



aitex[®]
textile research institute

CELLCARE

I+D de cultivos
celulares para el
estudio de
biocompatibilidades y
eficacia de activos





Contenido

1. Ficha técnica del proyecto	3
2. Antecedentes y motivaciones	4
3. Objetivos del proyecto	5
4. Plan de trabajo.....	6
5. Resultados obtenidos	7
6. Impacto empresarial	17



1. Ficha técnica del proyecto

Nº EXPEDIENTE	IMAMCI/2021/1
TÍTULO COMPLETO	I+D de cultivos celulares para el estudio de biocompatibilidades y eficacia de activos
PROGRAMA	Plan de Actividades de Carácter no Económico 2021
ANUALIDAD	2021
PARTICIPANTES	(SI PROCEDE)
COORDINADOR	(SI PROCEDE)
ENTIDADES FINANCIADORAS	IVACE – INSTITUT VALENCIÀ DE COMPETITIVITAT EMPRESARIAL www.ivace.es
ENTIDAD SOLICITANTE	AITEX
C.I.F.	G03182870



**GENERALITAT
VALENCIANA**



Este proyecto cuenta con el apoyo de la Conselleria d'Economia Sostenible, Sectors Productius i Treball, a través de IVACE (Institut Valencià de Competitivitat Empresarial)



2. Antecedentes y motivaciones

Actualmente, la Comunidad Valenciana, es la 4ª región española con mayor densidad de empresas del sector BIO, concentrando un total de 9,5% de empresas dedicadas a la biotecnología (fuente: BIOVAL. Cluster BIO de la Comunidad Valenciana). La Biotecnología es un mercado potente en continuo crecimiento que requiere de estudios tales como los cultivos celulares, para la evaluación del efecto biológico de determinados compuestos.

Por otra parte, el mercado global de ingredientes Cosméticos se estima que alcanzará un valor de 576 billones al año 2021 y experimentará un alto crecimiento de 4.60% 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 piel 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 nos servirán como herramienta experimental en el ámbito de la investigación Cosmética y de Salud, permitiendo caracterizar la función de activos y formulaciones cosméticas en modelos experimentales epidérmicos in vitro, demostrando así la eficacia del ingrediente o producto final.



3. Objetivos del proyecto

El proyecto CELLCARE ha tenido como objetivo principal investigar y desarrollar la aplicación del cultivo celular destinado a los ámbitos de Salud y Cosmética, para establecer protocolos de **Test de eficacia de activos** y **biocompatibilidades** celulares frente a materiales. Además, ha desarrollado de forma paralela un **modelo tridimensional epidérmico** que se asemeja al tejido humano y ofrece una plataforma de análisis junto con el cultivo celular bidimensional.



4. Plan de trabajo

CRONOGRAMA

PAQUETES DE TRABAJO	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PT 0. GESTIÓN Y SEGUIMIENTO												
A0.1. Gestión y seguimiento												
PT 1. PLANTEAMIENTO Y PLANIFICACIÓN TÉCNICA												
A1.1. Preparación de la propuesta técnico-económica												
A1.2. Definición de los recursos necesarios												
A1.3. Definición del plan de comunicación												
A1.4. Definición de los prototipos a realizar												
A1.5. Definición de los niveles de partida y niveles objetivos												
PT 2. EJECUCIÓN TÉCNICA												
A2.1.1. Estado del arte/Viabilidad técnica/IPR Salud												
A2.1.2. Estado del arte/Viabilidad técnica/IPR Cosmética												
A2.1.3. Estado del arte/Viabilidad técnica/IPR Modelo 3D epidérmico												
A2.2.1. Experimental Salud												
A2.2.2. Experimental Cosmética												
A2.2.3. Experimental "Modelo 3D epidérmico"												
A2.3.1. Caracterización Salud												
A2.3.2. Caracterización Cosmética												
A2.4.1. Análisis y reingeniería Salud												
A2.4.2. Análisis y reingeniería Cosmética												
A2.5. Coordinación técnica y validación												
PT 3. MERCADO Y VIABILIDAD INDUSTRIAL Y ECONÓMICA, TRANSFERENCIA E IMPACTO												
A3.1. Mercado												
A3.2. VIETI												
PT 4. COMUNICACIÓN Y DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS. INFORME EJECUTIVO												
A.4.1. Implementación del plan de comunicación/difusión												
A.4.2. Informe ejecutivo												
PT5 SUPERVISIÓN Y SEGUIMIENTO DEL PROYECTO												
A.5.1 Supervisión y seguimiento del proyecto												

Tabla 1. Cronograma para la ejecución del proyecto



5. Resultados obtenidos

Se han desarrollado métodos para la evaluación de Biocompatibilidad de materiales, mediante cultivos celulares en dos dimensiones (2 D) e hidrogeles celulares capaces de penetrar en todo tipo de morfologías.

Asimismo, con el desarrollo de cultivos celulares 2D se han podido realizar test de eficacia *in vitro* de fórmulas y activos, tales como el análisis del efecto regenerador y cicatrizante.

También se han optimizado fórmulas cosméticas con activos anti-edad capaces de aumentar la cuantificación de colágeno y elastina.

Por último, se han desarrollado cultivos celulares en tres dimensiones (3D) mediante un Modelo epidérmico humano.

✓ LÍNEA SALUD:

Para el estudio de la **Biocompatibilidad celular frente a materiales** se ha utilizado la **bioimpresora 3D**, pues permite insertar células en diferentes relieves, pudiendo analizar todo tipo de muestras sin necesidad de que sean homogéneas.

Se ha desarrollado un hidrogel compatible con la bioimpresora y el cultivo celular, para posteriormente utilizarlo en el análisis de biocompatibilidad de materiales. La bioimpresora, nos ha proporcionado condiciones 3D que se asemejan más a las condiciones reales de la piel humana (*Ilustración 1*).

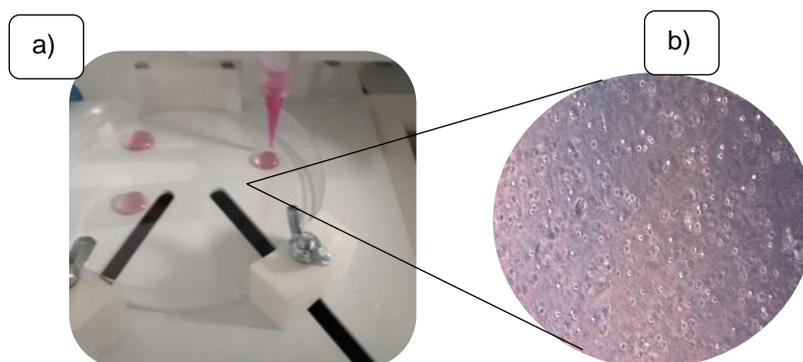


Ilustración 1. a) Bioimpresión de fibroblastos con hidrogel de quitosano al 2%; b) Observación microscópica del hidrogel con células.

También ha sido posible bioimprimir hidrogeles con células, creando diseños personalizados (*Ilustración 2*).

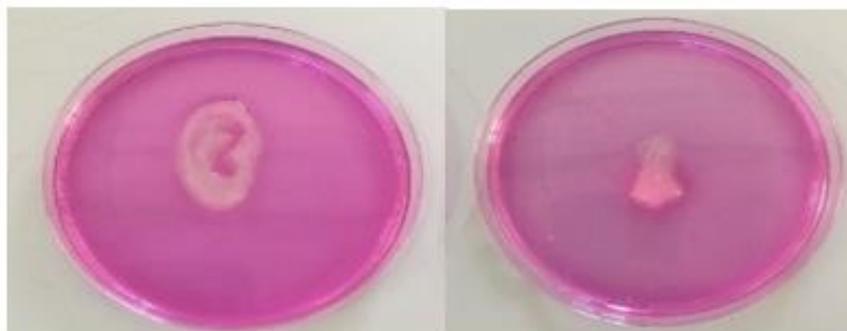


Ilustración 2. Bioimpresión de oreja y nariz con hidrogel de alginato/gelatina.

A partir de ensayos como la viabilidad celular, hinchazón, y degradabilidad, se ha **optimizado** un **hidrogel** capaz de evaluar la biocompatibilidad frente a materiales. En la gráfica se muestran los porcentajes de hinchazón de diferentes composiciones de hidrogeles (Ilustración 3).

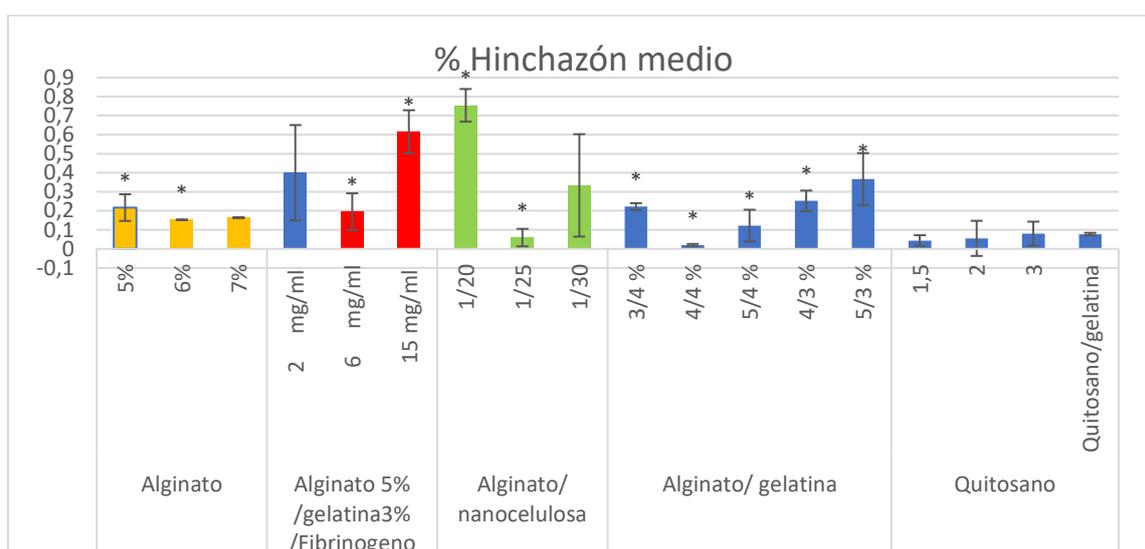


Ilustración 3. Resultados obtenidos tras el ensayo de hinchazón de diferentes muestras de hidrogeles.

Con el hidrogel de **óptimo** se ha obtenido una degradación media (degradación óptima) y una **Viabilidad** con fibroblastos HDFn del **99%**.

- **Biocompatibilidad de materiales:**

Para evaluar la biocompatibilidad de un material (ejemplo: **scaffold de PLA**), se ha puesto en contacto con el hidrogel óptimo desarrollado que contiene fibroblastos humanos HDFN (Ilustración 4). Mediante técnicas de tinción, se ha obtenido la viabilidad celular tras 24 horas de contacto con el material.



Ilustración 4. Scaffold de PLA sometido al estudio de biocompatibilidad.

	<i>Réplicas</i>	<i>Línea celular</i>	<i>Viabilidad (%)</i>	<i>Promedio viabilidad (%)</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Desviación estándar media</i>
<i>Andamio</i>	<i>S1</i>	<i>Hdfn</i>	<i>50</i>	77.66 %	<i>0,07709878</i>	<i>0,25455124</i>
	<i>S2</i>	<i>Hdfn</i>	<i>100</i>		<i>0,04943211</i>	
	<i>S3</i>	<i>Hdfn</i>	<i>83</i>		<i>0,00306178</i>	

Tabla 2. Viabilidad celular de andamios impresos e inyectados con el hidrogel de alginato, gelatina y fibrinógeno.

Los scaffolds de PLA han mostrado una viabilidad celular del **77,66 %** (Tabla 2).

Por otra parte, los cultivos celulares 2D permiten evaluar funciones como la **regeneración celular** en fórmulas y activos sometidos a estudio.

- **Poder regenerante:**

Además de los ensayos de Biocompatibilidad, se ha optimizado un **hidrogel con poder regenerante**. Para evaluar su efecto se ha puesto a punto el análisis del efecto regenerador y cicatrizante (**Scratch assay**), el cual estudia la migración celular in vitro. Previamente a este ensayo, mediante el ensayo **MTT**, se comprueba las concentraciones a las cuales el hidrogel no produce efecto citotóxico.



Ilustración 5. (a) Pocillos de cultivo 2D con queratinocitos HaCat para evaluar el efecto citotóxico mediante MTT. (b) Observación microscópica del cultivo celular HaCat.



Una vez determinadas las concentraciones no citotóxicas, se comprueba el su poder regenerante mediante el Scratch assay, 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.

Este test se ha llevado a cabo para validar la eficacia regenerante del hidrogel desarrollado.

Se ha obtenido una mayor regeneración de la monocapa celular, con la fórmula que contine activo, tal y como muestra la imagen (*Ilustración 6*).

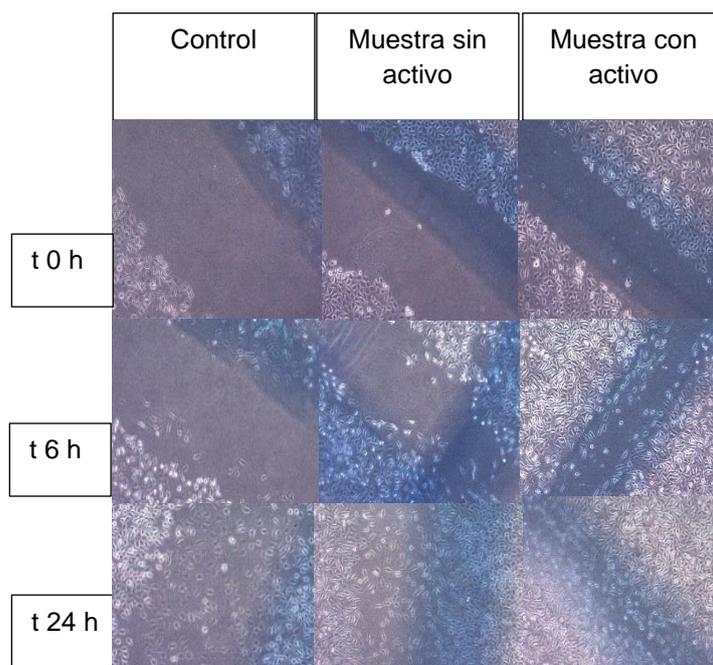


Ilustración 6. Imágenes tomadas con microscopio a diferentes tiempos para el estudio del cierre de la herida de hidrogeles con y sin activo, tomando un control de referencia.



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

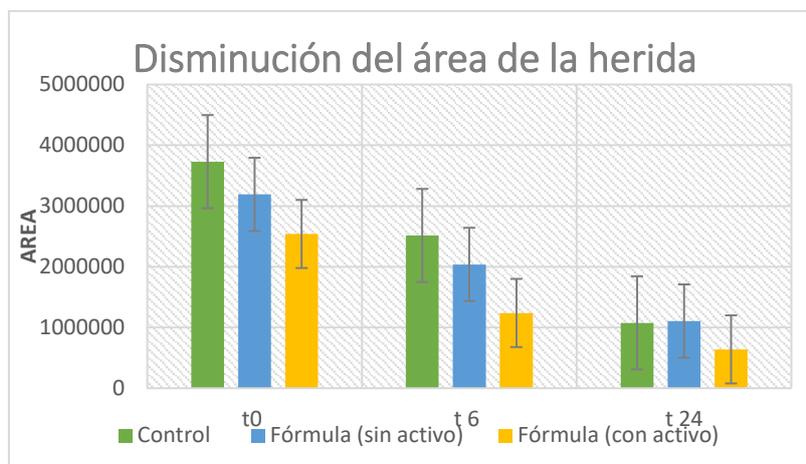


Ilustración 7. Gráfica obtenida tras el análisis de datos del cierre del área de la herida con Imagen J de los hidrogeles con y sin activo).

Se ha obtenido **mayor disminución de área de la herida** con el hidrogel óptimo que contiene el activo

✓ **LÍNEA COSMÉTICA:**

Por otra parte, para establecer protocolos de **Test de eficacia en productos cosméticos**, en primer lugar, se han desarrollado varias **fórmulas cosméticas estables** con el fin de añadir células madre vegetales y otros **activos**.

- Patch test (prueba de parche):

En primer lugar, se ha verificado la compatibilidad cutánea de los productos cosméticos desarrollados después de una única aplicación en la piel bajo un parche oclusivo durante 48 horas. El efecto ha sido evaluado por un dermatólogo (*tabla 3*).



MUESTRA/SAMPLE: Crema nutritiva con hydroxiprosilane

VOLUNTARIOS VOLUNTEERS	CLASIFICACIÓN DEL INDICE DE IRRITACIÓN CLASSIFICATION OF THE IRRITATION INDEX				
	NEGATIVA NEGATIVE	DUDOSA DOUBT	DÉBIL WEAK	FUERTE STRONG	EXTREMA EXTREME
1	x				
2	x				
3	x				
4	x				
5	x				
6	x				
7	x				
8	x				
9	x				
10	x				
PUNTUACIÓN SCORE	10				
VALOR I.R. /VALUE I.R.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		ÍNDICE DE REACCIÓN (IR) REACTION INDEX		0.0	

Tabla 3. Resultados de Patch test de la fórmula de crema nutritiva con activo al 6%.

Una vez confirmado que los activos utilizados no producen reacción a la piel, ha sido comprobado su **efecto anti-edad y reafirmante** sobre piel foto-envejecida mediante técnicas *ex vivo*. El estudio se ha realizado con cultivos organotípicos de **explantes de piel humana** (hosEc). A continuación, se describen los diferentes parámetros analizados a las muestras:

- CC-011_crema nutritiva 6% activo.
- CC-009_contorno de ojos 2% células madre vegetales.

- **Quantificación de colágeno**

El contenido de colágeno, colágeno soluble que incluye el colágeno de tipo I a V, se ha cuantificado tras 10 días de estudio, calculado por miligramo de tejido dérmico fresco. Los resultados se muestran en la *ilustración 8* y la *tabla 4*.

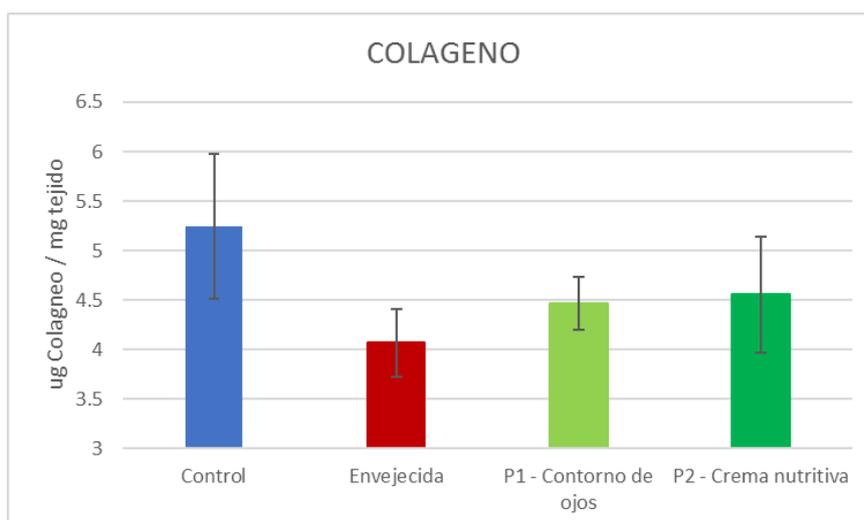


Ilustración 8. Cantidad de colágeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de tejido dérmico al final del estudio. Estudio realizado en el centro tecnológico GAIKER.

COLAGENO	Media	D.S.
<i>Control</i>	5.25	0.73
<i>Envejecida</i>	4.07	0.34
<i>P1 - Contorno de ojos</i>	4.47	0.27
<i>P2 - Crema nutritiva</i>	4.55	0.58

Tabla 4. Cantidad de colágeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de tejido dérmico fresco al final del estudio.

- **Cuantificación de elastina**

No sólo se ha llevado a cabo el ensayo del contenido de colágeno, sino que también se ha realizado el análisis del contenido de elastina. El último día del estudio, se procesaron los hOSEC (tejidos dérmicos) para cuantificar la elastina presente en el tejido dérmico. Se han calculado los resultados del ensayo de contenido de elastina ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de tejido dérmico fresco. Los resultados se muestran en la *ilustración 9* y *tabla 5*.

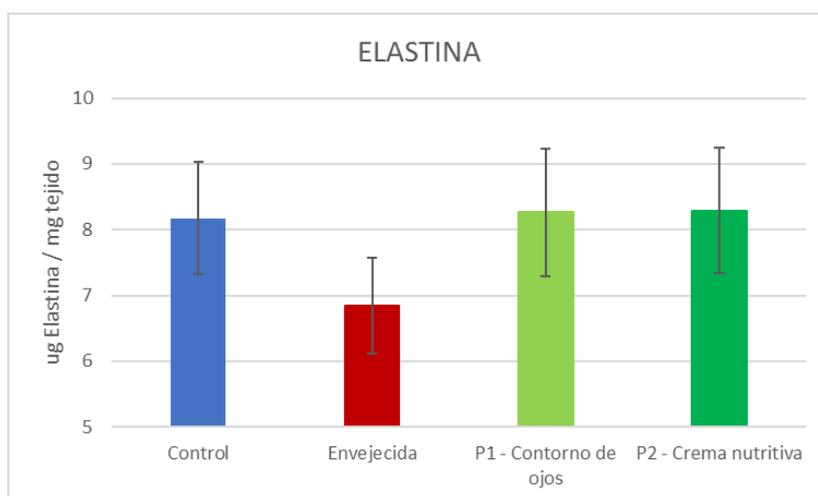


Ilustración 9. Cantidad de elastina ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de tejido dérmico. Estudio realizado en el centro tecnológico GAIKER.

<i>ELASTINA</i>	<i>Media</i>	<i>D.S.</i>
<i>Control</i>	8.17	0.86
<i>Envejecida</i>	6.84	0.73
<i>P1 - Contorno de ojos</i>	8.26	0.97
<i>P2 - Crema nutritiva</i>	8.29	0.95

Tabla 5. Cantidad de elastina ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de tejido dérmico fresco al final del estudio.

Las fórmulas cosméticas anti-edad analizadas aumentan hasta un 11% la producción de colágeno y elastina en muestras de piel humana envejecida (ensayo *ex vivo*).

- **Estudio histológico**

Además, se ha realizado un estudio con microscopía óptica para visualizar el colágeno y la elastina mediante la tinción de tricrómico de Masson que visualiza las fibras elásticas (principalmente colágeno) en el tejido conectivo. Esta tinción es adecuada para distinguir el **colágeno** del tejido circundante tiñéndolo de **verde** y la fibra muscular (fibrina) y los núcleos de rojo. Mediante esta técnica se comprueba como el tejido dañado se acerca a la muestra control tras aplicar las fórmulas cosméticas sometidas a estudio (*Ilustración 10*).

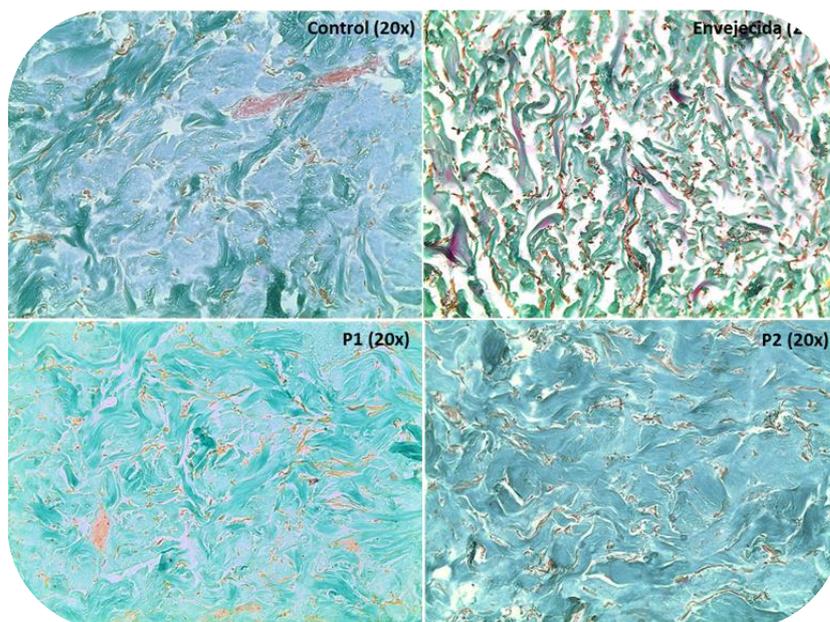


Ilustración 10. Tinción de Masson. Se observa: grupo de control (sano), grupo de piel envejecida, grupo envejecida + contorno de ojos (P1) y grupo envejecido + crema nutritiva (P2). Objetivo 20x. Las fibras conectivas están marcadas en verde. Estudio realizado en el centro tecnológico GAIKER.

Se ha observado una **buena conservación de la estructura de la dermis** (fibras elásticas completas y no degradadas) en los explantes de piel tratados tópicamente con los productos de prueba. Estas imágenes corroboran los datos cuantitativos de colágeno y elastina obtenidos por métodos ELISA, pues mejora la capacidad de la piel para evitar los efectos de los corticoides, aumentando la **producción de colágeno y sobretodo de elastina en muestras de piel humana envejecida**.

Por último, de forma paralela a ambas líneas, se ha desarrollado un Modelo dermo-epidérmico humano para el cual ha sido necesario:

- Adquirir un control del **crecimiento celular 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 formulas cosméticas.
- Con la combinación de estas líneas celulares, transcurridos 21 días, se ha obtenido un cultivo en 3D **equivalente dermo-epidérmico humano**, conocido como "Cultivo organotípico", que permite establecer **protocolos de Test de eficacia** teniendo en cuenta todas las capas que componen la dermo-epidérmis (Ilustración 11).



Ilustración 11. Cultivo 3D dermo-epidérmico humano creado por AITEX.



6. Impacto empresarial

La creciente preocupación social por la salud hace que los estudios con cultivos celulares estén en auge. 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.

Es por ello que los sectores de cosmética y salud son las empresas más interesadas en los estudios desarrollados en el proyecto.

La transferencia directa a empresas se ha realizado mediante una búsqueda inicial a nivel Nacional, obteniéndose un centenar de empresas. Para acotar el número de empresas, se han seleccionado las que pertenecen a la **Comunidad Valenciana**.

Tras contactar directamente con un total de **16 empresas**, 5 de ellas muestran mayor interés por el proyecto. Se identifica que el **sector cosmético** está más familiarizado con temas de investigación con cultivos celulares. Cabe destacar, que concretamente 1 empresa de València, pretende validar sus productos mediante una **solución personalizada de I +D** para el año 2022.