

No es sólo cuestión de reinvidicación

Aunque los métodos *in vitro* no pueden replicar por completo las complejidades del organismo que se observan en las pruebas *in vivo*, han demostrado ser una herramienta esencial en la evaluación de los efectos de productos sobre la piel. Estas pruebas, que preceden a las pruebas en humanos, ofrecen valiosos indicios sobre cómo podrían comportarse los agentes en contacto con el tejido. Con el auge de diversos métodos de medición *in vitro*, se espera que su importancia continúe creciendo en el futuro.

Por Ana Carolina Kelmer, Georg Wiora, Christiane Uhl y Diana Khazaka, MICROCAYA

La importancia de las pruebas *in vitro* para analizar la piel y sus funciones no ha dejado de aumentar en los últimos años. Los modelos de piel cultivada y los tejidos similares a la piel que imitan las características y funciones de la piel humana están fácilmente disponibles y proporcionan una base controlada para numerosos análisis, permitiendo a los investigadores manipular las variables con mayor precisión. Al no subyacer interacciones complejas entre un organismo vivo y el medioambiente, también ofrecen la ventaja de que los ensayos arrojen resultados bastante reproducibles. Esto permite estudiar factores específicos como las influencias ambientales o la genética en la piel. Especialmente para la investigación cosmética y dermatológica, las pruebas *in vitro* ofrecen muchas ventajas.

Las mediciones *in vitro* no sólo proporcionan información precisa sobre la absorción dérmica de sustancias, crucial para evaluar la



Los ensayos *in vitro* de productos cosméticos cobran cada vez más importancia.

seguridad de cosméticos, fármacos y otros productos, también desempeñan un papel importante los aspectos económicos y de tiempo: los ensayos *in vitro* ofrecen una alternativa rentable y que ahorra tiempo a los costosos estudios *in vivo*. Los estudios con seres humanos son caros; hay que reclutar a los sujetos y a menudo tienen que estar disponibles para varias citas. La versatilidad de las pruebas *in vitro*

también permite a los científicos explorar las variaciones en el grosor de la piel y cómo afectan a la penetración y eficacia de los ingredientes para el cuidado de la piel. Esta información es vital para adaptar los productos a los distintos tipos y condiciones de la piel.

Otro factor determinante es el aspecto ético. El uso de animales para ensayar sustancias químicas es cada vez más criticado, y los ensayos *in vitro* ofrecen una alternativa éticamente aceptable para generar datos significativos. También se cuestiona la eficacia de los ensayos con animales, ya que las estructuras y procesos biológicos de animales y humanos no siempre pueden compararse entre sí. En la Unión Europea está prohibida la experimentación con animales de cosméticos o sustancias químicas fabricadas exclusivamente para su uso en productos cosméticos. Según el Reglamento Europeo sobre Cosméticos (Reglamento (CE) n° 1223/2009), los cosméticos

cuyos ingredientes hayan sido probados en animales después de esta fecha ya no pueden venderse oficialmente en la UE desde marzo de 2013. Muchos otros países han promulgado normativas similares. La creciente concienciación sobre el bienestar animal y la prohibición de los ensayos con animales han consolidado aún más la aceptación y la integración de los métodos *in vitro*.

Por último, pero no por ello menos importante, la experiencia de la pandemia de Covid-19 ha dejado claro que las mediciones en seres humanos no sólo pueden ser antihigiénicas, sino que también plantean problemas logísticos. Debido al riesgo de infección de los sujetos y el personal, y también a la escasez de personal, en muchos laboratorios hubo que suspender las mediciones en humanos durante periodos de tiempo considerables. Las mediciones *in vitro* han cobrado cada vez más importancia, ya que representan una alternativa segura y fiable para obtener datos significativos sin poner en peligro la salud y la seguridad del personal y de los sujetos de ensayo.

La realización de experimentos en cultivos de piel facilita el cribado de múltiples muestras, lo que permite realizar pruebas de múltiples sustancias o condiciones simultáneamente. La incorporación de enfoques *in vitro* como métodos reconocidos para evaluar la tolerancia cutánea y otros parámetros en numerosas directrices y normativas también pone de relieve la creciente relevancia de estos métodos de ensayo. Organizaciones como el CEVMA (Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos), la OCDE

(Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos) y la COLIPA (Asociación Europea de la Industria de Perfumería, Higiene y Cosmética) han validado muchas de estas pruebas.

Las mediciones *in vitro* habituales en cultivos de piel incluyen:

- Estudios de permeación: Investigación de la penetración de sustancias a través de las capas de la piel.
- Evaluación de la inflamación y las respuestas inmunitarias: Estudio de la respuesta de la piel a estímulos inflamatorios o desafíos inmunitarios.
- Análisis de la expresión génica: Análisis de las respuestas genéticas de las células de la piel a diversos factores.
- Pruebas de viabilidad y proliferación celular: Determinación de la salud y el crecimiento de las células de la piel dentro del cultivo.
- Pruebas de citotoxicidad: Evaluación de la toxicidad potencial de las sustancias en las células de la piel.



Las afirmaciones de los productos, como que reparan o restauran la barrera, deben demostrarse objetivamente.

En muchos de estos campos de aplicación, la evaluación de la calidad de barrera de la piel, la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) desempeña un papel fundamental. Cuando se daña la piel, se interrumpe la estrecha cohesión de las células cutáneas. Esto facilita la entrada de irritantes externos y provoca un aumento de la evaporación de la piel. Entre los principios “activos” más comunes para hacer frente a estos factores de estrés se encuentran las ceramidas, el ácido hialurónico, la niacinamida y otros. Los procedimientos para medir la TEWL en la piel humana *in vivo* con el fin de evaluar la calidad de la barrera se han descrito en numerosas directrices desde 1990. La medición de la TEWL en humanos se ha realizado ampliamente en pruebas de productos para probar las afirmaciones de productos como restaurador de la barrera, reforzador de la barrera, reparador y muchos más.

Dado que dañar la barrera cutánea aplicando sustancias de ensayo en seres humanos *in vivo* vuelve a plantear problemas éticos y es, además, bastante costoso, la demanda de métodos sustitutos de estas pruebas es elevada. Se han desarrollado pruebas *ex-vivo* e *in-vitro*, muchas de las cuales siguen a la espera de aprobación oficial como método reconocido de sustitución de las pruebas *in vivo* en animales o humanos.

Para observar cómo se ve afectada y mejora la TEWL, se aplican ingredientes y productos a modelos de piel. Los resultados pueden utilizarse para comprender si una sustancia está causando daños y comprometiendo la línea natural

de defensa, o para demostrar que, de hecho, favorece la recuperación de la barrera cutánea. En otras palabras, la medición de la TEWL ofrece información sobre la “suavidad”/ potencial dañino de ingredientes y fórmulas.

Desde hace muchos años, las células de difusión Franz se utilizan para realizar ensayos *in vitro* de la difusión de sustancias químicas en la piel humana o animal extirpada y a través de ella. La directriz 428 de la OCDE describe detalladamente este ensayo. Los resultados de este tipo de pruebas son especialmente útiles para examinar la liberación de sustancias químicas a partir de diferentes formulaciones y para evaluar la absorción percutánea. La muestra de piel separa las dos cámaras de la célula de difusión, la cámara donante superior y la cámara receptora inferior. La cámara receptora está llena de fluido que suele calentarse a una temperatura aproximada de 32 °C, similar a la temperatura de la piel. El producto químico investigado se aplica sobre la piel durante un tiempo determinado en condiciones específicas, antes de ser eliminado mediante un método de limpieza definido. A lo largo del experimento, se toman muestras del fluido de la cámara receptora en distintos momentos y se analizan en busca del producto de ensayo o los metabolitos. Para obtener resultados fiables, es esencial que la piel que se utilice para esta prueba no esté dañada y presente una integridad total. La medición del TEWL con sondas especialmente adaptadas sirve para evaluar la integridad cutánea de la muestra y también puede utilizarse para medir las influencias nocivas



El **Tewameter Invitro**® emula la cámara donante de una célula de difusión Franz, encajando perfectamente, y puede determinar con exactitud la integridad de la piel antes y durante el experimento.

del producto químico sobre la piel. La sonda Invitro Tewameter® ha sido especialmente desarrollada y está perfectamente adaptada para la medición de células de Franz, emulando por completo la cámara donante. De este modo, puede colocarse directamente sobre la muestra de piel, de modo que la pérdida de agua calculada de la muestra de piel corresponde a la pérdida de agua transepidérmica medida normalmente en la superficie de la piel *in vivo* en g/h/m². La cámara abierta de la sonda ofrece la posibilidad de aplicar la sustancia sobre la muestra de piel a través del cilindro de medición y, al mismo tiempo, puede medir la pérdida de agua a través de la piel. Para

los ensayos que requieren mayores cantidades de la sustancia química aplicada sobre la superficie de la piel, también es posible añadir una pieza central que se ajusta exactamente a la sonda y a la cámara receptora de la célula Franz sin necesidad de más adaptadores de fijación.

En el dinámico campo de las pruebas cutáneas, el uso de cultivos celulares para reproducir la piel humana se ha revelado como un método transformador para el avance de los cosméticos y la promoción de la salud de la piel. Los cultivos celulares, especialmente los derivados de la capa más externa de la epidermis de la piel, el estrato córneo, proporcionan un entorno controlado para estudiar

los efectos de los cosméticos y los productos para el cuidado de la piel. Estos modelos *in vitro* permiten a los investigadores observar cómo interactúan las distintas formulaciones con las células de la piel humana, evaluando factores como la toxicidad, la irritación y la eficacia.

Los cultivos de células humanas y los modelos de tejido cutáneo se utilizan con frecuencia en microplacas, también denominadas placas de pocillos múltiples.

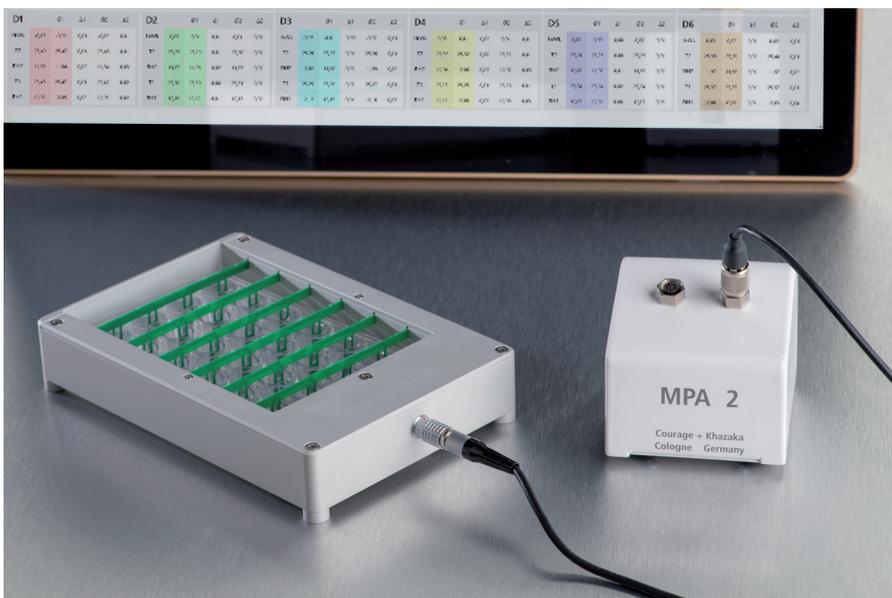
Las placas rectangulares de pocillos múltiples contienen una serie de cavidades, denominadas “pocillos”, que están aisladas unas de otras en filas y columnas. Las dimensiones de las placas de pocillos están claramente definidas con una longitud de 127,76 mm × 85,48 mm de anchura para satisfacer las necesidades de las estaciones de trabajo automatizadas. Su altura también suele estar estandarizada, pero puede variar en cierta medida.

Basándose en estas dimensiones definidas, existe una amplia gama para el número de pocillos que pueden utilizarse en la placa de pocillos. Pueden tener formatos de 6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536 pocillos. Las placas de pocillos con menos pocillos son preferibles en experimentos que requieren una mayor superficie de cultivo o condiciones más complejas. Los pocillos están disponibles en diferentes formas: Fondo en F (fondo plano), fondo en C (fondo plano con esquinas mínimamente redondeadas), fondo en V (fondo cónico) y fondo en U (rebaje en forma de U).

Las mediciones en cultivos celulares en placas de pocillos múltiples incluyen la pigmentación de la piel, que influye en diversos aspectos de la fisiología cutánea y la respuesta a agentes externos. Las pruebas en cultivos celulares que imitan diversos niveles de pigmentación se utilizan,

por ejemplo, en estudios para comprender cómo interactúan los productos con los melanocitos (células productoras de pigmento) y su impacto en la protección frente a los rayos UV y en la regulación de la producción y distribución de melanina, lo que es relevante para el desarrollo de la protección solar y frente a los rayos UV, así como para demostrar el efecto de productos dirigidos a trastornos de la pigmentación, como la hiperpigmentación. Además, la pigmentación es un factor que se observa en las pruebas de sensibilidad e irritación y también es importante para la eficacia de los productos para distintos tonos de piel.

La medición de la TEWL en cultivos celulares en pocillos es otro parámetro importante para evaluar el impacto de los productos para el cuidado de la piel en la hidratación y la integridad de la piel, también para alegaciones de productos como la mejora o el refuerzo de la barrera cutánea. Las sondas monocanal que miden cada pocillo por separado uno tras otro no podrán ofrecer resultados significativos, ya que los cultivos celulares de los distintos pocillos cambiarán rápidamente tras su extracción de la incubadora. Los sistemas multicanal como el Tewitro® TW 24 ofrecen la ventaja de medir todos los pocillos simultáneamente. Es compatible con placas multipocillo estándar de 24 pocillos. Estas placas de pocillos ofrecen 6 filas con 4 pocillos de medición cada una. La sonda se coloca en la parte superior de forma que cada una de sus 24 puntas de medición sobresalga en un pocillo. La punta de medición



Con el Tewitro TW 24 se puede evaluar simultáneamente la TEWL de cultivos celulares y modelos de piel en placas de 24 pocillos.

‘LAS MEDICIONES *IN VITRO* NO SÓLO PROPORCIONAN INFORMACIÓN PRECISA SOBRE LA ABSORCIÓN DÉRMICA DE SUSTANCIAS, CRUCIAL PARA EVALUAR LA SEGURIDAD DE COSMÉTICOS, FÁRMACOS Y OTROS PRODUCTOS. TAMBIÉN DESEMPEÑAN UN PAPEL IMPORTANTE LOS ASPECTOS ECONÓMICOS Y DE TIEMPO’

está equipada con dos pares de sensores que miden continuamente la temperatura y la humedad relativa, captando indirectamente el gradiente de concentración de vapor de agua desde el fondo del pocillo a través del modelo de piel hasta la superficie.

Para evitar que los sensores toquen el tejido celular, la altura de la sonda colocada sobre la placa de pocillos múltiples puede ajustarse fijando diferentes pies de regulación de altura.

La medición de la TEWL se realiza antes de la aplicación de los productos y, a continuación, de nuevo después de que los productos se hayan aplicado y absorbido durante una fase de incubación y se hayan eliminado sus residuos enjuagando los pocillos.

Siguiendo un protocolo detallado y utilizando una placa térmica de laboratorio, los efectos del producto sobre la integridad de los cultivos celulares pueden demostrarse fácilmente *in vitro* y distinguirse del estrés experimental que se produce en las pruebas *in vivo*.

LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ULTRASENSIBLE SUSTITUIRÁ A LA PRUEBA OCULAR DE DRAIZE Y OTROS

Las barreras epiteliales forman las superficies externas de la piel y de la mayoría de los órganos. Para estudiar la seguridad química de las sustancias, se desarrolló el infame test de Draize:

La córnea, como capa más externa del ojo, actúa como barrera protectora y ventana de recepción de la luz. Por lo tanto, es natural que la elección para predecir el potencial de peligro químico para la piel y los ojos humanos (citotoxicidad) y clasificarlo en daño tisular reversible e irreversible se haya hecho durante mucho tiempo irritando los ojos de conejos albinos, la llamada prueba de Draize.

Las sustancias químicas que no son nocivas para el ojo no requieren etiquetado, mientras que las que provocan una regeneración tisular reversible o irreversible entran en las categorías 2 y 1, respectivamente. Sin embargo, predecir el potencial de peligro de las sustancias químicas es una tarea compleja, dada la

diversa gama de sustancias químicas y su efecto sobre el ojo.

Mientras que las pruebas con animales, como la prueba de Draize, aunque muy criticada por los consumidores, se utilizan habitualmente, las estrategias de pruebas sin animales, como las mediciones no invasivas de TEER (resistencia eléctrica transepitelial) en placas de pocillos de tejido cultivado, están adquiriendo cada vez más importancia en la industria, ya que proporcionan información valiosa sobre la integridad y la salud de las barreras epiteliales. La espectroscopia de impedancia eléctrica es un método conocido y valioso para proporcionar datos cuantitativos sobre la integridad de la barrera tisular y el crecimiento de los tejidos tras la exposición química



La prueba Draize para clasificar los peligros de las sustancias químicas se realiza en conejos.

‘LOS MÉTODOS *IN VITRO* NO PUEDEN CAPTAR TODAS LAS COMPLEJIDADES DEL ORGANISMO QUE SE PRODUCEN DURANTE LAS PRUEBAS *IN VIVO*. NO OBSTANTE, SON UNA PARTE INDISPENSABLE DEL PROCESO DE EVALUACIÓN ’

mediante la medición de las propiedades eléctricas de modelos de piel.

Se aplica una corriente alterna de baja frecuencia y se miden la resistencia de la barrera y el desplazamiento de fase de la señal. Un valor TEER reducido es un indicador de una barrera comprometida. Cuanto más fácilmente fluya la corriente entre las células, menor será el valor TEER.

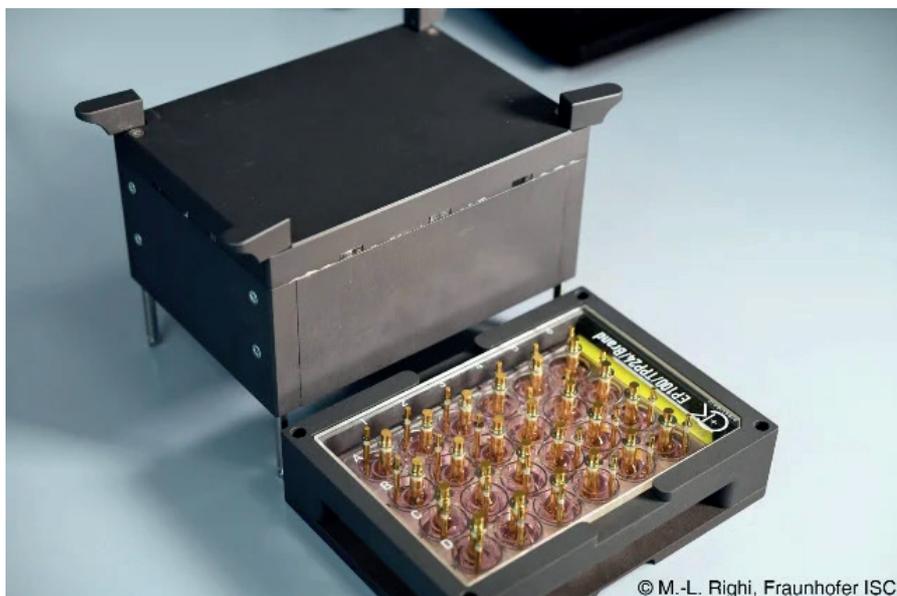
Sin embargo, las mediciones TEER convencionales requieren mucho tiempo y, por tanto, son costosas, ya que se realizan a mano pocillo a pocillo. Esto hace que los estudios con un gran volumen de muestras sean laboriosos y reduce la reproducibilidad de los resultados. Los tiempos críticos, como en la aplicación de sustancias

de ensayo a modelos epiteliales y las mediciones TEER posteriores, son difíciles de retener. Además, los electrodos comunes de acero inoxidable u oro adolecen de una elevada impedancia inherente, que a menudo supera la de los modelos celulares.

Para superar las limitaciones de los dispositivos comunes de medición de TEER mencionados anteriormente, con el uso de un novedoso espectrómetro de impedancia semiautomatizado con electrodos recubiertos de nitruro de titanio (TiN), se puede evaluar la TEER a 12,5 y 1000 Hz en 24 pocillos simultáneamente en un tiempo total de 15 segundos. El método es adecuado para epidermis humana real, RHE (epidermis humana reconstruida) y cultivos celulares de capa fina.

Además, en menos de 2 minutos se dispone de un espectro de impedancia completo de 1 Hz a 200 KHz, suficientemente sensible a la integridad de la estructura celular a nivel unicelular. Los cambios en el espectro pueden reflejar alteraciones en la permeabilidad de iones y moléculas. El análisis TEER no invasivo puede suponer una valiosa contribución a la diferenciación clara en el campo de la evaluación del riesgo químico. Con el espectro de impedancia completo, incluso los cambios sutiles en los cultivos celulares, como los que se esperan en las pruebas de eficacia en la industria cosmética, pueden reconocerse de forma rápida y fiable.

Los métodos *in vitro* no pueden captar todas las complejidades del organismo que se producen durante las pruebas *in vivo*. No obstante, son una parte indispensable del proceso de evaluación de los efectos de los productos sobre la piel. Preceden a las pruebas *in vivo* en humanos porque son un valioso indicador del comportamiento potencial de los agentes en contacto con el tejido. Los diversos métodos de medición *in vitro* están en auge y adquirirán cada vez más importancia en el futuro. Apenas hay una CRO importante de productos cosméticos y farmacéuticos que no ofrezca ya este tipo de pruebas. Nos entusiasma ver qué más se puede investigar con métodos *in vitro*, sobre todo en combinación con la IA. ¡Los animales de laboratorio lo agradecerán!



© M.-L. Righi, Fraunhofer ISC

El nuevo CellSpectrometer CSM 2100 de C+K mide un espectro de impedancia completo en 24 pocillos en menos de 2 minutos. Foto © Fraunhofer ISC 2023.