

ENSAYO *IN VITRO* PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTI-INFLAMATORIA DEL PRODUCTO DE EURO ÉXITO ALOE SL “GEL FRÍO RELAX” (GFR)

1. Sustancias problema y control

Producto “Gel Frío Relax” (GFR):

Debido a la imposibilidad de esterilización del producto, el ensayo se llevó a cabo en modelo de epitelio humano reconstruido (3D).

Tratamiento previo al estudio:

No procede.

Controles:

- Ctrl: control negativo (tejido sin tratamiento).
- LPS: control positivo de inflamación en queratinocitos humanos (IL-8).
- LPS + Dexamatasona: control positivo de efecto anti-inflamatorio (IL-8).

2. Justificación del modelo celular y protocolo utilizados

La evaluación del potencial anti-inflamatorio se llevó a cabo sobre un modelo de epitelio humano reconstruido de 0,33 cm² cultivado en medio químicamente definido, producidos por SkinEthic laboratories (Niza, Francia) y mantenidos durante el ensayo en el medio suministrado por SkinEthic laboratories (1).

El material utilizado fue siempre estéril. El proceso de manipulación celular se llevó a cabo en cabina de flujo laminar (Euro Aire, TDI), y en incubador (Hera Cell, Heraeus) al 5% de CO₂, 37°C de temperatura y 90% de humedad.

El protocolo experimental fue similar al utilizado por el grupo de investigación en ensayos anti-inflamatorios anteriores en epitelio humano reconstruido:

- Estabilización de tejidos.
- Preparación de productos.
- Tratamiento de las muestras durante 24 horas.
- Análisis de la liberación de IL-8.
- Análisis de datos.

3. Condiciones de ensayo

Después de su recepción, cada epitelio reconstruido se depositó en una microplaca de 24 pocillos con 600 µl de medio de mantenimiento fresco (equilibrado a la temperatura del laboratorio). A continuación, la placa fue colocada en un incubador O/N a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad, para la estabilización de los tejidos.

Los diferentes tratamientos se administraron durante 24h. Para ello, primero, el medio de mantenimiento fue remplazado por medio fresco y posteriormente se aplicaron los elementos de ensayo (3 muestras/grupo):

- control negativo: medio de mantenimiento.
- control positivo de inflamación IL-8: LPS de *Escherichia coli* 100 µg/ml (estimulación) (SIGMA L2880), diluido en el medio de mantenimiento.
- control positivo antiinflamatorio IL-8: LPS de *Escherichia coli* 100 µg/ml + Dexametasona 10 µM (SIGMA D2915) (cortisona), diluidos en el medio de mantenimiento.
- elemento de ensayo IL-8: LPS de *Escherichia coli* 100 µg/ml + producto ("Gel Frío Relax" (GFR)) aplicado tópicamente sobre el epitelio (cantidad suficiente para cubrir el tejido).

	ESQUEMA DEL ENSAYO (IL-8)
Control negativo	+ Medio de Mantenimiento 24 horas
Control positivo	+ LPS 24 horas
Control positivo antiinflamatorio	+ LPS + DEXAMETASONA 24 horas
Elemento de ensayo	PRODUCTO "Gel Frío Relax" (GFR) 24 horas

Los criterios de evaluación utilizados fueron:

- Liberación de IL-8 mediante inmunodetección (ELISA) y extrapolación de la inhibición de la liberación de dicha interleuquina.

La **cuantificación de la liberación de las IL8**, como respuesta inflamatoria de las células epiteliales al estímulo LPS y PBS, respectivamente, fue valorada mediante la determinación de la liberación de interleuquinas en los sobrenadantes, utilizando el kit de **ELISA** para IL-8 de Abcam (ab46032). Se emplearon 3 muestras de cada grupo.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, las muestras para la curva patrón, los controles positivos y las muestras problema se incubaron en pocillos tratados con anticuerpo anti-IL-8 y el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente. Después de lavar, se añadió la enzima Streptavidina-peroxidasa. Para producir el producto coloreado, se añadió la solución sustrato del enzima, tras lavado para eliminar el exceso del enzima que no se unió en el paso anterior.

La lectura de la densidad óptica (D.O.) se realizó a 450 nm contra el blanco (diluyente) y la concentración de interleuquina presente en las muestras se calculó según la ecuación:

$$\text{Concentración} = A+B \times (\text{Media corregida de Absorbancias})$$

La medida de la liberación de interleuquinas se realizó respecto al Control Negativo (medio de cultivo), al Control Positivo (LPS) y al Control Positivo Antiinflamatorio (LPS + Dexametasona), una vez obtenidas las curvas patrón correspondientes (Figura II, Resultados).

La extrapolación de la inhibición de liberación de interleuquina se calculó hallando el porcentaje de la reducción de la cantidad de proteína liberada, como respuesta al estímulo inflamatorio en la muestra tratada con el producto de estudio, respecto al control positivo de anti-inflamatorio (LPS + Dexametasona) (Figura IV, Resultados).

4. Resultados y discusión

Producción de IL-8 (pg/ml)

Una vez obtenida la Curva Patrón a partir de la lectura de las D.O. a 450 nm (Figura II) se calcularon los datos de producción de IL-8 para cada una de las muestras de los diferentes grupos de tratamiento, cuyas medias y D.S. están representadas en la Figura III.

Debido a que la IL-8 es un factor quimiotáctico, implicado en la atracción y activación de células del sistema inmune, producido por queratinocitos en respuesta a estímulos inflamatorios, se utilizó LPS como inductor de la producción de esta proteína.

El LPS induce una liberación IL-8 hasta 396 pg/ml y la Dexametasona reduce la liberación de IL-8 hasta niveles en torno a los 90 pg/ml (Figura III).

El análisis estadístico ($p < 0,05$) de los datos mostró que entre los grupos Control negativo y Control Positivo LPS las diferencias son significativas ($p = 0,03$), por lo que se confirma el efecto estimulador de la inflamación provocado por el control positivo.

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo CP (LPS) y los tratados con Dexametasona y con el producto ($p = 0,01$), indicando que tanto el control antiinflamatorio para la IL-8 (Dexametasona) como el producto "Gel Frío Relax" (GFR) ejercen una acción antiinflamatoria (Figura III).

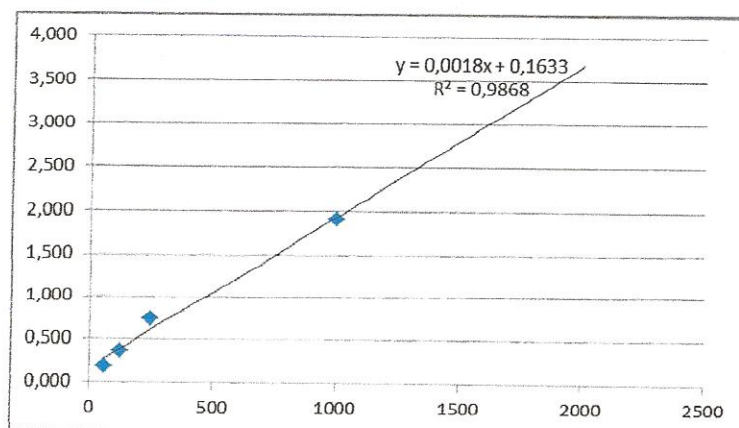


Figura II. Curva Patrón de IL-8. El valor de R (regresión) es fiable, debido a que es cercano a 1. Valores del eje X, absorbancia (450 nm); Valores del eje Y, concentraciones de proteína (pg/ml).

El producto "Gel Frío Relax" (GFR) muestra efecto antiinflamatorio, sobre la liberación de IL-8, ya que se encuentran diferencias significativas al ser comparadas las muestras tratadas con LPS + Producto con el control de inflamación LPS.

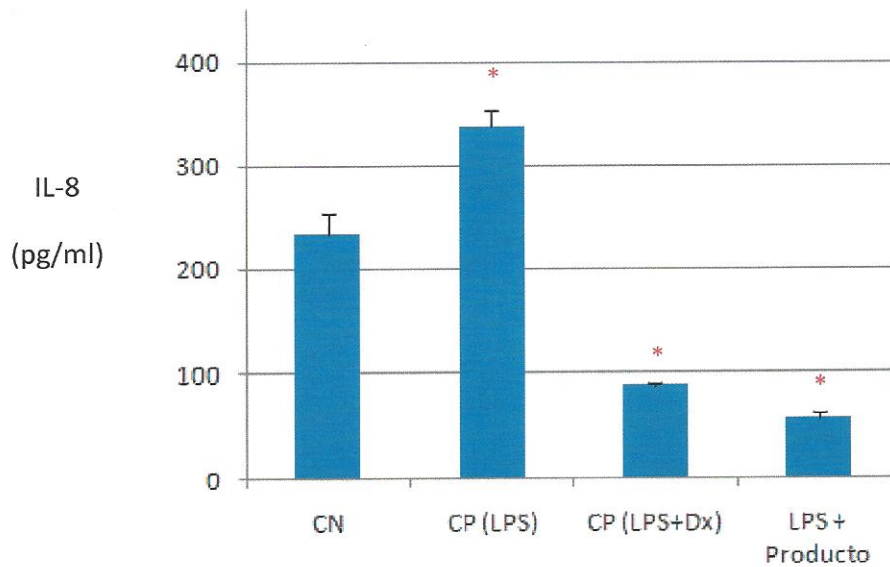


Figura III. Liberación de IL-8. CN, tejidos sin tratamiento; CP (LPS), control positivo de inflamación; CP (LPS + Dx), control positivo de anti-inflamación; LPS + Producto ("Gel Frío Relax" (GFR). Los controles positivos son eficaces en ambos casos. La muestra tratada con el producto ejerce efecto antiinflamatorio sobre la liberación de IL-8.

La extrapolación de la inhibición de liberación de IL-8 en la muestra tratada con el producto "Gel Frío Relax" (GFR) se calculó hallando el porcentaje de la reducción de la cantidad de proteína liberada, respecto al control positivo de anti-inflamatorio (LPS + Dexametasona) (Figura IV).

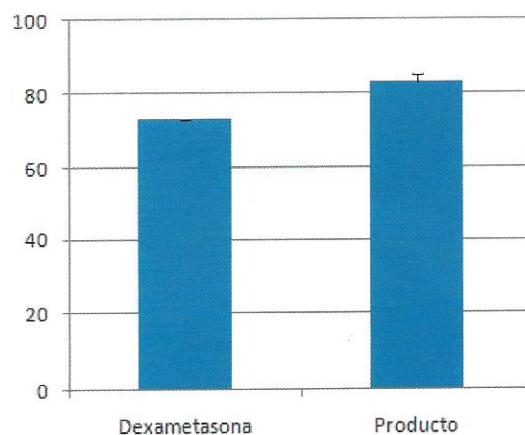


Figura IV. Inhibición de producción de IL-8. Mientras el grupo estimulado con LPS y tratado con cortisona (Dexametasona) revela una inhibición de producción de IL-8 de más del 70%, el grupo estimulado con LPS y tratado con "Gel Frío Relax" (GFR) lo hace en más de un 80%.

5. Conclusiones

El producto "Gel Frío Relax" (GFR) muestra un efecto antiinflamatorio, sobre la liberación de IL-8, mediante inhibición sobre la liberación de IL-8 (citoquina quimiotáctica) en queratinocitos humanos.

REFERENCIAS

1. <http://www.skinethic.com/RHE.asp>

En Madrid, a 02 de Enero de 2013,

Investigadora responsable,



Gema Palmeiro Molina
Responsable de laboratorio



Ángeles Juarranz de la Fuente
Directora Científica