor capacidad de reparación de los daños infligidos.

Los mecanismos moleculares mediante los cuales se introducen daños en la molécula de DNA por efecto de la radiación solar son ampliamen-

te conocidos, e incluyen formación de dímeros de timina, transiciones, transversiones, deaminaciones..., en muchos casos mediados por radicales libres que, además, pueden alterar el mecanismo de respuesta al daño (sistema SOS). Como consecuencia, se introducirán errores en la replicación que pueden reducir la viabilidad de las células hijas y provocar un aumento de los síntomas del envejecimiento.

plo, radiación UV), en presencia del mismo, presentan una reducción del tamaño de la cola respecto a las células no tratadas. Si inducimos un daño en el DNA y posteriormente comparamos el efecto del producto en la fase de recuperación, la reducción del tamaño de la cola en las células tratadas respecto a las no tratadas nos permitirá identificar una acción reparadora del DNA.

EJEMPLO 3. ENSAYOS MULTIPARAMÉTRICOS

En el último decenio se ha vivido en el ámbito de la investigación biológica un gran desarrollo de las disciplinas ómicas. Empezando por la genómica, pero también la proteómica, transcriptómica, metabonómica... Y entre ellas la denominada celómica. Esta disciplina pretende emplear técnicas de análisis multiparamétrico sobre sistemas celulares en cultivo. Esto en la práctica significa que sobre una misma célula, empleando técnicas de análisis de imagen, se puedan determinar varios parámetros, tantos canales de lectura independiente dispongamos y sondas compatibles existan. Un ejem-

plo se muestra en la Figura 3, aplicado a la detección de dianas de toxicidad en un sistema celular [15]. Este tipo de métodos, aplicado al *screening* de efectividad cosmética, podrá permitir en un futuro próximo determinar múltiples parámetros de efectividad cosmética en un mismo cultivo celular, reduciendo notablemente los costes y aumentando la eficiencia.

CONCLUSIONES

La cada vez mayor disponibilidad de modelos celulares especializados de fácil acceso, al ser comerciales; las nuevas técnicas y procesos de medida muchos de ellos estandarizados, como kits; así como el conocimiento cada vez más detallado del funcionamiento y dinámica celular, permite ya identificar nuevas dianas que son de interés para el desarrollo de nuevos activos o principios cosméticos que permiten sustentar/apoyar nuevas reivindicaciones mediante rigurosos experimentos científicos, lo que permite afirmar que los cosméticos hoy, y en un futuro próximo, serán diseñados de manera más inteligente y serán claramente más efectivos.

Referencias

[1] Colipa, (2008) 'Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products'

[2] Obokata, H., Wakahama, T., Sasai, Y., Kojima, K., Vacanti, M.P., Niwa, H., Yamato, M., Vacanti, Ch.A. 2014. "Stimulus triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency". Nature 505, 641-6473.

[3] Geddes, L. 2009. "How genes make our skin look older". New Scientist 27 June 2009.

[4] Osborne, R., Mullins, L.A., Jarrold, B.B. 2009. "Understanding metabolic pathways for skin anti-aging". J Drugs Dermatol. 8, s4-7

[5] Robinson, M.K., Binder, R.L., Griffiths, Ch.E.M. 2009. "Genomic-driven insights into changes in aging skin" J. Drugs Dermatol. 8, s8-11

[6] Frye, R.A. 2000. "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins". Biochem. Biophys. Res. Commun. 273, 793-798.

[7] Oberdoeffler, Ph., Michan, Sh., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.-K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loecherer, P., Wright, P., Wright, S.M., Mills, K.D., Bonni, A., Yarkner, B.A., Scully, R., Prolla, Th.A., Alt, F.W., Sinclair, D.A. 2008. "SIRT1 Redistributes on Chromatin Promotes Genomic Stability but Alters Gene Expression during Aging" Cell 135, 907-918

[8] Sinclair, D.A. 2005. "Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation" Mech. Ageing. Deve. 126, 987-1002

[9] Moreau, M., Neveu, M., Stephan, S., Noblesse, E., Nizard, C., Sadick, N.S., Schnebert, S., Bonté, F., Dumas, M., Andre, P., Perrier, E. 2007. "Enhancing cell longevity for cosmetic application: a complementary approach" J Drugs Dermatol. 6, s14-19.

[10] Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. 1996. 'The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that uses tetrazolium salts' Biochemica 4, 14-19

[11] Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. 2008. "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity" Nature Protocols 3, 1125-1131

[12] Cho, S., Shin, M.H., Kim, Y.K., Seo, J.-E., Lee, Y.M., Park, Ch.-H., Chung, J.H. 2009. "Effects of Infrared radiation and heat on human skin aging in vivo" J Invest. Dermatol. Symp. Proc. 14, 15-19

[13] Darvin, M.E., Haag, S., Meinke, M., Zastrow, L., Sterry, W. y Lademann, J. 2009. "Radical production by infrared A irradiation in human tissue" Skin Pharmacol Physiol 23, 40-46

[14] Collins, A. R. 2004. "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations". Mol Biotechnol. 26, 249-61

[15] Gómez-Lechón, M.J., O'Connor, J.E., Lahoz, A., Castell, J.V., Donato, M.T. 2008. "Identification of apoptotic drugs: multiparametric evaluation in cultured hepatocytes" Current Medicinal Chemistry 15, 2071-2085.

Agradecimientos

Queremos hacer constar el agradecimiento de los autores al personal científico y técnico de Advancell S.A. y de Celltec-UB por su buen hacer y profesionalidad en el desarrollo e implementación de la metodología celular de evaluación y seguridad de productos cosméticos.

