

UN EXTRACTO DE *EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM* RESPETUOSO CON LA MICROBIOTA REGULA LA CASPA Y LA PRODUCCIÓN DE SEBO MEDIANTE LA INMUNOMODULACIÓN DE LA RESPUESTA CUTÁNEA A LA INVASIÓN POR *MALASSEZIA* – PARTE I

El objetivo del presente estudio fue investigar el potencial anti-caspa y sebo-regulador de un extracto de *Epilobium angustifolium*.

ESTELLE LOING*, JOAN ATTIA-VIGNEAU**, MAGALI BOREL***

IFF/Lucas Meyer Cosmetics
estelle.loing@lucasmeyercosmetics.com

CASPA Y DERMATITIS SEBORREICA

La caspa es una alteración crónica del cuero cabelludo, caracterizada por la sobreproducción y acumulación de células cutáneas untosas que con el tiempo se desprenden en forma de grumos o de escamas. Los grumos están

formados por corneocitos paraqueratósicos hiperproliferantes que conservan un gran nivel de cohesión⁽¹⁾. Es importante remarcar que los cambios cutáneos aparecen más allá de las zonas de caspa visible, dado que las alteraciones de la función de barrera y la inflamación subclínica pueden detectarse en todo el cuero cabelludo⁽²⁾. No existe una separación clara entre la caspa y la dermatitis seborreica; en ésta, las escamas son más untosas y la inflamación adquiere mayor relevancia y se manifiesta bajo la forma

de un eritema de superficie⁽³⁾. La dermatitis seborreica puede extenderse a otras partes del cuerpo en las que exista una densidad elevada de glándulas sebáceas. Según un sondeo americano, la caspa es una alteración muy frecuente del cuero cabelludo, que aparece en el 60-90% del conjunto de la población, mientras que la dermatitis seborreica del cuero cabelludo aparece en el 3-5% de los adultos inmunocompetentes^(3, 4). Aunque no se considera un problema médico grave, sin lugar a dudas la caspa es un problema estético y una causa de turbación para quienes la sufren. La investigación actual subraya cuatro factores principales en la etiología de la caspa: la colonización por *Malassezia*, el exceso de actividad de los sebocitos, la afectación del estrato córneo y la vulnerabilidad individual a desarrollar una respuesta cutánea inflamatoria⁽⁵⁾ (Fig. 1).

PAPEL DESEMPEÑADO POR *MALASSEZIA*

La infección causada por *Malassezia* es un factor clave en la aparición de la caspa. Aunque las levaduras de *Malassezia* suelen ser organismos comensales que viven en la superficie cutánea sin causar problemas, en ciertas circunstancias su presencia y actividad pueden verse alteradas, lo que posiblemente contribuye a la aparición de diferentes enfermedades cutáneas (6,7). Por ejemplo, se ha detectado la existencia de correlación

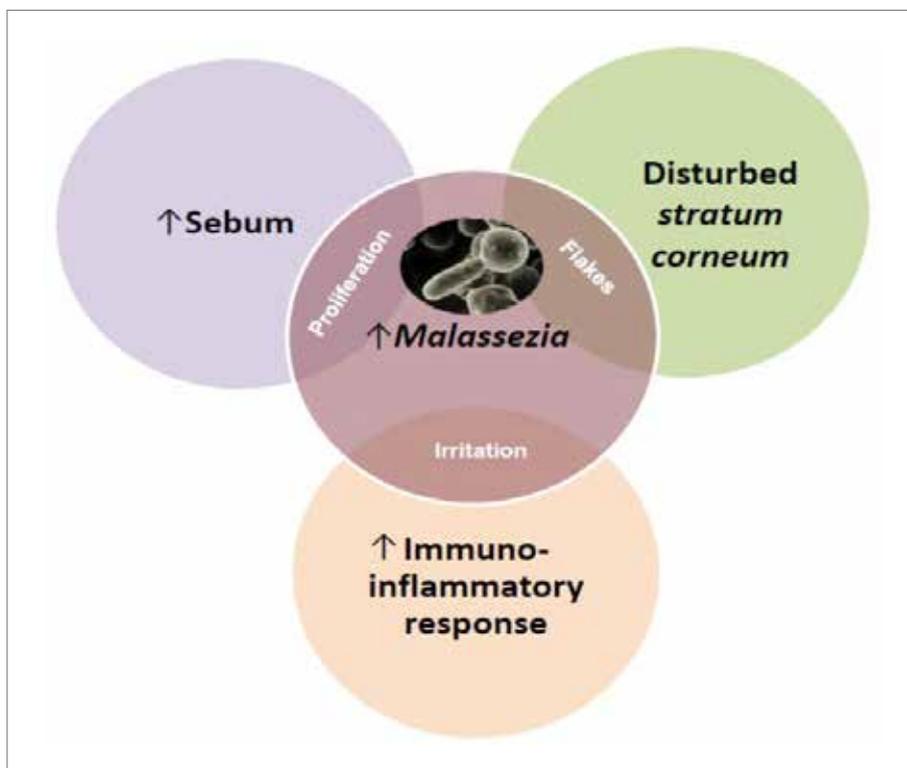


Figura 1. Modelo de desarrollo de la caspa / dermatitis seborreica.

entre la presencia de hongos del género *Malassezia* -en concreto, *M. furfur*, *M. globosa* y *M. restricta*- y la caspa y la dermatitis seborreica^(8, 9). Las tres especies son lipofílicas y existen buenos motivos para ello, dado que dependen de los lípidos de su huésped para sobrevivir. Compensan dicha carencia presentando una elevada actividad de las lipasas⁽⁹⁾.

PAPEL DESEMPEÑADO POR LA ACTIVIDAD DE LAS GLÁNDULAS SEBÁCEAS

Existe una fuerte correlación espacio-temporal entre la producción de sebo por parte de los sebocitos y la formación de caspa. La liberación de sebo está regulada mediante control hormonal. Sus niveles aumentan durante la adolescencia, con la aparición masiva de los andrógenos, se estabilizan durante las décadas de los 20 y de los 30 años, y se reducen de forma drástica durante la andropausia/menopausia. El desarrollo de la caspa sigue el mismo patrón; más concretamente, la secreción de sebo alcanza su valor máximo en el cuero cabelludo, donde también se encuentra la caspa. El sebo es una fuente de alimento para *Malassezia*. Está formado por triglicéridos y ésteres de cera que son digeridos por las lipasas de *Malassezia*, lo que da lugar a ácidos grasos libres. El ácido oleico es un metabolito relevante obtenido en este proceso, y se ha demostrado que su aumento provoca descamación del cuero cabelludo, alteraciones de la barrera, irritación e inflamación en personas vulnerables a ello^(5, 10). La razón de tales diferencias individuales en la vulnerabilidad a los metabolitos de la caspa todavía no ha sido determinada.

ALTERACIÓN DEL ESTRATO CÓRNEO

En las personas con caspa, se detecta un incremento notable en la velocidad de renovación epidérmica, lo que conduce

a la acumulación de células paraqueratóticas con núcleos picnóticos (cromatina condensada) en las capas superiores y en el estrato córneo de la epidermis⁽¹¹⁾. Con el tiempo, la creciente falta de sincronización entre la proliferación celular y la diferenciación, junto con la infiltración de sebo, afectan a las estructuras lipídicas corneocíticas y lamelares, lo que altera la capacidad de la piel para retener la humedad. Se apunta que tales alteraciones en el estrato córneo y en la función de barrera del cuero cabelludo pueden aumentar la vulnerabilidad a los metabolitos generados por *Malassezia*⁽²⁾.

RESPUESTA INFLAMATORIA

El ácido oleico generado a partir de la actividad de *Malassezia* puede acentuar la defensa inmunitaria innata de la piel estimulando la producción de beta-defensinas (hBD) por parte de los sebocitos y los queratinocitos^(12, 13). En este sentido, se ha descrito un incremento en la expresión de los miembros de la familia de las defensinas hBD2 y hBD3 —cuyos niveles de expresión suelen ser bajos—, mediado por la activación del receptor de tipo toll 2 (TLR2), en presencia de *Malassezia*⁽¹⁴⁾. El TLR2 reconoce ciertos componentes de los patógenos y reacciona favoreciendo un medio inflamatorio⁽¹⁵⁾. Por su parte, las defensinas ejercen una actividad antimicrobiana y antifúngica directa, a través de la inserción y la permeabilización de las membranas de los microorganismos⁽¹⁶⁾. Además, la hBD2 y la hBD3 afectan las subsiguientes respuestas inmunitarias adaptativas estimulando la síntesis de citocinas pro-inflamatorias por parte de los queratinocitos. La hBD2 y (en mayor medida) la hBD3 humanas también son quimiotáxicas para los macrófagos, las células T y las células dendríticas inmaduras^(17, 18). Por lo tanto, las defensinas son moléculas Yin y Yang, con efectos beneficiosos pero asimismo con la capacidad

de ser perjudiciales, en función de ciertas condiciones. Cabe resaltar que, a concentraciones elevadas, las defensinas pueden actuar como quimiocinas y exacerbar las reacciones inflamatorias⁽¹⁹⁾.

La relación, recientemente descubierta, entre las defensinas, la inflamación y la *Malassezia* abre nuevos caminos para el tratamiento de la caspa persistente y de la dermatitis seborreica mediante la inmunomodulación de las respuestas cutáneas. En el presente artículo hemos utilizado esta aproximación para demostrar que un extracto de *Epilobium angustifolium* (Defenscalp™ de Lucas Meyer Cosmetics) puede reducir de forma eficaz la producción de sebo y la aparición de caspa en personas que sufren dicha alteración del cuero cabelludo.

MATERIALES Y MÉTODOS EXTRACTO DE EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM

Conocida habitualmente como adelfa o laurel de San Antonio, la planta recibe este nombre porque suele ser la primera en florecer después de un incendio forestal. El laurel de San Antonio es autóctono de América del Norte, donde ha sido largamente utilizado como planta medicinal en alteraciones inflamatorias y problemas gastrointestinales. Tradicionalmente, los nativos americanos también utilizan el laurel de San Antonio para calmar irritaciones cutáneas y quemaduras. La planta contiene una gran cantidad de derivados polifenólicos. El extracto de flores/hojas/tallo del laurel de San Antonio (extracto de *E. angustifolium*) utilizado en este estudio es rico en Enoteína B (0,12-0,36%), un tanino con propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes⁽²⁰⁾. La Enoteína B también se ha relacionado con la inhibición de la actividad de la 5-alfa-reductasa, una enzima relacionada con la producción de sebo^(21, 22).

EFFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* EN LA ACTIVIDAD DE 5-ALFA-REDUCTASA EN FIBROBLASTOS

Se sembraron Fibroblastos Dérmicos Humanos Normales (NHDF, según sus siglas en inglés) en placas de 24 pocillos, a una densidad de 40000 células/pocillo, y se cultivaron en el medio de cultivo para fibroblastos FGM™ (*Fibroblast Growth Media*) durante 24 horas. Transcurrido este periodo se cambió el medio a *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS, según sus siglas en inglés), y se trataron las células con extracto de *E. angustifolium* (0,1%) o finasterida (10-5M), utilizada como control positivo, durante 24 horas. Posteriormente se renovó el medio de cultivo y se trataron las células con testosterona (2x10-6M), en presencia o en ausencia de extracto de *E. angustifolium* (0,1%) o finasterida (10-5M). Al cabo de 24 horas, se colectaron los sobrenadantes y se analizaron por duplicado mediante Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en electroespray (UPLC/HESI-II/MS, según sus siglas en inglés; UltiMate 3000, Thermo Scientific / TSQ Vantage, Thermo Scientific) para medir la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT), que corresponde a la actividad de 5-alfa-reductasa.

EFFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* EN LA SÍNTESIS LIPÍDICA POR PARTE DE LOS SEBOCITOS

Los sebocitos humanos primarios se obtuvieron de una voluntaria de 66 años de edad, con un índice de masa corporal (IMC) normal (23,4). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos negros con fondo transparente, en un medio de sebocitos. Las células

confluentes (4º pase) se trataron con distintas concentraciones (0,0125%, 0,05% y 0,1%) de extracto de *E. angustifolium*, durante 3 días. Se utilizó el inhibidor A922500 (2 µM) de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) como control de la inhibición de la producción lipídica en sebocitos. La acumulación intracelular de lípidos en las células se evaluó mediante tinción con rojo Nilo. La intensidad de fluorescencia relativa incorporada se analizó a ex/em 540 nm/620 nm (sin *cut-off*) para los lípidos totales, y a 485 nm/555 nm (*cut-off* 515) para los lípidos neutros. Los datos obtenidos se corrigieron para tener en cuenta la viabilidad celular, que fue determinada utilizando un reactivo azul indicador de viabilidad celular, con fluorescencia registrada a ex/em 560 nm/590 nm.

EFFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* EN LA EXPRESIÓN DE INVOLUCRINA EN QUERATINOCITOS

Se sembraron Queratinocitos Epidérmicos Humanos Normales (NHEK, según sus siglas en inglés) en placas de 96 pocillos. Se dejaron crecer las células durante 96 horas, en preparación para el experimento. Después de añadir extracto de *E. angustifolium* (0,025% y 0,05%) o cloruro cálcico (1,5mM), las células se incubaron durante los 6 días posteriores, y el tratamiento se repitió al 3er día. Al final del periodo de incubación, las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron. La inmunotinción de la involucrina se llevó a cabo utilizando un anticuerpo primario específico para la proteína, seguido de la detección mediante un anticuerpo secundario *Alexa Fluor*® 488 con emisión de fluorescencia verde. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con solución de Hoechst 33258 (bis-benzimidida). La adquisición de imágenes (5 fotos/pocillo) se realizó mediante un *INCell Analyser*™

1000 (GE Healthcare). El marcaje se cuantificó midiendo la intensidad de fluorescencia normalizada para el número total de células viables, utilizando un sistema *ArrayScan*™ junto con *HCS Studio*™ 2.0 *Cell Analysis Software* de ThermoFisher. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, a excepción de los controles (n=6).

EFFECTOS DEL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* EN ALTERACIONES, INDUCIDAS POR MALASSEZIA, DE LA MORFOLOGÍA CUTÁNEA Y LOS MARCADORES INMUNITARIOS EN EXPLANTES CUTÁNEOS

Se obtuvieron explantes de piel de espesor total de una mujer caucásica de 47 años. Se preparó una solución de crioprotector que contenía una mezcla 1:1:1 de *M. furfur*, *M. globosa* y *M. restricta*, hasta un total de 12,4 x106 CFU/mL. En D0, se aplicó (o no se aplicó) un disco de papel de filtro, previamente impregnado en 90 µL de la mezcla de levaduras, durante 24 horas, sobre la superficie de los explantes de piel, con una concentración final de 1,1 x106 CFU/cm². En D1, D2, y D4, los explantes se trataron (o no se trataron) con una solución de extracto de *E. angustifolium* al 1,5% (2µl/cm²). En D5, se colectaron los explantes y se cortaron en 2 partes: una de las partes se fijó en formalina tamponada, se deshidrató y se incluyó en parafina, mientras que la otra parte se congeló a -80°C. Se llevó a cabo la observación de la morfología general de la piel mediante microscopía óptica, después de la tinción de las secciones parafinadas, aplicando la tinción tricrómica de Masson-Goldner. La inmunotinción de hBD2 y hBD3, así como de TLR2, se realizó en los cortes por congelación utilizando anticuerpos específicos para cada proteína, cuya presencia fue revelada a continuación con anticuerpos

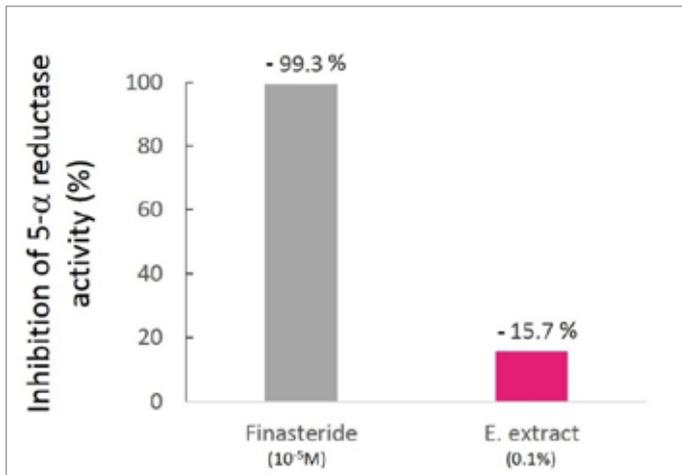


Figura 2. El extracto de *E. angustifolium* inhibe la actividad de la 5-alfa-reductasa en fibroblastos.

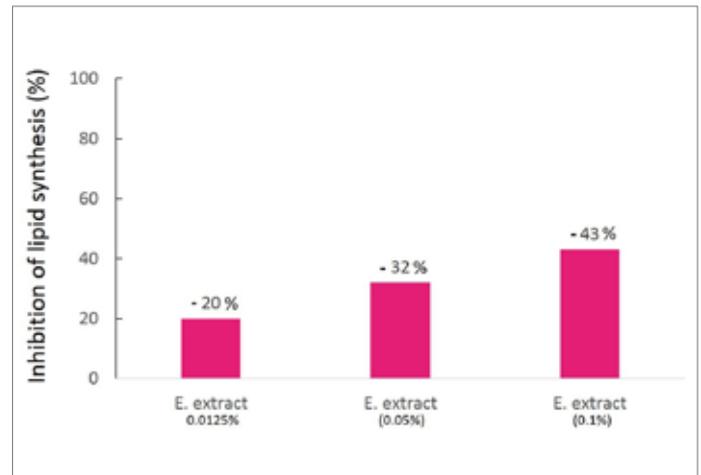


Figura 3. El extracto de *E. angustifolium* inhibe la síntesis lipídica en sebocitos.

secundarios conjugados FITC que emitían fluorescencia verde. Los núcleos celulares se tiñeron con yoduro de propidio, y los resultados de la inmunotinción fueron examinados mediante un microscopio óptico BX43 (Olympus, Japón). Las imágenes se adquirieron con una cámara numérica *Olympus DP72* y se procesaron con el software *Olympus Cell-D* (Olympus, Japón).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
EL EXTRACTO DE E. ANGUSTIFOLIUM INHIBE LA ACTIVIDAD DE 5-ALFA-REDUCTASA EN FIBROBLASTOS

El extracto investigado es rico en Enotéina B, un tanino cuya actividad inhibitoria frente a la 5-alfa-reductasa ha sido descrita previamente^(21, 22). La enzima convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), a la que reaccionan los sebocitos aumentando la producción de sebo. Dada la importante contribución del sebo a la formación de caspa, nos interesó documentar cualquier efecto potencial del extracto de *E. angustifolium* en la actividad de la 5-alfa-reductasa.

Como puede observarse en la Fig. 2, cuando los fibroblastos fueron tratados

previamente con extracto de *E. angustifolium* (0,1%) durante 24 h, la adición de testosterona (2x10⁻⁶M) conllevó una inhibición del -15,7% de la actividad de 5-alfa-reductasa, medida a partir de la conversión de testosterona a DHT. La finasterida (10⁻⁵M) usada como control positivo mostró una inhibición de la actividad enzimática del -99,3%, lo que validó el ensayo. Este resultado sugiere que el extracto de *E. angustifolium* tiene potencial para reducir la producción de sebo por medio de la inhibición de la actividad de la 5-alfa-reductasa.

EL EXTRACTO DE E. ANGUSTIFOLIUM INHIBE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN LOS SEBOCITOS

El siguiente paso lógico era confirmar que el extracto de *E. angustifolium* fuera realmente capaz de reducir la producción de sebo en sebocitos. Éstos son células epiteliales especializadas, situadas en las glándulas sebáceas y unidas a un folículo piloso. Los sebocitos producen y acumulan varios tipos de lípidos, lo que globalmente se conoce como sebo. Los sebocitos maduros liberan los lípidos de su interior a través de la ruptura de la membrana celular y

de un proceso de degradación celular. El sebo ejerce muchas funciones beneficiosas, pero si se excreta en exceso o si su composición lipídica se ve alterada, puede convertirse en una de las principales causas del desarrollo de caspa y de dermatitis seborreica en el cuero cabelludo, provocando la aparición de zonas enrojecidas y descamadas y una caspa pegajosa y persistente.

Se investigó el efecto del extracto de *E. angustifolium* en la síntesis de lípidos utilizando un modelo de cultivo de sebocitos humanos normales, desarrollado a partir de un explante de piel, y tinción con rojo Nilo. Los resultados se muestran en la Fig. 3, en forma de porcentaje de unidades relativas de fluorescencia (URF) en comparación con la DGAT (a la que se asignó el valor de 100%), un inhibidor conocido de la síntesis lipídica. Como puede observarse, el extracto de *E. angustifolium* inhibió la producción de sebo de forma dependiente de la dosis. Se obtuvo una reducción sustancial, del -43%, al aplicar al cultivo celular una concentración de extracto de *E. angustifolium* del 0,1%. Por consiguiente, el extracto de *E. angustifolium* puede actuar directamente sobre los sebocitos para reducir la producción de sebo.

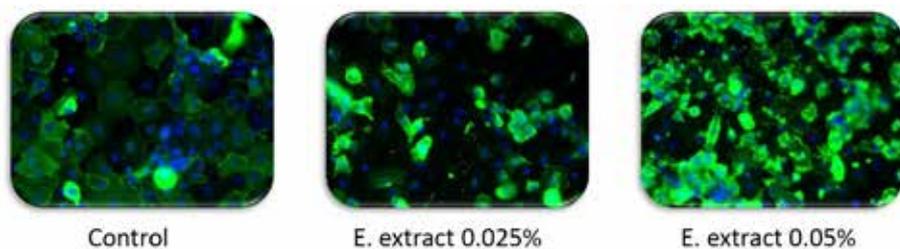


Figura 4. El extracto de *E. angustifolium* estimula la expresión de involucrina en los queratinocitos.

EL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* ESTIMULA LA EXPRESIÓN DE INVOLUCRINA EN LOS QUERATINOCITOS

La hiperproliferación de los queratinocitos es un signo distintivo de la caspa. La reducción del tiempo de tránsito de las células en el interior de la epidermis se relaciona con una queratinización anómala y una debilitación de la función de barrera⁽¹¹⁾. Por lo tanto, mejorar la diferenciación de los queratinocitos en corneocitos completamente maduros puede resultar una buena estrategia para reestablecer la homeóstasis cutánea en caso de caspa. Considerando dicha opción, hemos estado analizando el efecto del extracto de *E. angustifolium* en la expresión de involucrina en los queratinocitos. La involucrina es un precursor esencial en la formación de la envoltura insoluble que rodea a los queratinocitos terminales en el estrato córneo. Aporta un andamiaje con el que se entrecruzan otras proteínas gracias a la acción de las transglutaminasas, lo que forma la envoltura queratinizada responsable de la mayor parte de la fuerza y de la integridad estructural de la piel. La involucrina es un marcador precoz de diferenciación celular, y el aumento de su expresión se ha relacionado con una recuperación acelerada después de la alteración de la barrera cutánea^(23, 24).

Según los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia (Fig. 4), el tratamiento de los queratinocitos con extracto

de *E. angustifolium* durante 6 días provocó un aumento dependiente de la dosis en la expresión de la involucrina. Dicho resultado indica que el extracto de *E. angustifolium* tiene el potencial de reforzar la estructura del estrato córneo, alterada en la caspa, apoyando una diferenciación epidérmica y una homeóstasis de barrera adecuadas.

EL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* PROTEGE LOS IMPLANTES CUTÁNEOS DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR LEVADURAS

En consonancia con el resultado previo, documentamos de qué forma el extracto de *E. angustifolium* podía ejercer influencia en los cambios morfológicos inducidos por la presencia de *Malassezia*. Al exponer los explantes cutáneos a una mezcla de *M. furfur*, *M. globosa* y *M. restricta* durante 24 horas, se detectaron alteraciones morfológicas 5 días después de la exposición, mediante la utilización de técnicas histológicas. Como puede observarse en la Fig. 5, apareció una notable cantidad de células con núcleos picnóticos en el estrato suprabasal de la epidermis después de la exposición a *Malassezia* (comparación de los cuadros central e izquierdo). La picnosis es consecuencia de la condensación irreversible de la cromatina en el núcleo, y suele indicar que la célula afectada está experimentando un proceso de necrosis o de apoptosis. También se ha observado

en la proliferación epidérmica, como consecuencia de una diferenciación incompleta. La aplicación del extracto de *E. angustifolium* (1,5%) sobre explantes cutáneos irritados mediante levaduras permitió reducir la cantidad de células cutáneas que experimentaron picnosis (cuadro derecho). La aplicación del extracto de *E. angustifolium* en explantes cutáneos no irritados mediante levaduras no presentó ningún efecto *per se* (no se muestran los datos). Tales resultados indican que el extracto de *E. angustifolium* puede contribuir a proteger la integridad de las células cutáneas y ayudar a mantener la morfología normal de la piel en presencia de levaduras, probablemente a través de la normalización del proceso de diferenciación de los queratinocitos.

EL EXTRACTO DE *E. ANGUSTIFOLIUM* REDUCE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EXPLANTES CUTÁNEOS EXPUESTOS A LEVADURAS

En artículos publicados recientemente se ha descrito la relación entre la infección con *Malassezia* y la inducción de la expresión de beta-defensinas (hBD2 y hBD3) en la piel humana, mediante la señalización de TLR2 (13,14). Los péptidos humanos hBD2 y hBD3 se expresan a niveles bajos en condiciones fisiológicas normales, pero pueden ser inducidos en caso de alteraciones microbianas o fúngicas. Las defensinas desempeñan un papel dual: presentan directamente actividad antimicrobiana y antifúngica, al tiempo que desencadenan respuestas inmunitarias adaptativas a través de la movilización de macrófagos, células T y células dendríticas *naïve* (no han entrado en contacto con el antígeno). La alteración en la regulación de la expresión de las defensinas se ha asociado con procesos inflamatorios de

largo recorrido en patologías cutáneas como psoriasis, acné y dermatitis seborreica^(13, 25, 26).

En el presente estudio, al dejar en contacto los explantes cutáneos durante 24 horas con una mezcla de *M. furfur*, *M. globosa* y *M. restricta*, dichos explantes reaccionaron aumentando su expresión de hBD2, hBD3 y TLR2 en la epidermis, tal y como se detectó 5 días después de la infección. Por ejemplo, en la Fig. 6, la expresión de TLR2 era baja en explantes cutáneos no tratados (cuadro A). Se detectó una inducción moderada de la expresión del receptor en las capas superficiales de la epidermis con posterioridad a la infección con *Malassezia* (cuadro B versus A), un efecto que pudo ser revertido en parte mediante el tratamiento con extracto de *E. angustifolium* (1,5%), (cuadro B versus C). Al aplicar únicamente extracto de *E. angustifolium* (1,5%) a la piel no alterada, la expresión de TLR2 sólo aumentó de forma marginal (no se muestran los datos). Este resultado concuerda con otros estudios en los que se detectó un aumento de la expresión y de la activación del TLR2 en presencia de *Malassezia*, lo que conllevó la producción de citocinas inflamatorias por parte de los queratinocitos⁽¹⁴⁾. Lo que debía ser una reacción protectora pareció ser una exacerbación en determinadas afecciones cutáneas relacionadas con procesos inflamatorios crónicos, como la dermatitis seborreica. En la misma línea, un ensayo clínico reciente en el que participaron 115 pacientes con dermatitis seborreica mostró que inhibir la inducción de TLR2 podía prevenir las recaídas subsiguientes al tratamiento con esteroides⁽²⁷⁾. De este modo, controlar la expresión de TLR2 en presencia de *Malassezia*, como se lleva a cabo en el presente estudio mediante un extracto de *E. angustifolium*, puede ayudar a prevenir el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos.

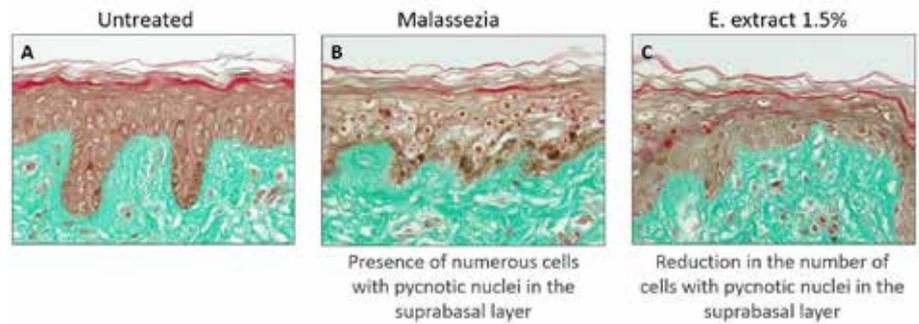


Figura 5. El extracto de *E. angustifolium* protege los explantes de piel de los cambios morfológicos inducidos por *Malassezia*.

De forma similar, como puede verse en la Fig. 6, la hBD2 sólo pudo detectarse débilmente en explantes cutáneos no tratados (cuadro D), mientras que su expresión aumentó de forma notable en el estrato córneo (SC) de la piel infectada con levaduras (comparación de los cuadros E y D). La aplicación de extracto de *E. angustifolium* (1,5%) en piel irritada por *Malassezia* permitió inhibir de forma considerable la sobreexpresión de hBD2 inducida por levaduras (comparación de los cuadros F y E). El extracto de *E. angustifolium*, por sí solo, no mostró ningún efecto en piel no irritada (no se muestran los datos).

También en la Fig. 6, la presencia de hBD3 pudo detectarse con facilidad en explantes de piel no tratados (cuadro G). La exposición a *Malassezia* conllevó un perceptible aumento en la expresión de hBD3 en el interior de los estratos epidérmicos superficiales de la piel infectada (cuadro H versus G). El tratamiento con extracto de *E. angustifolium* (1,5%) redujo de forma significativa el efecto de las levaduras en la expresión de hBD3 (comparación de los cuadros I y H). Al aplicar únicamente extracto de *E. angustifolium* a piel no irritada, solo se obtuvo un aumento marginal en la expresión de hBD3 (no se muestran

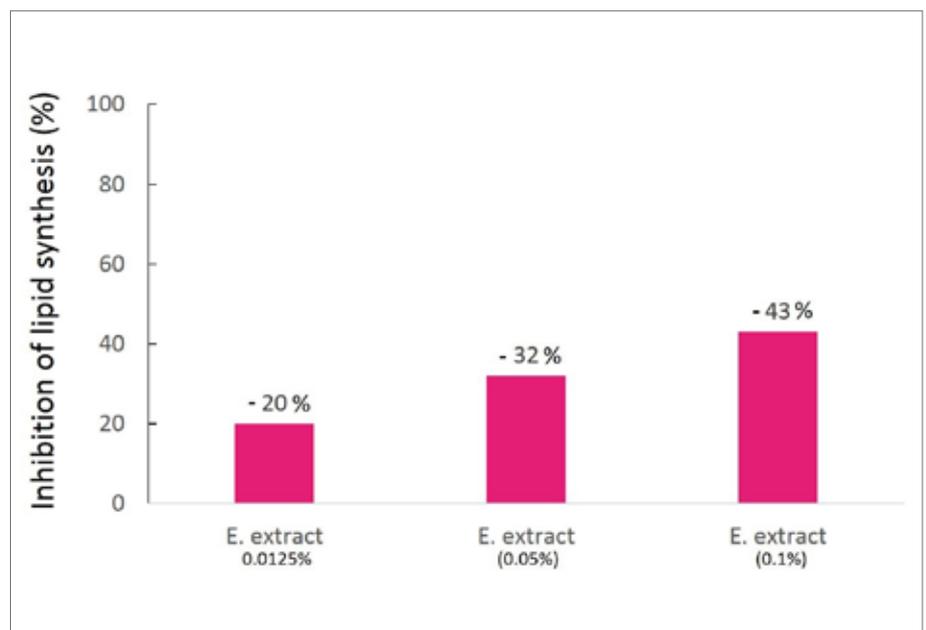


Figura 6. El extracto de *E. angustifolium* modula la expresión de TLR2, hBD2 y hBD3 en explantes cutáneos.

los datos). Como se ha mencionado en la introducción, la hBD2 y la hBD3 son moléculas Yin y Yang, que aportan beneficios a concentraciones bajas pero pueden convertirse en perjudiciales a concentraciones más elevadas⁽¹⁹⁾. En apariencia, el tratamiento con extracto de *E. angustifolium* sólo saca a relucir el lado bueno de las defensinas, permitiendo así unos niveles de expresión bajos al tiempo que se evita una expresión elevada e incontrolada en piel irri-tada por levaduras.

CONCLUSIÓN

El estudio presentado identifica Defenscalp™ (extracto de *E. angustifolium*) como un eficaz ingrediente activo cosmético, con propiedades anti-caspa y anti-sebo. El extracto actúa a todos los niveles del modelo de caspa/dermatitis seborreica descrito en la introducción (Fig. 1), lo que permite reequilibrar la microbiota del cuero cabelludo, limitar la producción de sebo, reforzar el estrato córneo y modular la inflamación

cutánea. Consideramos que uno de los mecanismos moleculares importantes subyacentes a la eficacia del extracto de *E. angustifolium* implica la normalización de la expresión de las defensinas (hBD2 y hBD3) y de la expresión de TLR2, limitando así la respuesta inflamatoria cutánea a la infección por *Malassezia*. De acuerdo con nuestra información al respecto, se trata de la primera vez que un activo anti-caspa se asocia con la inmunomodulación de la respuesta cutánea a la invasión por *Malassezia* ■

REFERENCIAS

- Piérard-Franchimont C, Xhauflaire-Uhoda E, Piérard GE. Revisiting dandruff. *Int J Cosmet Sci.* 2006 Oct;28(5):311-8.
- Schwartz JR, Messenger AG, Tosti A, Todd G, Hordinsky M, Hay RJ, Wang X, Zachariae C, Kerr KM, Henry JP, Rust RC, Robinson MK. A comprehensive pathophysiology of dandruff and seborrheic dermatitis - towards a more precise definition of scalp health. *Acta Derm Venereol.* 2013 Mar 27;93(2):131-7.
- Schwartz JR, Cardin CM, Dawson TJ. Dandruff and seborrheic dermatitis. In: *Textbook of Cosmetic Dermatology* (Baran R, Maibach H, eds). London: Informa Health Care, 2005; 259-72.
- Hay RJ. Malassezia, dandruff and seborrheic dermatitis: an overview. *Br J Dermatol.* 2011 Oct;165 Suppl 2:2-8.
- DeAngelis YM, Gemmer CM, Kaczvinsky JR, Kenneally DC, Schwartz JR, Dawson TL Jr. Three etiologic facets of dandruff and seborrheic dermatitis: Malassezia fungi, sebaceous lipids, and individual sensitivity. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2005 Dec;10(3):295-7.
- Gaitanis G, Velegraki A, Mayser P, Bassukas ID. Skin diseases associated with Malassezia yeasts: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2013 Jul-Aug;31(4):455-63.
- Del Rosso JQ, Kim GK. Seborrheic Dermatitis and Malassezia species: How Are They Related? *J Clin Aesthet Dermatol.* 2009 Nov;2(11):14-7.
- Zareei M, Mohammadi A, Borujeni ZB, Seyed Jamal Hashemi SJ. Frequency of Different *Malassezia* Species in Scalp Dandruff. *Infect Epidemiol Med.* 2016 spring 2(2):22-25.
- Dawson TL Jr. Malassezia globosa and restricta: breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2007 Dec;12(2):15-9.
- Ro BI, Dawson TL. The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2005 Dec;10(3):194-7.
- Turner GA, Hoptroff M, Harding CR. Stratum corneum dysfunction in dandruff. *Int J Cosmet Sci.* 2012 Aug;34(4):298-306.
- Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, Zouboulis CC, Gallo RL, Huang CM. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression. *J Invest Dermatol.* 2010 Apr;130(4):985-94.
- Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Orlando M, Tufano MA, Baroni A. Malassezia furfur induces the expression of beta-defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. *Arch Dermatol Res.* 2004 Apr;295(11):474-81.
- Baroni A, Orlando M, Donnarumma G, Farro P, Iovene MR, Tufano MA, Buommino E. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signalling in human keratinocytes in response to Malassezia furfur. *Arch Dermatol Res.* 2006 Jan;297(7):280-8.
- Terhorst D, Kalali BN, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol.* 2010;11(1):1-10.
- Morgera F, Antcheva N, Pacor S, Quaroni L, Berti F, Vaccari L, Tossi A. Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. *J Pept Sci.* 2008 Apr;14(4):518-23.
- Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep;1758(9):1499-512.
- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 2010 Apr;135(1):1-11.
- Weinberg A, Jin G, Sieg S, McCormick TS. The yin and yang of human Beta-defensins in health and disease. *Front Immunol.* 2012 Oct 8;3:294.
- Kiss AK, Bazylko A, Filipek A, Granica S, Jaszewska E, Kiarszys U, Kośmider A, Piwowarski J. Oenothien B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of Epilobium sp. *Phytomedicine.* 2011 May 15;18(7):557-60.
- Ducrey B, Marston A, Göhring S, Hartmann RW, Hostettmann K. Inhibition of 5 alpha-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothien A and oenothien B from Epilobium species. *Planta Med.* 1997; 63(2):111-4.
- Lesuisse D, Berjonneau J, Ciot C, Devaux P, Doucet B, Gourvest JF, Khemis B, Lang C, Legrand R, Lowinski M, Maquin P, Parent A, Schoot B, Teutsch G. Determination of oenothien B as the active 5-alpha-reductase-inhibiting principle of the folk medicine Epilobium parviflorum. *J Nat Prod.* 1996 May;59(5):490 2.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Apr;6(4):328-40.
- Presland RB, Coulombe PA, Eckert RL, Mao-Qiang M, Feingold KR, Elias PM. Barrier function in transgenic mice overexpressing K16, involucrin, and filaggrin in the suprabasal epidermis. *J Invest Dermatol.* 2004 Sep;123(3):603-6.
- Yamasaki K, Gallo RL. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol.* 2008 Jan-Feb;18(1):11-21.
- Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol.* 2012 Mar;132(3 Pt 2):887-95.
- Ionescu MA, Baroni A, Brambilla L, Cannavò SP, Cristaudo A, Vedove CD, Frasca M, Girolomoni G, Gnecci L, Peris K, Trifirò C, Matta AM, Robert G. Double blind clinical trial in a series of 115 patients with seborrheic dermatitis: prevention of relapses using a topical modulator of Toll like receptor 2. *G Ital Dermatol Venereol.* 2011 Jun;146(3):185-9.