



Uso de cultivos celulares en la investigación dermocosmética

Los cultivos celulares se han convertido hoy día en una herramienta de diagnóstico para evaluar el efecto biológico de determinados compuestos, incluidos los cosméticos. Con este fin, se utilizan células que provienen de órganos o tejidos para simularlos mediante técnicas *in vitro*.

POR GRUPO DE ECO-PROCESOS, COSMÉTICA Y SALUD, AITEX

MOTIVACIONES DEL CULTIVO CELULAR

El mercado global de ingredientes cosméticos se estima que alcanzará un valor de 576 billones en el año 2021 y experimentará un alto crecimiento del 4,6% para el período 2017-2025 (*Transparency Market Research*).

Los ingredientes y productos cosméticos requieren una evaluación para comprobar su eficacia en contacto con la piel, para ello, se utilizan los cultivos celulares *in vitro* capaces de reproducir la epidermis a escala de laboratorio. Los modelos celulares ofrecen un gran potencial tecnológico para el desarrollo de productos destinados a estar en contacto con la piel y la validación de su funcionalidad.

Como estrategia para dar solución a este reto tecnológico, AITEX abre un nuevo campo de investigación con cultivos celulares en el marco de su proyecto CELLCARE “*Investigación y desarrollo de cultivos celulares para estudios de biocompatibilidad y eficacia de activos*”,

que servirán como herramienta experimental en el ámbito de la investigación cosmética, permitiendo caracterizar la función de activos y formulaciones cosméticas en modelos experimentales epidérmicos *in vitro*, demostrando así la eficacia del ingrediente o producto final. Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE.

ESTUDIO DE LA EFICACIA DE ACTIVOS COSMÉTICOS

El cultivo de células, siempre se ha considerado en dos dimensiones (2D), es decir, en monocapas de células adheridas a una superficie para su crecimiento. Los cultivos 2D permiten evaluar diversas funciones del activo sometido a estudio como proliferación y regeneración celular.

En un modelo de piel artificial en tres dimensiones (3D), las células se distribuyen de forma más compleja,

creciendo en microambientes tridimensionales en los que la perfusión de entrada de nutrientes y salida de desechos es continua, es decir, muestran mayor grado de complejidad y de homeostasis estructural, de forma análoga a lo que ocurre en tejidos y órganos, este tipo de cultivos permite evaluar la eficacia en todas las capas que forman la epidermis.

Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido controlar los crecimientos en 2D de queratinocitos HaCat (línea celular de queratinocitos inmortales de piel humana adulta) y fibroblastos HDFn (línea celular de fibroblastos dérmicos humanos) para evaluar la proliferación y regeneración celular de activos y fórmulas cosméticas. Posteriormente, con estas líneas celulares se ha obtenido un cultivo en 3D equivalente dermo-epidérmico humano, conocido como “cultivo organotípico”, que permitirá establecer protocolos de Test de

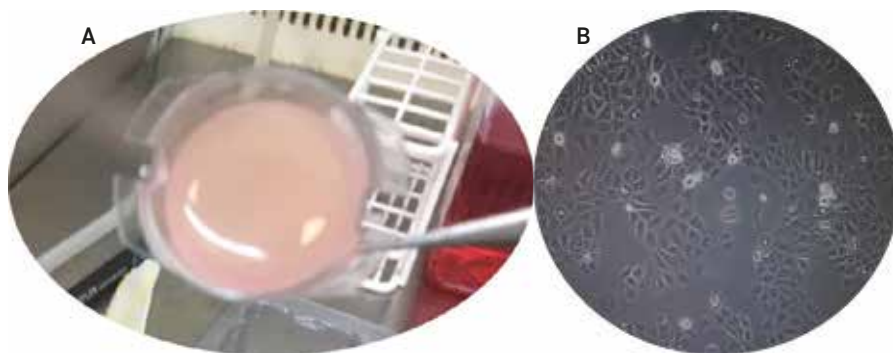


Figura 1. (A) Pocillos de cultivo 2D con queratinocitos HaCat. (B) Observación microscópica del cultivo celular HaCat.

eficacia teniendo en cuenta todas las capas que componen la dermo-epidermis.

TEST DE EFICACIA EN 2D

• Análisis de la proliferación / viabilidad celular por reducción de MTT

Existen una gran variedad de pruebas de eficacia las cuales analizan distintos niveles de la capa dermo-epidérmica. El ensayo de MTT es un método colorimétrico cuantitativo que permite determinar la proliferación o viabilidad celular del tejido. El MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio, azul de tiazol; número CAS 298-93-1] es absorbido por las células vivas y luego metabolizado por las enzimas mitocondriales para reducirse a formazán. El formazán queda acumulado en el interior de las células debido a su impermeabilidad a las membranas celulares, lo que permite analizar la proliferación / viabilidad celular a través de la cuantificación de la reducción de este compuesto. Se ha realizado un estudio de la proliferación / viabilidad celular de una fórmula cosmética, utilizando un cultivo monocapa 2D de queratinocitos HaCat (Figura 1). Tras 24 horas

de exposición e incubación de la fórmula cosmética junto con las células sometidas a estudio, se determina la proliferación/viabilidad celular mediante reducción del MTT a formazán. Este ensayo es necesario previamente a la realización del análisis del efecto regenerador pues indican los porcentajes adecuados que no producen citotoxicidad sobre las células analizadas.

• Análisis in vitro del efecto regenerador y cicatrizante de un activo cosmético

Por otro lado, el ensayo de rayado (*Scratch assay*), es un método para estudiar la migración celular *in vitro*. Este método se basa en la observación que, tras la creación de un nuevo espacio artificial, llamado “scratch”, en una monocapa de células confluentes, las células en el borde del espacio recién creado se moverán hacia la abertura para cerrar el “rasguño” hasta que se establezcan de nuevo nuevos contactos célula-célula.

Los pasos básicos implican la creación de un “rasguño” en las células de la monocapa, la captura de imágenes al principio y a intervalos regulares durante la migración celular para cerrar el arañazo. Se realiza la comparación

de las imágenes entre los cultivos tratados con activos y el cultivo control al que se le ha producido también la herida, de modo que se determina la tasa de migración celular. Una de las principales ventajas de este sencillo método es que imita en cierta medida la migración de las células *in vivo*. Por ejemplo, la eliminación de parte del endotelio de los vasos sanguíneos inducirá la migración de las células endoteliales (CE) hacia la zona denudada para cerrar la herida. Otra ventaja del ensayo de rascado *in vitro* es su especial idoneidad para estudiar la regulación de la migración celular mediante la interacción de las células con la matriz extracelular (MEC) y las interacciones célula-célula. Además, este ensayo es compatible con la microscopía, incluida la obtención de imágenes de células vivas, lo que permite ver la evolución durante la migración celular.

Este método se ha probado con dos fórmulas cosméticas, una que incluye un activo regenerante y otra sin activo cosmético. Se muestran los resultados a continuación respecto a la muestra control (Figura 2).

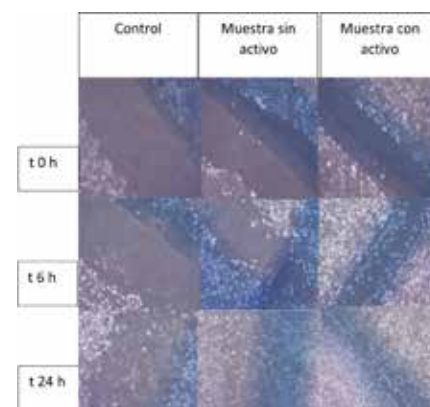
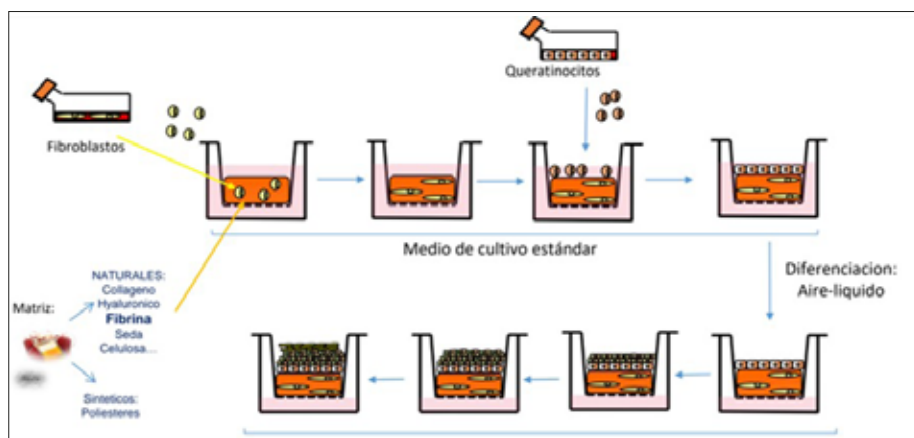


Figura 2. Observación microscópica de la regeneración de las muestras cosméticas respecto un control de ensayo.



↑ **Figura 4.** Aspecto de la parte superior de un modelo dermo-epidérmico creado por AITEX

← **Figura 3.** Generación de modelo 3D humano.

Las dimensiones del área regenerada, han sido medidas mediante el *software* de *Image J*. Todos los valores experimentales han sido analizados mediante análisis estadístico de varianza (ANOVA).

• Resultados

Una vez comprobadas las concentraciones no citotóxicas mediante MTT, se ha obtenido una mayor regeneración de la monocapa celular en el análisis de *Scratch assay*, con la fórmula cosmética que contiene activo, tal y como muestra la gráfica (*Gráfica 1*). Por tanto,

ha sido posible evaluar el poder regenerante del activo cosmético sometido a estudio mediante los cultivos celulares desarrollados.

GENERACIÓN DE MODELO Dermo-EPIDÉRMICO HUMANO

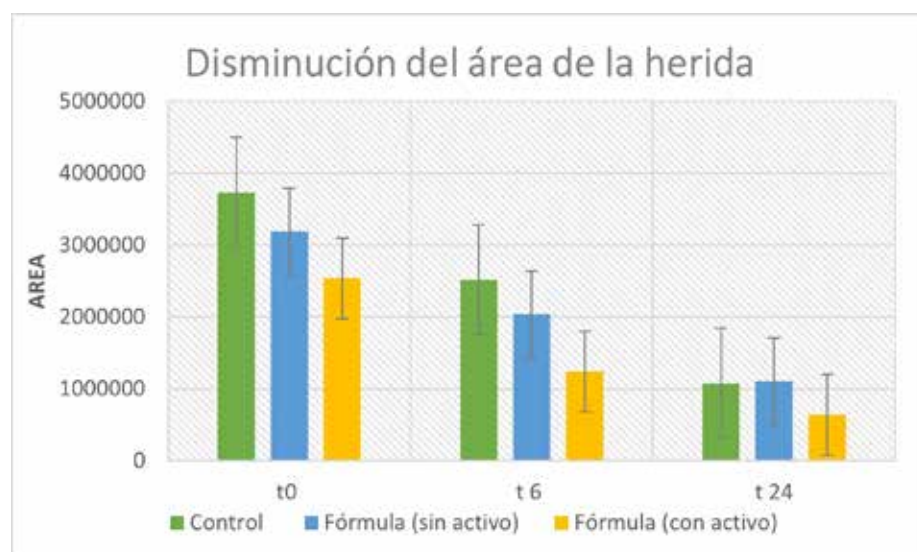
Para la generación del modelo dermo-epidérmico humano, se han cultivado fibroblastos humanos HDFn junto con “dermis” (mezcla de componentes químicos necesarios para su desarrollo tridimensional) y un soporte de membrana de tamaño de poro de 0,4-1µm (*PET track-etched membrane 6 well format*) y un medio de cultivo estándar

DMEM (*Lonza, with 4.5 g/l glucosa and L-glutamine*). Una vez alcanzada la confluencia, sobre estas células se han cultivado queratinocitos HaCat a una elevada concentración. Una vez confirmado mediante observación al microscopio (Motic, contraste de fases) una confluencia del 100% de las células HaCat, se ha cambiado el medio por un medio de diferenciación para inducir al desarrollo de los distintos tipos de queratinocitos de la capa superficial. Sobre ellos no se ha añadido medio de cultivo de forma que se ha mantenido contacto directo con el aire para inducir a la diferenciación “aire-líquido” (*Figura 3*).

• Resultados

Transcurridos 21 días de la generación del modelo dermo-epidérmico humano, el aspecto visual del mismo es el siguiente (*Figura 4*). Su homogeneidad y pruebas de histología confirman que está listo para utilizar como modelo de piel artificial en la investigación dermocosmética 

1. (*) Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius, Comerç i Treball de la Generalitat Valenciana, a través del IVACE. EXPEDIENTE: IMAMCI/2021/1



Gráfica 1. Gráfica de la disminución de heridas entre fórmulas cosméticas con y sin activo.



Servicio global

Soluciones a medida y proximidad al cliente

Caracterización de productos cosméticos

Control microbiológico y Challenge Test

Patch test, HRIPT Het-Cam

SPF

Test de Uso y de Eficacia

Estudios de estabilidad y análisis fisico-químicos

Desarrollo de proyectos I+D

Cultivos celulares

Biocompatibilidad de materiales

Modelo 3D epidérmico

Test de eficacia en cosméticos

Bioimpresión

CELLCARE

Investigación y desarrollo de cultivos celulares para estudios de biocompatibilidad y eficacia de activos.

Proyecto financiado por IVACE - Exp. IMAMCI/2021/1