

**Valutazione *in vitro* dell'azione schiarente di un prodotto
su colture cellulari di melanociti**

***In vitro evaluation of the depigmenting activity of a product
on melanocytes cell cultures***

Athena's srl

**SL530225 DERMABIANCA - MASCHERA-GEL SCHIARENTE
UNIFORMANTE ANTI-MACCHIE AGLI AHA**

Protocollo n° / *Report no.* **1709L31V3**

Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Elia REGOLA, Riccardo VICINI, Alice BUZZELLA	INDICE INDEX
Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.	Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3
Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Elia REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova)	Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4
Responsabile Laboratorio Test in vitro Bio Basic Europe <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Scopo <i>Aim</i> pag. 5
Sperimentatore Bio Basic Lab e Responsabile della Relazione <i>Bio Basic Lab Experimenter and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 6
	Risultati <i>Results</i> pag. 9
	Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 13
	Bibliografia <i>References</i> pag. 14

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*



RIASSUNTO

Il test permette di valutare la capacità depigmentante di un prodotto *in vitro* su colture cellulari di melanociti misurando la quantità di melanina prodotta. E' stato dapprima eseguito un saggio di vitalità cellulare allo scopo di individuare le concentrazioni del prodotto su cui condurre il test depigmentante. I melanociti sono stati trattati con concentrazioni scalari del prodotto testato (diluizioni 1:2 a partire da 5.0 mg/ml) ed è emerso che la vitalità cellulare non diminuisce alle concentrazioni testate, pertanto per eseguire il dosaggio della melanina sono state scelte le concentrazioni di 5.0, 0.5 e 0.05 mg/ml.

Dai risultati ottenuti dal dosaggio della melanina è emerso che il prodotto testato è in grado di ridurre significativamente la produzione alle concentrazioni di 5.0, 0.5 e 0.05 mg/ml. E' stata inoltre effettuata una valutazione morfologica mediante fotografie al microscopio in campo chiaro. Tali valutazioni hanno confermato il dato quantitativo del dosaggio di melanina.

ABSTRACT

The test allows to evaluate the depigmenting activity of a product in vitro on melanocytes cell cultures measuring the amount of melanin produced. We at first performed a cell viability assay in order to identify the concentrations of the product on which to conduct the depigmenting test. The melanocytes were treated with scalar concentrations of the tested product (dilution 1:2 from 5.0 mg/ml). We can observe that cell viability doesn't decrease significantly at tested concentrations, therefore to perform the dosage of melanin we chose the concentrations of 5.0, 0.5 and 0.05 mg/ml.

The results of the assay of melanin revealed that the tested product is able to significantly reduce the production of melanin at tested concentrations of 5.0, 0.5 e 0.05 mg/ml. We also carried out a morphological evaluation using bright field microscopic photographs. These evaluations confirmed the quantitative data of melanin dosage.



INTRODUZIONE

I melanociti sono cellule altamente specializzate aventi la funzione di proteggere l'epidermide dai danni delle radiazioni ultraviolette (UV) mediante la produzione di melanina attraverso un processo noto come melanogenesi. Insieme ai melanociti l'epidermide è composta principalmente da cheratinociti, che costituiscono fino al 95% dell'epidermide. Dal momento che i cheratinociti si spostano progressivamente verso gli strati più superficiali della pelle via via che si differenziano, i loro nuclei sono costantemente esposti ad alti livelli di radiazioni UV. Pertanto il DNA di queste cellule richiede protezione per garantire l'integrità delle cellule stesse. La melanina svolge tale azione protettiva e viene trasferita ai cheratinociti circostanti tramite i dendriti dei melanociti in risposta all'esposizione a radiazioni UV. Posizionandosi al di sopra dei nuclei dei cheratinociti, i granuli di melanina assorbono le radiazioni UV prima che riescano a raggiungere il nucleo e a danneggiare il DNA.

I disturbi della pigmentazione rappresentano importanti condizioni con risvolti medici ed estetici. Quando la produzione di melanina nella pelle umana è alterata si verificano disturbi come la vitiligine e il melasma. La vitiligine è il disturbo della pigmentazione più diffuso (colpisce lo 0.1-2% della popolazione mondiale) ed è caratterizzato da una perdita di funzione dei melanociti con conseguente comparsa di macchie chiare sulla pelle. Al contrario l'accumulo anormale di melanina può portare a melasma, efelidi e lentiggini. La comparsa di aree e macchie scure sulla pelle può anche essere conseguenza del normale processo di invecchiamento cutaneo: l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dovuto sia al normale metabolismo che a fattori estrinseci (esposizione alla luce solare, inquinamento ambientale, stile di vita ed abitudini come il fumo) può esacerbare l'attività di diversi enzimi, come la tirosinasi, che è il principale enzima coinvolto nella sintesi della melanina. Queste macchie scure causate da un aumento dell'esposizione agli UV, compaiono maggiormente nelle zone del corpo scoperte e quindi maggiormente esposte, come faccia e mani, il che le rende ancora più evidenti.

La chimica medica e cosmetica ha identificato diversi composti che hanno attività contro la iperpigmentazione cutanea ed il mercato globale degli schiarenti è in costante crescita. Un prodotto che manifesti la capacità di ridurre la produzione di melanina *in vitro* è un buon candidato "depigmentante" *in vivo*, potenzialmente in grado di ridurre le macchie dovute ad iperpigmentazione della pelle.



INTRODUCTION

The human epidermal melanocyte is a highly specialized pigmented cell that serves to protect the epidermis from ultraviolet (UV) damage through the production of melanin, or melanogenesis. Along with melanocytes, the epidermis is primarily composed of keratinocytes, which make up 95 % of the epidermal constitution. Because keratinocytes progressively move towards the outermost surface of the skin as they differentiate, their nuclei are consistently exposed to high levels of UV radiation; therefore, the DNA in these cells requires protection so as to ensure the integrity of the cell. Melanin, the protectant, is transferred to surrounding keratinocyte cells via the melanocyte dendrites in response to UV radiation. Positioned above the nuclei of keratinocytes, melanin granules function to absorb harmful UV-radiation before it can reach the keratinocyte nucleus and damage the DNA within.

*Hyperpigmentation disorders constitute important medical and aesthetical conditions. When melanin is aberrantly regulated in human skin, diseases including vitiligo and melasma can occur. Vitiligo, the world's most prevalent pigmentary disorder, occurs in 0.1–2 % of the world's population and is characterized by the loss of functioning melanocytes within the epidermis, which manifests itself as white patches on the skin. On the other hand the abnormal accumulation of melanin can lead to melasma, ephelides (freckles) and lentigo. The appearance of dark areas and dark spots can also be a consequence of normal skin aging process: the accumulation of reactive oxygen species (ROS) due both to normal metabolism and to extrinsic factors (sunlight exposure, environmental pollution, modern lifestyle habits such as smoking) exacerbate several enzyme's activity, such as tyrosinase, which is the principal enzyme in the melanogenesis process. These dark areas and dark spots, due to increased exposure to UV radiation, appear mostly on that part of the human body that are normally uncovered, such as face and hands, which make them even more visible. Medicinal and cosmetic chemistry have identified multiple chemical compounds which show activity against skin hyperpigmentation and the global market for skin lighteners is steadily growing. If a tested product is able to reduce the melanin production *in vitro*, it is also a good "depigmenting" candidate *in vivo*, potentially able to reduce the spots due to hyperpigmentation of the skin.*



SCOPO

Scopo del test è valutare se il prodotto testato possiede attività depigmentante *in vitro* su colture cellulari di melanociti mediante la valutazione della sintesi di melanina. Si ritiene che tale capacità renda il prodotto un potenziale candidato "depigmentante" *in vivo*, potenzialmente in grado di ridurre le macchie dovute ad iperpigmentazione della pelle

AIM

The aim of the test is to assess if the tested product possesses depigmenting activity in vitro in melanocytes cell cultures by evaluating the synthesis of melanin. It is believed that this ability makes the product a potential "depigmenting" candidate in vivo potentially able to reduce the spots due to hyperpigmentation of the skin.



MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il test è stato condotto su cellule di melanoma murino (B16), una linea ben conosciuta e comunemente utilizzata negli studi di melanogenesi. Le cellule sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contenente 2 mM glutamina, 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di antibiotici (penicillina e streptomicina) ed incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

The test was performed on mouse melanoma cells (B16), a well known cell line commonly used in the studies of melanogenesis. Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato

Tested sample

SL530225 DERMABIANCA - MASCHERA-GEL SCHIARENTE UNIFORMANTE ANTI-MACCHIE AGLI AHA

INCI

Aqua [Water]**, Aloe barbadensis leaf juice (*), Punica granatum fruit extract (*), Glycerin (*), Niacinamide**, Xanthan gum**, Magnesium aluminum silicate**, Pyrus malus (Apple) fruit extract**, Tartaric acid**, Mother of pearl**, Citrus limonum (Lemon) peel extract**, Beta-sitosterol**, Hydrolyzed grape fruit**, Citric acid**, Menthyl lactate**, Centaurium erythraea extract (*), Escin**, Calluna vulgaris extract (*), Hydrolyzed wheat bran**, Polyglyceryl-10 caprylate/caprates**, Verbena officinalis extract (*), Viola tricolor extract (*), Tocopherol**, Rosa canina fruit extract (*), Phosphatidylcholine**, Sodium gluconate**, Sodium salicylate**, Parfum [Fragrance], Tin oxide**, Ethylhexylglycerin, Benzyl salicylate**, Synthetic fluorophlogopite, Hexyl cinnamal**, Titanium dioxide**, Benzyl alcohol**.

* da Agricoltura Biologica/ from Organic Farming tot. 31%

**Ingredienti di origine naturale totali tot. 98%



Valutazione preliminare della vitalità cellulare

Prima del test depigmentante è stato condotto un saggio di vitalità cellulare, allo scopo di stabilire se il prodotto testato abbia un effetto negativo sulle cellule e per scegliere le concentrazioni su cui eseguire il dosaggio della melanina. Questo passaggio è importante per distinguere tra un'inibizione della melanogenesi ed un effetto tossico. La vitalità cellulare è stata valutata mediante test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], un composto tetrazolico di colore giallo che viene ridotto dalle cellule in formazano di colore viola. Questa conversione è causata dal NADPH o dal NADH prodotto dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state trattate con MTT (1 mg/ml) ed incubate per 3 ore a condizioni standard. Al termine di questo periodo la soluzione di MTT è stata eliminata ed in ciascuno pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di isopropanolo per sciogliere i cristalli di formazano formati. L'assorbanza (densità ottica, OD) è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Dosaggio della melanina

Le cellule B16 sono state trattate con le concentrazioni prestabilite del prodotto da testare e del controllo positivo (CQ, una sostanza dalle note azioni depigmentanti). Cellule non trattate rappresentano il controllo negativo. Per l'analisi del contenuto di melanina, le cellule sono state raccolte e lisate. La melanina è stata quantificata spettrofotometricamente a 490 nm ed i valori interpolati in una curva standard di melanina sintetica. Le concentrazioni di melanina sono state espresse come µg/ml di melanina in 10⁶ cellule. Appena prima della lisi cellulare, i melanociti sono stati osservati e fotografati con microscopio in campo chiaro.

Preliminary evaluation of cell viability

A cell viability assay prior to depigmenting test was performed in order to assess the potential negative effect of the tested product on cells and to choose the concentrations to use for the analysis of melanin content. This is important for distinguishing between an inhibition of the melanogenesis pathway and a toxic effect. The cell viability was evaluated through a MTT test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], a yellow compound that is bio-reduced by cells into a purple colored formazan product. This conversion is presumably accomplished by NADPH or NADH produced by dehydrogenase enzymes in metabolically active cells. The cells were treated with MTT (1 mg/ml) and incubated for 3 hours at standard culture conditions. After this period, the solution of MTT was discarded and 100 µl of isopropanol were added in each well in order to dissolve the formazan crystals. The absorbance (optical density, OD) was determined spectrophotometrically at 540 nm wavelength.

Melanin assay

B16 cells were treated with the chosen concentrations of the tested product and the positive control (CQ, a well known depigmenting drug). Cells not treated with the sample are the negative controls. For the analysis of melanin content, cells were harvested and lysated. Melanin was quantified by absolute absorbance at 490 nm in a plate reader and the values interpolated in a standard curve of synthetic melanin. Melanin concentrations were expressed as µg/ml of melanin per 10⁶ cells. Just before cells lysis, melanocytes were observed and photos were taken at bright field microscope.

RISULTATI

RESULTS

Valutazione preliminare della vitalità cellulare

Preliminary evaluation of cell viability

	CAMPIONE / <i>SAMPLE</i> (mg/ml)							
	0,039	0,078	0,1563	0,3125	0,625	1,25	2,5	5,0
Vitalità cellulare % <i>% of cells viability</i>	107,0	107,4	104,1	106,1	113,1	115,1	115,8	131,8

L'assorbanza misurata a 540 nm è proporzionale alla vitalità cellulare. Le percentuali sono state calcolate in base ai valori di assorbanza a 540 nm e considerando come 100% l'assorbanza del controllo negativo (cellule non trattate)

The absorbance measured at 540 nm is proportional to cell viability. Percentages were calculated based on the absorbance values at 540 nm and taking as 100% the absorbance of the negative control (untreated cells)

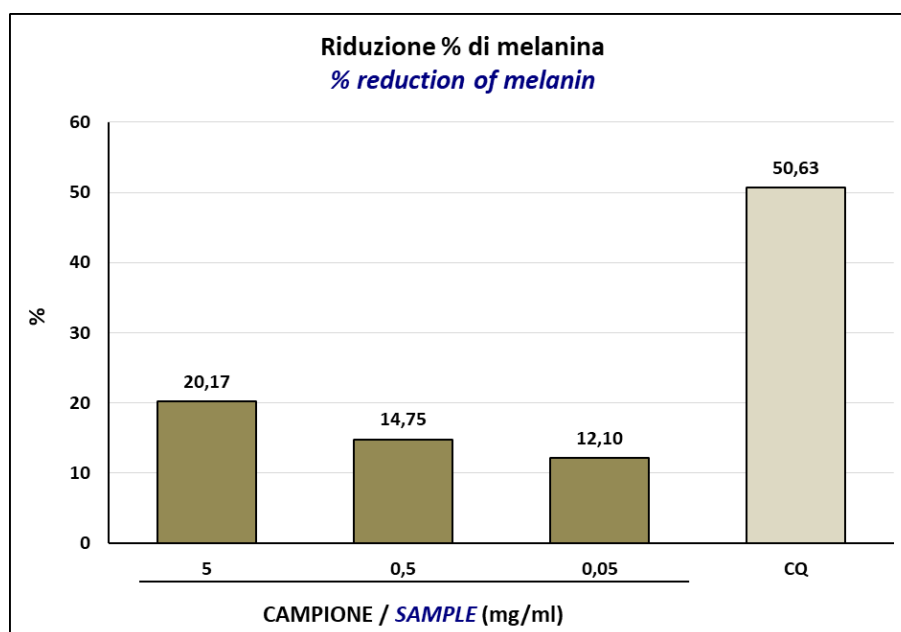
La vitalità cellulare dei melanociti trattati con il prodotto risulta paragonabile a quella dei melanociti non trattati per tutte le concentrazioni testate. Si è scelto di eseguire il dosaggio della melanina considerando le concentrazioni di 5,0, 0,5 e 0,05 mg/ml

The cell viability of melanocytes treated with the tested product is comparable to the one of untreated melanocytes for all tested concentrations. We have chosen to perform the dosage of melanin taking into consideration the concentrations of 5.0, 0.5 and 0.05 mg/ml

Dosaggio della melanina

Dosage of melanin

	CAMPIONE / <i>SAMPLE</i> (mg/ml)			Controllo <i>Control</i>	CQ
	5,0	0,5	0,05		
Melanina / <i>Melanin</i> (µg/ml)	156,708	167,333	172,542	196,292	96,917
Riduzione % di melanina <i>% reduction of melanin</i>	20,166	14,753	12,099	0,000	50,626



L'assorbanza misurata a 490 nm è direttamente proporzionale alla quantità di melanina estratta dalle cellule. I valori sono stati interpolati con una curva standard di melanina sintetica ed i risultati espressi come µg/ml di melanina ogni 10⁶ cellule.

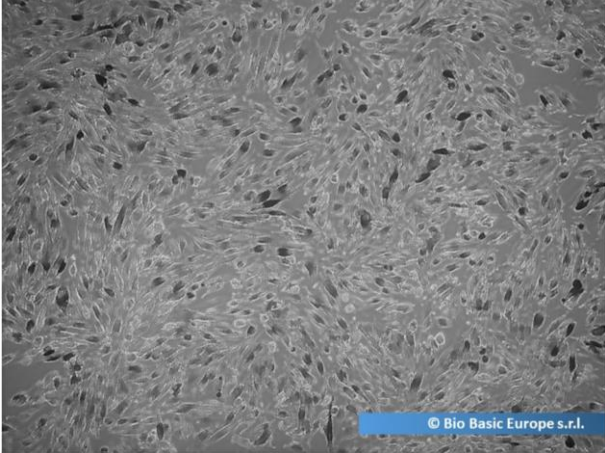
The absorbance measured at 490 nm is directly proportional to the quantity of melanin extracted from cells. The values were interpolated in a standard curve of synthetic melanin and the results expressed as µg/ml of melanin per 10⁶ cells.

Il campione è in grado di inibire significativamente la produzione di melanina alle concentrazioni testate di 5.0, 0.5 e 0.05 mg/ml

The sample is able to significantly inhibit the production of melanin at tested concentrations of 5.0, 0.5 and 0.05 mg/ml

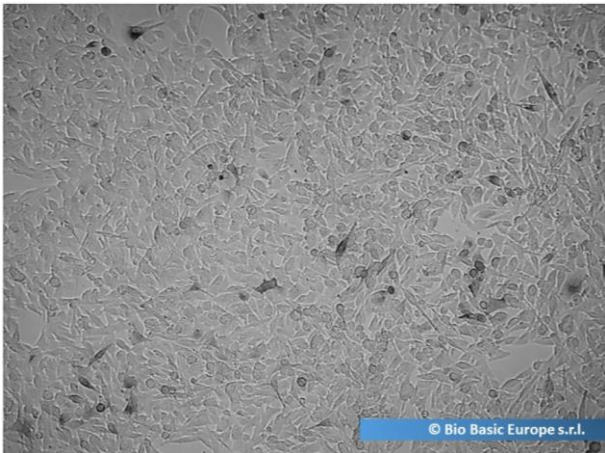
Fotografie al microscopio in campo chiaro *Bright-field microscope photos*

Controllo negativo (cellule non trattate) / *Negative control (not treated cells)*



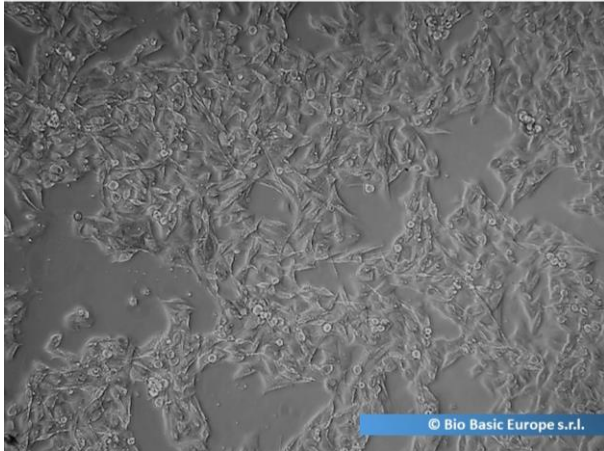
I melanociti appaiono scuri per la presenza al loro interno di numerosi melanosomi contenenti il pigmento melanina
Melanocytes appear dark due to the presence of several melanosomes containing melanin pigment

Controllo positivo (CQ) / *Negative control (CQ)*



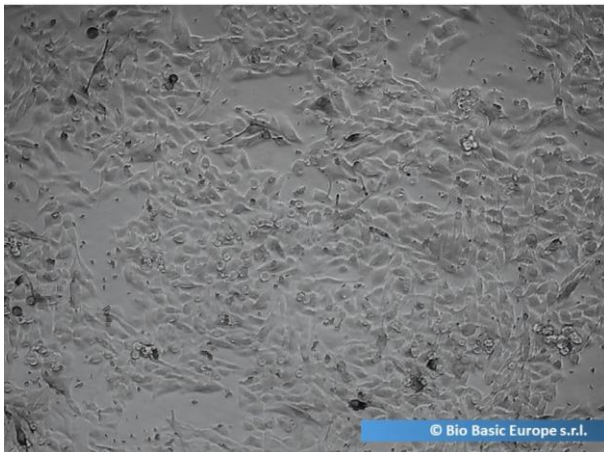
I melanociti appaiono chiari per la forte riduzione di produzione di melanina
Melanocytes appear clear for the strong reduction of production of melanin

Prodotto testato 5.0 mg/ml / *Tested product 5.0 mg/ml*



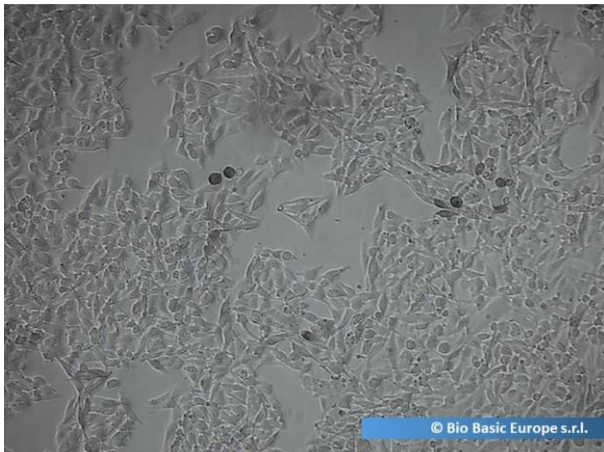
I melanociti appaiono più chiari rispetto al controllo negativo per la riduzione di produzione di melanina
Melanocytes appear more clear than negative control for the reduction of production of melanin

Prodotto testato 0.5 mg/ml / *Tested product 0.5 mg/ml*



I melanociti appaiono più chiari rispetto al controllo negativo per la riduzione di produzione di melanina
Melanocytes appear more clear than negative control for the reduction of production of melanin

Prodotto testato 0.05 mg/ml / *Tested product 0.05 mg/ml*



I melanociti appaiono più chiari rispetto al controllo negativo per la riduzione di produzione di melanina
Melanocytes appear more clear than negative control for the reduction of production of melanin

CONCLUSIONI

Il campione denominato
**3SL530225 DERMABIANCA - MASCHERA-GEL SCHIARENTE UNIFORMANTE
ANTI-MACCHIE AGLI AHA**

possiede attività depigmentante *in vitro*

Il prodotto testato riduce la produzione di melanina in colture cellulari di melanociti
alle concentrazioni testate di 5.0, 0.5 e 0.05 mg/ml

CONCLUSIONS

The sample called
**3SL530225 DERMABIANCA - MASCHERA-GEL SCHIARENTE UNIFORMANTE
ANTI-MACCHIE AGLI AHA**

has depigmenting activity in vitro

*The tested product reduces the production of melanin in melanocytes cell cultures
at tested concentrations of 5.0, 0.5 e 0.05 mg/ml*



Il presente Rapporto di Prova è firmato digitalmente ai sensi della normativa vigente
This test report is digitally signed according to current legislation



BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- Boissy RE, Nordlund JJ. Vitiligo: current medical and scientific understanding. *G Ital Dermatol Venereol* 2011; 146:69–75
- Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation—approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech* 2008; 5: e189–e199
- Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 2008; 84:539–549
- Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007; 21(4): 976-94
- Grimes P, Nordlund JJ, Pandya AG, Taylor S, Rendon M, Ortonne JP. Increasing our understanding of pigmentary disorders. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54 :S255–S261
- Gunia-Krzyżak A1, Popiol J, Marona H. Melanogenesis Inhibitors: Strategies for Searching for and Evaluation of Active Compounds. *Curr Med Chem*. 2016; 23(31): 3548-3574
- Hopkin AS, Paterson EK, Ruiz R, Ganesan AK. Pigment Production Analysis in Human Melanoma Cells. *Methods Mol Biol*. 2016 DOI: 10.1007/7651_2016_359
- Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(9): 1493-506
- Pedrosa TD, Barros AO, Nogueira JR, Fruet AC, Rodrigues IC, Calcagno DQ, Smith MA, de Souza TP, Barros SB, de Vasconcellos MC, Silva FM, Koolen HH, Maria-Engler SS, Lima ES. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. *Arch Dermatol Res*. 2016; 308(9): 643-654
- Pillaiyar T, Manickam M, Jung SH. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discov Today*. 2016 Sep 28. pii: S1359-6446(16)30340-3.
- Poletini MO, de Assis LV, Moraes MN, Castrucci AM. Estradiol differently affects melanin synthesis of malignant and normal melanocytes: a relationship with clock and clock-controlled genes. *Mol Cell Biochem*. 2016; 421(1-2): 29-39
- Popoola OK, Marnewick JL, Rautenbach F, Ameer F, Iwuoha EI, Hussein AA. Inhibition of Oxidative Stress and Skin Aging-Related Enzymes by Prenylated Chalcones and Other Flavonoids from *Helichrysum teretifolium*. *Molecules*. 2015; 20(4): 7143-55
- Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis— controversies and new concepts. *Exp Dermatol* 2008; 17:395–404
- Wicks NL, Chan JW, Najera JA, Ciriello JM, Oancea E. UVA phototransduction drives early melanin synthesis in human melanocytes. *Curr Biol*. 2011; 21(22): 1906-11
- Yaghoobi R, Omidian M, Bagherani N. Vitiligo: a review of the published work. *J Dermatol* 2011; 38: 419–431