

Trabajo Fin de Máster

Diseño racional automatizado de productos dermatológicos para enfermedades inflamatorias de la piel

Autor: Martín Garrido Rodríguez-Córdoba

Máster en Investigación Biomédica Traslacional

Universidad de Córdoba. Instituto de Estudios de Postgrado

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)



Universidad de Córdoba

Instituto de Estudios de Postgrado

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba

Master en Investigación Biomédica Traslacional

Trabajo Fin de Máster

**Diseño racional automatizado de productos dermatológicos
para enfermedades inflamatorias de la piel**

Autor: Martín Garrido Rodríguez-Córdoba

Tutor de la entidad colaboradora: Noel García Medel

Tutor del centro: Eduardo Muñoz Blanco

Tribunal:

Presidente

Vocal

Secretario

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

CALIFICACIÓN:

FECHA:

Universidad de Córdoba

Este Trabajo Fin de Máster ha sido realizado dentro del I Plan Propio Galileo de Innovación y Transferencia de la Universidad de Córdoba bajo la modalidad V: Semillero de Emprendedores – Becas de especialización: TFM en empresas.

Entidad colaboradora: SimCosmetic Biotech S.L



Trabajo Fin de Máster

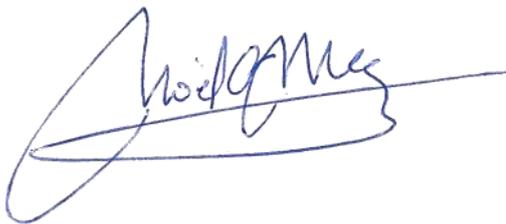
Diseño racional automatizado de productos dermatológicos para enfermedades inflamatorias de la piel

Autor: Martín Garrido Rodríguez-Córdoba

Tutor de la entidad colaboradora: Noel García Medel

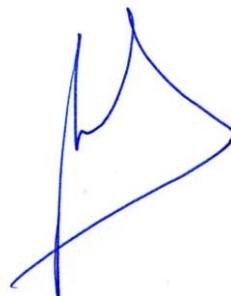
Tutor del centro: Eduardo Muñoz Blanco

Tutor de la entidad
colaboradora



Fdo.: Noel García Medel

Tutor del centro



Fdo.: Eduardo Muñoz Blanco

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Psoriasis	3
Dermatitis atópica	4
Aspectos diferenciales entre psoriasis y dermatitis atópica	6
Modelos experimentales vinculados a psoriasis	7
Modelos experimentales vinculados a dermatitis atópica	9
Gestión informática de resultados experimentales: LIMS (<i>Laboratory Information Management System</i>)	12
Modelos computacionales.....	12
Diseño racional de productos dermatológicos y dermocosméticos	13
Objetivos	15
Materiales y métodos	16
Datos biológicos.....	16
LIMS (<i>Laboratory Information Management System</i>)	17
Actualización del motor de búsqueda	18
Resultados	23
LIMS	23
Optimización del motor de búsqueda.....	23
Combinación de compuestos para el cuidado de la psoriasis	29
Combinación de compuestos para el cuidado de la dermatitis atópica	30
Discusión	32
Asociaciones Modelo Experimental/Aplicación Dermatológica	32
Actualización del motor de búsqueda de INCOS®	35
Casos prácticos de aplicación de la nueva versión de INCOS®	37
Potencial de INCOS® en futuros desarrollos	37
Conclusiones	39
Bibliografía	40

Resumen

La psoriasis y la dermatitis atópica son las enfermedades inflamatorias de la piel con mayor incidencia a nivel mundial. Sin embargo, las aproximaciones terapéuticas disponibles se limitan al control de brotes agudos mediante antiinflamatorios de la familia de los corticoides o inhibidores de la calcineurina. En los resultados de este trabajo, se han diseñado dos productos, para su uso frecuente con carácter preventivo en el cuidado de la piel afectada por estas enfermedades, basados en la combinación de extractos botánicos y principios activos aprobados para su uso directo sobre la piel.

La entidad colaboradora dispone de una librería de más de 200 ingredientes activos, cuya aplicabilidad se ha caracterizado mediante la plataforma de análisis multiparamétrico **SimDerma**[®], desarrollada por la empresa, que contiene múltiples dianas biológicas de interés en dermatología y dermocosmética. Para el óptimo aprovechamiento de la información proporcionada por la plataforma de análisis, la empresa desarrolló además la herramienta de gestión informática **INCOS**[®], destinada al diseño racional de combinaciones de compuestos activos orientadas a indicaciones dermatológicas específicas en base a los resultados de **SimDerma**[®].

En el presente trabajo se ha desarrollado un LIMS (*Laboratory Information Management System*), que facilita el almacenamiento de la información proporcionada por la plataforma **SimDerma**[®] y su uso por la herramienta **INCOS**[®]. Así mismo, se ha creado y validado una versión actualizada del motor de búsqueda empleado por **INCOS**[®], que posteriormente se ha aplicado en la creación de los productos para psoriasis y dermatitis atópica.

Introducción

Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad crónica de carácter inflamatorio y origen probablemente autoinmune¹ cuya epidemiología varía en función de la edad y la localización geográfica, con una incidencia media del 2-4% en la población occidental². Los estudios publicados sobre psoriasis, generalmente se refieren a la variante *Psoriasis vulgaris*, con una prevalencia del 85-90% entre los individuos afectados por esta patología³.

Esta variante de la enfermedad presenta lesiones características en forma de placas eritematosas cuyo tamaño puede variar desde pequeñas placas en regiones localizadas hasta otras capaces de cubrir casi toda la superficie corporal. Además de este tipo de lesiones, la enfermedad cursa en la mayoría de los afectados con un cuadro de dolor y escozor, asociado principalmente al trasfondo inflamatorio característico¹.

Los factores desencadenantes de la enfermedad pueden variar en cada caso y dependen de la predisposición genética y de factores ambientales.

Respecto al componente genético, el locus que mayor asociación presenta con la enfermedad es PSORS1, localizado en el brazo corto del cromosoma 6, concretamente en la región 6p21.3. A pesar de que las mutaciones en genes de este locus son las de mayor tasa de heredabilidad, otras mutaciones que afectan a componentes del sistema inmune innato o adaptativo y a la pérdida de función de la barrera epitelial se han asociado a diferentes estados de la enfermedad⁴.

Los factores ambientales varían desde algunos tan objetivos como pueden ser aquellos que comprometan la función de la barrera epitelial (como los tatuajes), factores químicos (como exposición a litio), hasta factores más subjetivos (como el estrés)⁵.

En cuanto a la patogénesis de la enfermedad, se ha propuesto que se trata de un desorden autoinmune con un marcado componente inflamatorio, caracterizado por una serie de interacciones complejas entre componentes la inmunidad innata y adaptativa, los cuales constituyen las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad¹.

Los puntos clave de su inmunopatogénesis son:

- El reclutamiento de células dendríticas y linfocitos Th17 por los queratinocitos a través de la liberación de complejos DNA-LL37 o CCL20 como consecuencia de alguna alteración epitelial⁶.
- Activación de linfocitos Th17 con la liberación de IL-23, TNF- α e IFN- α ¹.
- Producción de IL-17, IL-22 e IFN- γ por los linfocitos Th17 activados⁷.
- Activación de múltiples componentes del sistema inmune innato (macrófagos, mastocitos, granulocitos) y adaptativo (principalmente por diferenciación Th1 y Th17) como consecuencia de esta activación de linfocitos Th17¹.
- Multiplicación de la respuesta inflamatoria y aparición de eventos propios de la psoriasis como la hiperproliferación de queratinocitos basales, la activación de terminaciones nerviosas cutáneas y la hiper-queratosis³.

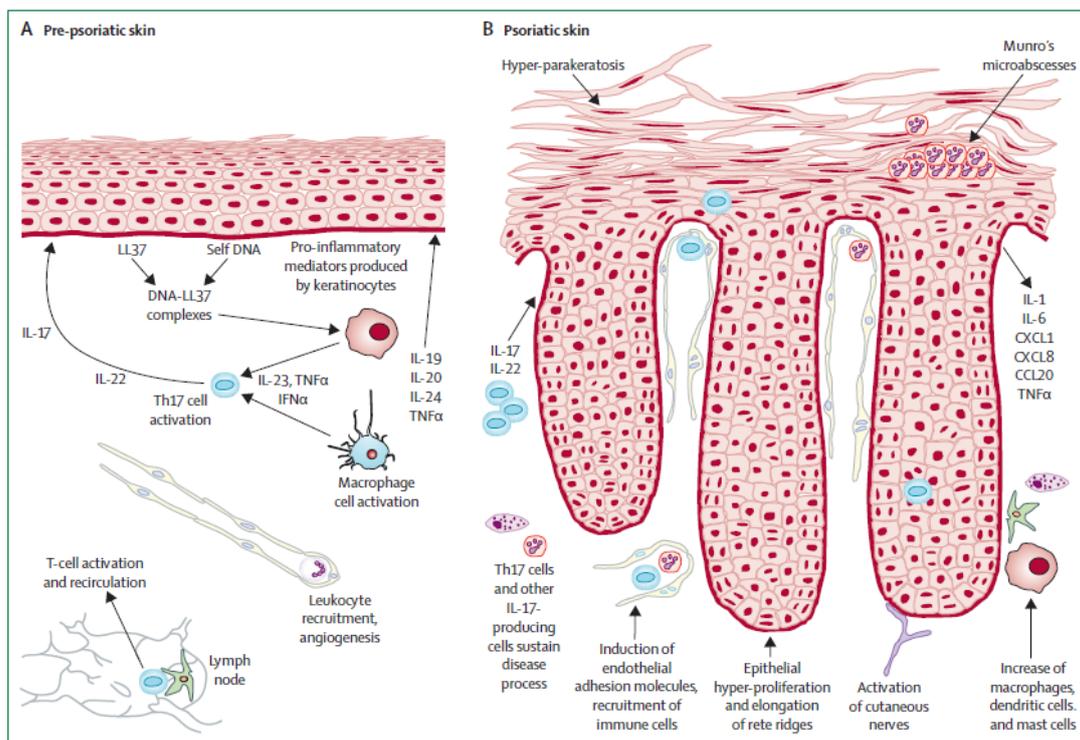


Figura 1. Figura 3 de Boehncke et al ¹ sobre la Inmunopatogenia de la psoriasis.

Dermatitis atópica

La dermatitis atópica es la enfermedad inflamatoria de la piel más común a nivel mundial. Su prevalencia ha aumentado de manera significativa en los últimos años y tiene una incidencia de entre 1-3% en adultos⁸ y de un 15-20% en niños⁹. Se trata de una enfermedad con un impacto socioeconómico muy alto, habiéndose realizado

estudios que demuestran que el coste que genera esta enfermedad a un país como EEUU asciende a los 3.8 billones de dólares por año¹⁰.

La patogénesis de la enfermedad no se ha caracterizado aún, aunque se sabe que hay factores involucrados tanto de carácter genético como de carácter ambiental. Hace unos años existían dos hipótesis alternativas^{11,12}:

- *Outside-inside*: Que defiende que un fallo de la barrera epidérmica es la causa primaria y un pre-requisito para que se produzca la reacción inmune inflamatoria que caracteriza la enfermedad.
- *Inside-outside*: Que propone que la dermatitis atópica aparece a raíz de una reacción inmune primaria que deriva en un fallo de barrera epidérmica.

Sin embargo, la teoría más aceptada actualmente, denominada hipótesis *outside-inside-outside*, propone una combinación de ambos mecanismos como desencadenante del proceso^{13,14}. Esta hipótesis, considera un origen multifactorial de la enfermedad, donde estarían implicados varios componentes moleculares, procesos inmunes y microorganismos.

Un factor genético considerado de alta relevancia es el polimorfismo en el gen codificante para filagrina^{15,16}, una proteína muy importante para la barrera epidérmica que funciona previniendo la pérdida de agua de la piel y la intrusión de patógenos microbianos y agentes irritantes¹⁷. Esta molécula, y los productos de su degradación, se encuentran estrechamente asociados con el status de la barrera epidérmica¹⁸ y por lo tanto, las mutaciones que alteren sus niveles de traducción normales o su funcionalidad serían potenciales desencadenantes de la enfermedad según la teoría *outside-inside-outside*. Existen varios estudios que han asociado la disminución de la producción de filagrina con la dermatitis atópica^{18,19}.

La filagrina se genera por escisión proteolítica de profilagrina, una molécula cuya secuencia contiene un número variable, entre 9-13, de copias de filagrina²⁰. Hay una alta prevalencia de dermatitis atópica en individuos que presentan variantes de menos de 11 copias de filagrina en el gen de profilagrina^{15,19}.

La alteración de la barrera epidérmica facilita la entrada de un amplio rango de alérgenos y agentes irritantes. La presencia de estos agentes externos en el tejido provoca una respuesta inflamatoria caracterizada por altos niveles de inmunoglobulina

E (IgE)¹¹ y una polarización de la respuesta linfocitaria hacia la subpoblación Th2 mediada por células de Langerhans²¹.

La activación de la respuesta inmune adaptativa (mediada principalmente por los Th2 y los Th17)²² y de componentes de la respuesta inmune innata (basófilos, eosinófilos y mastocitos) cierran el bucle iniciado por un defecto en la barrera epidérmica que acaba produciendo los síntomas que la agravan¹³.

Aspectos diferenciales entre psoriasis y dermatitis atópica

Ambas enfermedades tienen cierta similitud, ya que son patologías complejas de la piel que se desencadenan debido a una combinación de factores genéticos y ambientales, tienen un componente inflamatorio muy importante y la proliferación/diferenciación normal de los queratinocitos que conforman la epidermis se encuentra alterada²³. Sin embargo, existe una serie de aspectos diferenciales entre estas patologías que aparecen representados en la tabla que se muestra a continuación elaborada por Guttman-Yassky y su grupo en 2011²³:

AD	Psoriasis
A. Clinical features	
85% onset before age 5 y	Onset in adolescence or early adulthood common
Common association with asthma/atopy	Not associated with asthma/atopy
Oozing, "wet" skin lesions in acute stage, with crusting and serous exudate	Dry lesions
Not well demarcated from uninvolved skin	Sharply demarcated stable plaques
Face and flexors usually affected	Scalp and extensors (knees and elbows) often involved
Fine white scale (adherent)	Thick, silvery-white scale (nonadherent)
Prominent itch with excoriations	Rarely itchy
Lichenification evident in chronic stage from itch-scratch cycle	Very thick plaques caused by heavy scale accumulation
Pink to dull-red plaques	Bright-red plaques
Frequent impetiginization	Impetigo not evident
Viral dissemination common (eczema herpeticum)	No risk for viral dissemination
B. Histology	
Barrier defect: decreased cornification, decreased expression of terminal differentiation proteins, decreased lipids	Increased cornification, increased expression of terminal differentiation proteins, decreased lipids in intracellular space of SC
Spongiosis and vesicle formation in acute/subacute stages	No spongiosis seen, small pustules, Kogoj and Munro microabscesses
No neutrophils in epidermis	Accumulation of neutrophils in epidermis
Increased eosinophil and mast cell numbers in dermis	No eosinophils and mast cells
Orthokeratosis is typical	Parakeratosis is prominent and might be confluent
Hypogranulosis, sometimes absent granular layer	Hypogranulosis, granular layer might be completely absent with confluent parakeratosis
Rare thinning of suprapapillary plates	Thinning of suprapapillary plates
Few blood vessels in dermal papillae	Dilated tortuous vessels in dermal papillae
Evidence of vasodilation but no angiogenesis	Vasodilation and angiogenesis well documented
High frequency of bacterial colonization	Low frequency of bacterial colonization
C. Lesional immune infiltrates	
T _H 2/"T22" polarization (Tc22>Th22); lower T _H 1 component in chronic disease	T _H 1/T _H 17 polarization with T _H 22 present
Attenuated T _H 17 pathway	Increased T _H 17 pathway
Reduced antimicrobial axis	Increased production of antimicrobial agents
Inflammatory DCs in dermis > epidermis producing CCL17, CCL18, and CCL22	Inducible nitric oxide synthase, TNF-α, and IL-23 producing inflammatory DCs in dermis
D. Leukocytes in circulation	
T _H 2 > T _H 1 and T _H 17	Increased T _H 1, T _H 17 and T _H 22
Increased IgE levels and eosinophil numbers in circulation	Normal IgE levels and eosinophil numbers
IgE autoantibodies correlated with disease activity	Autoantibodies uncommon

Tabla 1. Tabla 1 de Guttman-Yassky et al.²³ Diferencias entre psoriasis y dermatitis atópica

Modelos experimentales vinculados a psoriasis

Para el diseño de combinaciones de compuestos activos orientadas al cuidado de la piel de pacientes de psoriasis, en base a la información proporcionada por la plataforma de **SimDerma**[®] (de la entidad colaboradora), es necesario establecer una asociación entre los resultados experimentales y efectos potencialmente beneficiosos frente a esta afección. Se presenta a continuación un grupo de actividades incluidas en modelos experimentales de la plataforma y vinculadas a la corrección de los procesos patológicos característicos de la psoriasis.

Inhibición de NF-κB en queratinocitos

NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*) es un factor de transcripción central en procesos autoinmunes e hiperproliferativos como la psoriasis, donde ha demostrado ser uno de los complejos proteicos más relevantes en el desarrollo de la enfermedad^{24,25}. La translocación de NF-κB al núcleo promueve la transcripción de un grupo de citoquinas asociadas al proceso inflamatorio en psoriasis. Así mismo, se ha demostrado que uno de los miRNA que se genera como consecuencia de su translocación al núcleo promueve la hiperplasia psoriásica²⁶.

Así, el bloqueo de la translocación de NF-κB al núcleo o bien la inhibición terapéutica de su expresión resultaría beneficiosa frente a esta enfermedad²⁷.

Inhibición de STAT3

STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de factores de transcripción STATs. Su expresión se encuentra elevada bajo los efectos de la psoriasis debido a la alta actividad de linfocitos Th17²⁸. Además, se ha descubierto que, cuando se encuentra activado de forma constitutiva en ratones transgénicos, promueve la formación placas eritematosas que recuerdan a las formadas en psoriasis²⁹.

Existen varios estudios centrados en STAT3 como diana terapéutica para psoriasis donde los resultados obtenidos tras el tratamiento con inhibidores de este factor son bastante prometedores^{30,27}.

Actividad PPARα y PPARγ

Los receptores PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) son un grupo de factores de transcripción activados por ligando que forman parte de los receptores

hormonales nucleares³¹. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes que median procesos como la apoptosis o la proliferación y se encuentran estrechamente relacionados con la respuesta inflamatoria. Recientemente, se ha propuesto que los agonistas de estos factores de transcripción (específicamente de PPAR α y PPAR γ) suponen una aproximación terapéutica muy importante para el tratamiento de problemas dermatológicos³².

La activación farmacológica de PPAR γ mediante troglitazona administrada por vía oral es capaz de paliar los efectos de la psoriasis en estadios severos, si bien puede presentar algunos efectos secundarios³³. Sin embargo, el uso tópico de tiazolidinedionas, familia que engloba a la troglitazona y la rosiglitazona, no mejora el curso de la enfermedad³⁴. Por su parte el agonista de PPAR γ GED-0507-34L, aplicado de forma tópica, obtuvo buenos resultados en un ensayo clínico en 2013, probablemente gracias a la acción antiinflamatoria mediada por el bloqueo de la ruta de NF- κ B³⁵.

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo empleando un modelo de ratón desnudo con hiperproliferación inducida de queratinocitos, la aplicación tópica del agonista de PPAR α clofibrato ha demostrado una alta eficacia en la restauración de la homeostasis del tejido³⁶.

Antagonismo de TRPV-1

El receptor TRPV-1, perteneciente a la familia TRP (*Transient Receptor Potential Cation Channel*), es un canal catiónico no selectivo que forma parte del sistema nociceptor cutáneo³⁷. Su apertura puede producirse en respuesta a factores físicos o químicos, funcionando como sensor de temperatura (>42 °C)^{37,38}, pHs extremos³⁹ o determinados metabolitos como la capsaicina, presente en los alimentos picantes⁴⁰. Se expresa en neuronas sensoriales, donde está involucrado en los procesos fisiológicos que desencadenan la sensación de dolor⁴¹.

La presencia de mediadores proinflamatorios en el tejido puede tener un efecto sensibilizador sobre este tipo de receptores, desencadenando una sensación de dolor asociada a la inflamación⁴². En particular, se ha descubierto que los elementos del sistema nociceptor (como TRPV-1) regulan la vía inflamatoria IL-23/IL-17 interactuando con las células dendríticas y controlan la respuesta inmune cutánea en procesos inflamatorios psoriasiformes⁴³.

Así, TRPV-1 constituye una diana de potencial interés para el desarrollo de nuevas aproximaciones para el cuidado de la piel afectada por psoriasis. Actualmente existe un ensayo clínico en segunda fase para el tratamiento del picor en psoriasis basado en la inhibición farmacológica de trkA, receptor que incrementa la expresión y sensibilidad de TRPV-1⁴⁴.

Autofagia en queratinocitos

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado en eucariotas, en el cual los componentes celulares deteriorados y aberrantes se incluyen en vesículas y se transportan a los lisosomas para su degradación y posible reciclado. Se ha demostrado que este proceso se produce de forma constitutiva durante la diferenciación epidérmica⁴⁵.

Determinados polimorfismos en los genes que codifican proteínas responsables de este proceso (como ATG16L1) se han asociado con la predisposición a sufrir psoriasis⁴⁶. Se ha propuesto que esto se debe a que el proceso de autofagia regula negativamente la respuesta inflamatoria en queratinocitos⁴⁷. Por ello, la activación de la autofagia en los queratinocitos podría resultar beneficiosa para una patología de marcado carácter inflamatorio como la psoriasis.

Actividades contraproducentes e incompatibles

Dado que la apertura de canales TRPV-1 es responsable de la sensación de picor, habiéndose incluido el bloqueo del receptor como actividad diana para psoriasis, es inmediato deducir que el efecto antagónico frente a TRPV-1 es una actividad contraproducente. Sin embargo, puesto que los modelos de activación y bloqueo de TRPV-1 son experimentos independientes, en la práctica, se han encontrado analitos que dan positivo en ambos ensayos, probablemente debido a motivos operacionales, donde una de las actividades era claramente predominante. Por este motivo, se ha asociado negativamente la actividad agonista frente al canal TRPV-1 con psoriasis.

Modelos experimentales vinculados a dermatitis atópica

Inhibición de NF- κ B en queratinocitos

Al igual que en el apartado anterior, siendo NF- κ B uno de los factores de transcripción responsables de la multiplicación de la respuesta inmune/inflamatoria, cabría esperar

que en dermatitis atópica, donde existe también un importante componente inflamatorio, la inhibición terapéutica de su actividad resulte beneficiosa.

Efectivamente, se ha demostrado que compuestos capaces de regular negativamente la señalización por NF- κ B resultan beneficiosos en el tratamiento de esta enfermedad^{48,49}.

Actividad PPAR α y PPAR γ

Como se ha explicado en el apartado anterior, la actividad agonística frente a receptores PPAR supone un nuevo frente a la hora de tratar patologías de la piel como la dermatitis atópica³².

En dermatitis atópica se han llevado a cabo estudios retrospectivos mediante tratamiento oral con el agonista de PPAR γ rosiglitazona, habiéndose obtenido una buena respuesta frente a la enfermedad, mientras que solamente se observaron efectos adversos en uno de los pacientes tratados⁵⁰. Por otra parte, se ha demostrado que los agonistas de PPAR γ son capaces de inducir la diferenciación de queratinocitos mediante la expresión de filagrina, proceso que, como se verá más adelante, resulta ampliamente beneficioso en el tratamiento de esta enfermedad⁵¹. Sin embargo, al igual que ocurre en psoriasis, la aplicación tópica de tiazolidinedionas no mejoran el curso de la enfermedad.

En cuanto a PPAR α , múltiples estudios han demostrado que la aplicación tópica de agonistas de este factor es capaz de inducir la diferenciación de queratinocitos, mejorando la sintomatología de dermatitis atópica^{52,53}.

Agonismo de CB1

El receptor cannabinoide de tipo 1 es una proteína de la familia de receptores acoplados a proteínas G que es activado por diferentes compuestos, como los endocannabinoides, los fitocannabinoides y diferentes cannabinoides sintéticos. Se ha demostrado que la supresión del gen codificante para CB1 retrasa la correcta recuperación de la barrera epidérmica en modelos de dermatitis atópica inducida⁵⁴.

La acción anti-inflamatoria asociada al agonismo de CB1 en dermatitis atópica puede resultar de utilidad para el cuidado de la piel afectada por esta enfermedad. Diferentes estudios han demostrado que la aplicación tópica de agonistas de CB1 atenúa la respuesta inflamatoria en modelos animales de dermatitis atópica inducida mediante oxazolona^{55,56}.

Antagonismo de TRPV-1

Al igual que ocurre en psoriasis, en dermatitis atópica este canal catiónico es uno de los principales responsables de la sensación de picor debida a la reacción inflamatoria⁵⁷.

Varios trabajos han demostrado que la actividad antagonista de TRPV-1 resulta beneficiosa en dermatitis atópica, ya que además de inhibir la secreción de neuropeptidos proniflamatorios suprime la sensación de picor, evita el rascado y favorece una mejor recuperación de la barrera epidérmica^{58,59}.

Inducción de la expresión de filagrina

Como se ha explicado en la introducción, la disminución de la expresión de filagrina, o bien la existencia de variantes de profilagrina con bajo número de copias de filagrina, son la principal causa de origen genético asociada a una recuperación deficitaria de la barrera epidérmica^{15,16,19}.

De esta forma, es esperable que cualquier actividad que aumente la expresión de filagrina pueda resultar beneficiosa para el cuidado de esta enfermedad. La mayor parte de mutaciones asociadas a la enfermedad son aquellas que reducen el número de copias de filagrina dentro del producto de traducción de profilagrina⁶⁰. Sin embargo, el aumento de la expresión del gen de profilagrina podría compensar el déficit global de unidades de filagrina aumentando su cantidad total, como se observa en el caso de activadores de PPAR γ ⁵¹.

Actividades contraproducentes e incompatibles

Al igual que ocurría en psoriasis, se ha asociado negativamente la actividad agonista frente a TRPV-1 con la aplicación dermatitis atópica. Por su parte, al haber asociado de forma positiva la actividad agonista frente al receptor CB1 con el cuidado de la enfermedad, se ha de revisar el papel que juega el agonismo frente al receptor CB2 (incluido en la plataforma). Varios trabajos han demostrado que la actividad agonista frente a CB2 resulta perjudicial para la correcta formación de la barrera epidérmica⁵⁴ y que agrava el cuadro sintomático generado por la dermatitis atópica en modelos animales⁶¹. Por ello, se ha asociado el agonismo de CB2 como modelo experimental incompatible con la aplicación dermatitis atópica.

En la siguiente tabla se pueden apreciar las diferentes asociaciones que se han justificado en esta sección de la introducción:

Aplicación	Nf-kB	STAT-3	PPAR- γ activity	PPAR- α activity	CB1 agonistic activity	CB2 agonistic activity	TRPV-1 agonistic activity	TRPV-1 antagonistic activity	Autophagy in keratinocytes	Fillagrin gene induction
Psoriasis	+	+	+	+	-	-	--	+	+	-
Dermatitis atópica	+	-	+	+	+	X	--	+	-	+

Tabla 2. Asociaciones de los diferentes modelos experimentales con las aplicaciones psoriasis y dermatitis atópica. (+) Asociación positiva. (--) Asociación negativa. (X) Incompatibilidad.

Gestión informática de resultados experimentales: LIMS (*Laboratory Information Management System*)

Un LIMS es un sistema de gestión de la información de laboratorio, que permite manejar de forma eficiente los datos generados en procedimientos de carácter experimental. Estos sistemas son útiles tanto para proporcionar resultados de una manera organizada y sólida como para asegurar la calidad de los mismos. Los sistemas LIMS se sustentan en herramientas informáticas que permiten adquirir, tratar, integrar, almacenar y utilizar los diferentes tipos de información que se manejan en un laboratorio.

Los sistemas LIMS se utilizan en laboratorios concebidos como factorías productivas de información, empleando los datos generados en éstos bien para crear una base de datos, o bien para elaborar informes de resultados. Con la implantación de un LIMS se consigue un flujo de trabajo en el que la información es aprovechada inmediatamente tras su obtención, consiguiendo una optimización y mejora de las propiedades productivas.

Para gestionar la gran cantidad de información que emite la plataforma de *screening* de la entidad colaboradora, se ha desarrollado un Sistema de Gestión de la Información del Laboratorio (LIMS) con el objetivo de generar una base de datos de compuestos, información química y aplicaciones para realizar la búsqueda de combinaciones activas que constituyan el producto final.

Modelos computacionales

Un modelo computacional es, por definición, un conjunto de expresiones matemáticas que simulan cambios paramétricos que tienen lugar en un sistema físico cuya resolución, debido a su complejidad, requiere el uso de un sistema informático. En muchas ocasiones, la solución que se busca cuando se recurre a este tipo de métodos no

se puede obtener mediante un sistema de cálculo lineal simple, sino que se necesitan aproximaciones más sofisticadas.

En este estudio se ha utilizado un algoritmo genético (AG), modelo computacional comúnmente empleado en la búsqueda de soluciones para problemas complejos en múltiples campos.

Algoritmos genéticos

Los algoritmos genéticos son métodos metaheurísticos, inspirados por la evolución biológica, que son aplicables en problemas de optimización donde la solución final admite un rango de tolerancia.

Se basan en un método iterativo de búsqueda a partir de un conjunto de soluciones parciales aleatorias (individuos), que se codifican en secuencias numéricas (cromosomas) que configuran la población inicial. El proceso consiste en seleccionar iterativamente las características de los individuos que aporten mejores soluciones. La aplicación de AGs está condicionada a la disponibilidad de un método de evaluación de las soluciones parciales, capaz de asignar una calificación (*fitness*), que proporciona una medida de la idoneidad de cada individuo como solución al problema planteado. En cada iteración, los individuos calificados con peor *fitness* se descartan, reconstituyéndose la población con nuevos individuos procedentes de la recombinación de los mejor calificados. Para introducir mayor diversidad, se suele incorporar un componente mutacional, que proporciona una probabilidad de generar nuevos individuos por alteración de la secuencia codificante de los ya existentes.

En el campo de la medicina, los AGs se usan comúnmente para automatizar el procesamiento de imágenes radiológicas. Algunos ejemplos son la detección automática del borde de la mama y del pezón en mamografías, para identificar microcalcificaciones⁶², o de nódulos en radiografías de pulmón⁶³.

Diseño racional de productos dermatológicos y dermocosméticos

Para este propósito, la entidad colaboradora ha desarrollado la herramienta INCOS[®], cuyo funcionamiento se fundamenta en una base de conocimiento empírico, constituida por una base de datos que incluye la caracterización experimental de la actividad biológica de una colección de compuestos, y un motor de búsqueda, que emplea esta

base de conocimiento para crear combinaciones de compuestos potencialmente beneficiosas frente a una aplicación dermatológica bajo demanda del usuario.

La caracterización de la actividad biológica de los compuestos se lleva a cabo mediante un dispositivo de análisis multiparamétrico *in vitro* cuyas características se detallan en el primer epígrafe de los materiales y métodos.

La parametrización de las aplicaciones dermatológicas consiste en la vinculación de resultados positivos en un grupo de modelos experimentales contenidos en dispositivo de análisis a un efecto biológico deseado para cubrir la aplicación a parametrizar. Los vínculos entre la actividad biológica reportada por un modelo experimental y el efecto beneficioso frente a la aplicación se establecen mediante consulta bibliográfica.

Objetivos

En el sector de Dermofarmacia hay una diferenciación clara con el sector cosmético en canales de venta y consumidores. Sin embargo, los principios activos son en la mayoría de los casos productos naturales que también se utilizan en cosmética y por tanto tampoco pueden ser testados en modelos animales, lo que dificulta obtener un producto de eficacia demostrada antes de su lanzamiento comercial. Las plataformas **SimDerma**[®] e **INCOS**[®], creadas por la entidad colaboradora, son ideales para el desarrollo de nuevas combinaciones para el tratamiento de enfermedades de la piel con base inmunológica (ej Dermatitis Atópica y Psoriasis), ya que permite desarrollar combinaciones de ingredientes activos en base a datos biológicos reales generados contra dianas farmacológicas concretas.

Así, el presente trabajo se plantea en base a los siguientes objetivos:

- 1.- Implementación de un sistema de gestión de la información del laboratorio (LIMS) que permita conectar los resultados emitidos por la plataforma de análisis experimental con la herramienta informática **INCOS**[®] para el diseño racional de productos dermatológicos y dermocosméticos
- 2.- Validación y optimización del motor de búsqueda basado en un algoritmo genético y empleado por **INCOS**[®]. Introducción de parámetros de calidad que permitan garantizar la correcta ejecución del motor de búsqueda.
- 3.- Aplicación de esta tecnología para el diseño de productos para el cuidado de la piel afectada por dermatitis atópica y psoriasis.

Materiales y métodos

Datos biológicos

SimDerma[®], la plataforma de análisis para la obtención de los datos biológicos consta de 30 modelos experimentales de respuesta biológica en tejido dérmico y epidérmico, fundamentalmente consistentes en la detección de cambios en los niveles de marcadores moleculares o en la identificación directa de cambios en el comportamiento de los modelos celulares empleados.

InnoHealt Group S.L. cuenta con una librería de más de 200 ingredientes activos caracterizados fitoquímicamente, que tiene código INCI y que están siendo comercializados por diferentes fabricantes de primer nivel en EU. Todos los ingredientes han sido analizados por la empresa en la plataforma SimDerma[®].

A continuación se expone de forma muy resumida el procedimiento para la obtención de datos biológicos a investigar en INCOS[®].

1.- Inhibición de NF- κ B en queratinocitos: Se mide en la línea celular HaCaT-KBF-Luc estimulada con TNF α (inhibición de la actividad inducida por TNF α).

2.- Inhibición de STAT3 en células epiteliales: Se mide en la línea celular HeLa-STAT3-Luc estimulada con IFN- γ (inhibición de la actividad inducida por IFN- γ).

3.- Actividades PPAR α y PPAR γ : La actividad agonista sobre ambos receptores nucleares se mide en células NIH-3T3 transfectadas con el sistema Gal-DBD/Gal4-luc.

4.- Antagonismo de TRPV-1: Se utiliza la línea celular 293T-TRPV-1 estimulada con capsaicina (inhibición de la actividad inducida por la capsaicina).

5.- Autofagia en queratinocitos: Ensayo de fluorescencia en células HaCaT (Cyto-ID Autophagy Detection Kit).

6.- Ensayos de actividad CB1 y CB2: Se utilizan las líneas celulares 293T-CB1 y 293T-CB2 transfectadas con el plásmido CRE-Luc y estimuladas con WIN y forskolina respectivamente.

7.- Expresión del gen Filagrina: Se utiliza la línea celular HaCaT-FLG-luc y se compara con la acción de Cl₂Ca.

8.- Agonismo de TRPV-1: Se utiliza la línea celular 293T-TRPV-1 y se compara con actividad de la capsaicina.

LIMS (*Laboratory Information Management System*)

El formato escogido para el desarrollo del LIMS es el fichero XML (*eXtensible Markup Language*), un lenguaje basado en etiquetas que permite compartimentalizar la información que compone la base de datos. Esta base de datos va a conformar el espacio de búsqueda sobre el que se va a ejecutar el algoritmo genético.

Los ensayos con cada uno de los ingredientes analizados (fitoextractos comerciales de uso dermatológico y cosmético) en la plataforma **SimDerma®** se realizan a tres concentraciones, con el objetivo de parametrizar la actividad que presenta el ingrediente activo en cada uno de los modelos experimentales. Estas concentraciones son 10 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml. Asumiendo el criterio de la dosis efectiva farmacológica (EC50), cuando el compuesto consigue superar el 50% de la actividad buscada, en comparación con el control positivo, se le asigna una potencia. Dependiendo de en cuantas concentraciones supere dicho umbral, se asignará al compuesto un valor en la forma que se detalla en la siguiente tabla:

Actividad \geq 50% del control positivo en	Potencia
Ninguna concentración	0
Una concentración	1
Dos concentraciones	2
Tres concentraciones	3

Tabla 3. Parametrización de la actividad de los compuestos en los diferentes modelos experimentales

Al encontrarse la mayoría de información almacenada en hojas de cálculo, se ha elaborado una serie de macros utilizando Visual Basic 6.0 que han permitido traducir toda la información almacenada a un formato utilizable por INCOS®. Una macro es un fragmento de código que se anexa a un software para programar tareas, ahorrando tiempo frente a la introducción manual de los resultados y aportando fiabilidad a los mismos. Las macros generadas con este fin han sido las siguientes:

- **RawMatToXML:** Permite transferir a ficheros XML la información relativa a los compuestos analizados, incluyendo la actividad biológica, la composición química conocida y datos bibliográficos.

- **ChemicalInfoToXML:** Convierte a XML la lista de compuestos químicos conocidos presentes en los ingredientes activos.
- **ExpModelsToXML:** Convierte a XML la lista de modelos experimentales que conforman la plataforma.
- **IndicationsToXML:** Convierte a XML la lista de aplicaciones y su relación con los modelos experimentales, así como la bibliografía asociada a dicha relación.
- **BiblioToXML:** Convierte a XML la lista de referencias utilizada para respaldar la asociación modelo-aplicación.

Aunque todas estas macros difieren en el contenido (ya que cada una se debe adaptar al tipo de información que maneja), obedecen a un patrón general que puede verse representado en el siguiente esquema UML (*Unified Markup Language*):

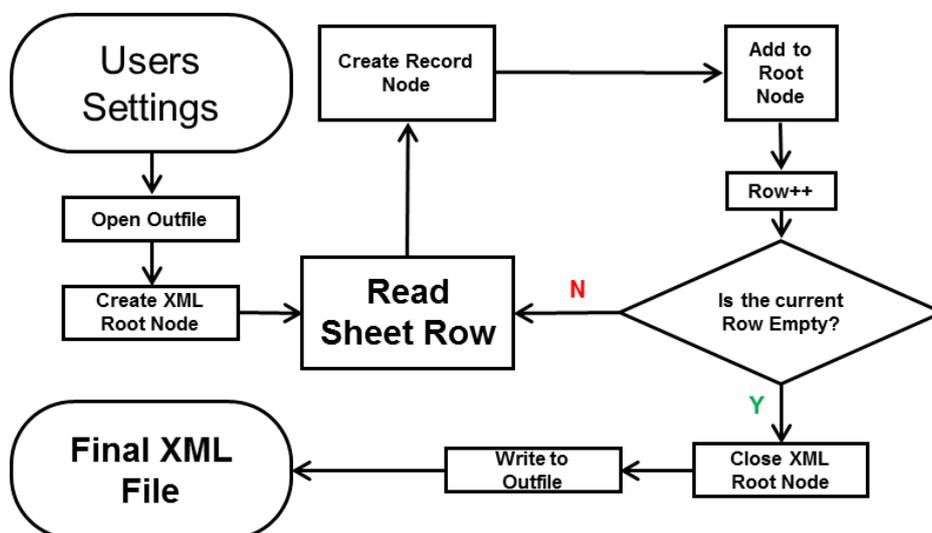


Figura 2. Esquema UML general de las macros que componen el LIMS.

La base de datos está compuesta por más de 200 ingredientes activos de interés en dermatología y dermocosmética, los cuales se han caracterizado en la plataforma de *screening*.

Actualización del motor de búsqueda

En la primera parte del trabajo, se introdujo una batería de modificaciones en el motor de búsqueda para obtener una herramienta profesional, eficaz y aplicable a los problemas biológicos que se pretenden abordar. Por ello, el trabajo realizado sobre el motor de búsqueda se ha dividido en tres secciones: Optimización, configuración y aplicación.

Optimización del algoritmo de búsqueda

- Filtro primario para actividades biológicas incompatibles

Debido a la complejidad biológica asociada a cualquier patología, ha surgido la evidencia de que al trabajar con compuestos que presentan actividad en múltiples dianas, es necesario aplicar restricciones o penalizaciones a aquellas actividades que puedan resultar contraproducentes para el cuidado de determinadas patologías.

Los filtros primarios tienen como finalidad restringir el espacio de búsqueda, descartando compuestos con determinadas características, antes de la ejecución del algoritmo. Así, se ha implementado un nuevo filtro primario para bloquear el uso de compuestos con actividades incompatibles con la aplicación solicitada.

- Función de evaluación

La función empleada para la evaluación de las combinaciones es una función heurística y compone el corazón del motor de búsqueda. En este trabajo se ha diseñado una función de evaluación que no solo tiene en cuenta las actividades biológicas asociadas a las aplicaciones solicitadas en las diferentes combinaciones, sino que además permite penalizar aquellas actividades que si bien no son completamente incompatibles con las aplicaciones solicitadas, puedan tener efectos contraproducentes.

La función de evaluación empleada por el motor se corresponde con la siguiente expresión:

$$F(\text{combinación}) = (n_1 \times A) - (n_2 \times C)$$

Donde:

- F es el *Fitness* o puntuación final que recibe cada una de las combinaciones que componen la población del espacio de soluciones parciales.
- A es un parámetro que mide la actividad de la combinación frente a los modelos experimentales asociados a las aplicaciones solicitadas.
- C es un parámetro que mide la actividad de la combinación frente a los modelos experimentales asociados negativamente a las aplicaciones solicitadas.
- n_1 y n_2 son parámetros numéricos (modificables) que permiten establecer la aportación de los anteriores parámetros al *Fitness* de la combinación.

El valor del *Fitness* se normaliza en el intervalo 0-100, donde 0 se correspondería con una hipotética combinación sin actividad sobre los modelos experimentales

positivamente asociados y con la máxima actividad frente a los modelos experimentales negativamente asociados, en tanto el valor 100 se correspondería con una combinación con la máxima actividad frente a todos los modelos experimentales positivamente asociados y sin actividad frente a los negativamente asociados.

- Ejecución del algoritmo

Uno de los problemas que plantea el uso de un algoritmo genético como motor de búsqueda, está determinado por la naturaleza del mismo. Al tratarse de un sistema evolutivo que mejora en cada etapa por recombinación de los mejores individuos de la generación anterior, los parámetros que determinan su ejecución deben ajustarse mediante sucesivas pruebas para la optimización del motor de búsqueda. Los parámetros configurables son:

- **Número de tuplas por cromosoma:** La tupla es la unidad codificante dentro de la secuencia del cromosoma, que está constituida por una cantidad de bits consecutivos que se decodifican en bloque. El número de tuplas se corresponde con el número máximo de ingredientes que podría codificar un cromosoma, si bien pueden existir tuplas no codificantes, lo que proporciona variabilidad en el número de ingredientes codificados por cromosomas de igual longitud. El tamaño de tupla depende del número de ingredientes a codificar y se calcula según el principio de complejidad de Kolmogorov⁶⁴.
- **Tamaño de la población:** Es el número de cromosomas que se van a computar en cada iteración del proceso evolutivo.
- **Número de épocas:** Es el número de iteraciones durante las que se ejecuta el algoritmo.
- **Tasa de mutación:** Establece la probabilidad de que un bit cambie de valor en la nueva subpoblación, codificando un nuevo compuesto y aportando variabilidad a la evolución del sistema

Parameter	Value
Tuples per chromosome	10
Poulation size	100
Evolutive epochs	1000
Mutation rate	0.02

Tabla 4. Parámetros configurables del motor de búsqueda

Todos estos elementos aparecen representados en el siguiente esquema UML que representa el flujo de datos durante la ejecución del algoritmo:

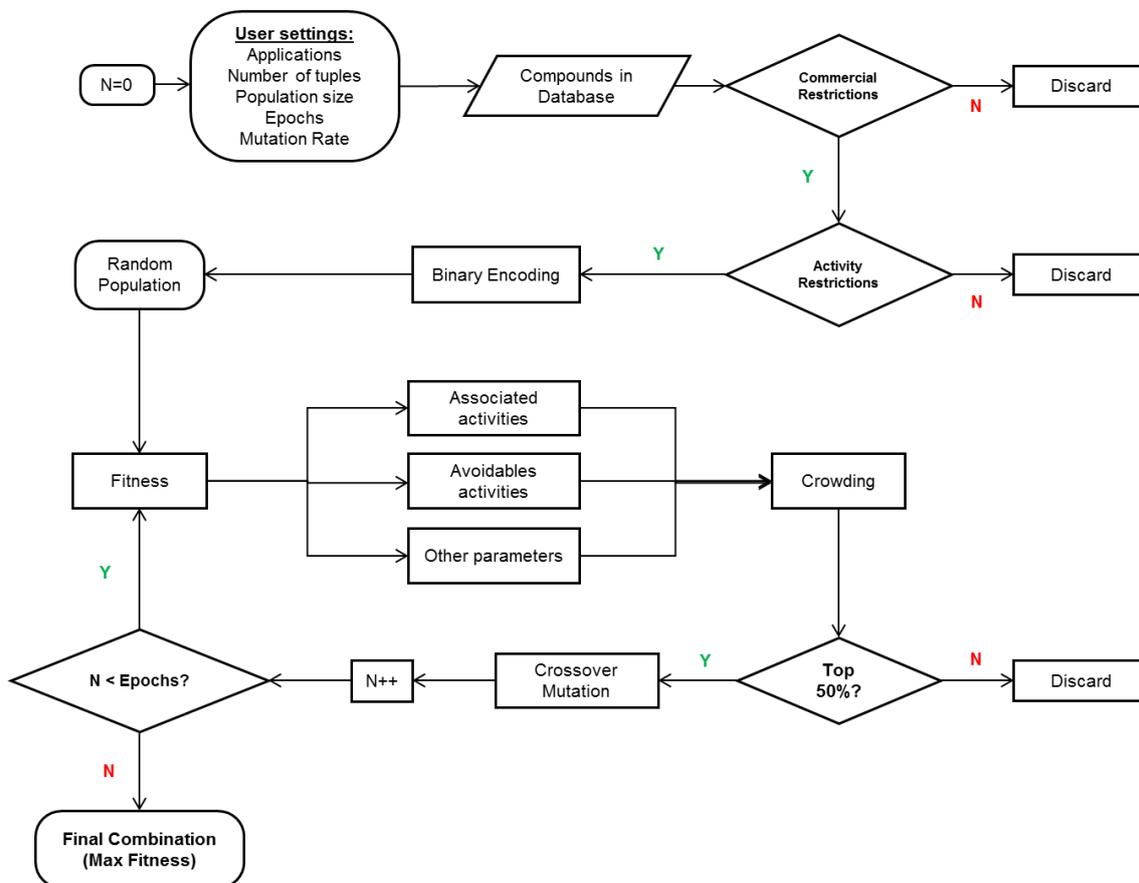


Figura 3. Esquema UML del algoritmo genético que compone el motor de búsqueda. El filtro primario para descartar ingredientes con actividades incompatibles se corresponde con la sentencia condicional de *Activity Restrictions*. La función *Fitness* hace referencia a la aplicación de la función de evaluación sobre todos los individuos que componen la población. El operador *Crowding* permite ordenar todas las combinaciones en función de su *fitness* priorizando la persistencia aquellas pertenecientes al 50% mejor puntuado. El operador *Crossover* recombina los mejores individuos, seleccionados tras la aplicación del *Crowding* para dar lugar a la nueva generación. Por último, el operador *Mutation* introduce variaciones aleatorias en las secuencias codificantes en función de la probabilidad determinada por la variable *Mutation Rate*, lo que se traduciría en añadir, eliminar o sustituir nuevos ingredientes en la combinación, aportándole variabilidad al sistema.

Configuración del motor de búsqueda

Para la optimización de los parámetros citados anteriormente y la validación del AG como motor de búsqueda, se han introducido en la base de datos una serie de “Muestras condicionadas”, consistentes en compuestos hipotéticos ideales que presentan la máxima potencia en las dianas biológicas asociadas positivamente a las aplicaciones solicitadas y sin actividad frente a las dianas asociadas negativamente. En las siguientes tablas se muestra el perfil de actividad de estos compuestos hipotéticos para psoriasis y dermatitis atópica:

- Psoriasis

Internal ID	Nf-kB	STAT-3	PPAR- γ activity	PPAR- α activity	CB1 agonistic activity	CB2 agonistic activity	TRPV-1 agonistic activity	TRPV-1 antagonistic activity	Autophagy in keratinocytes	Fillagrin gene induction
M101	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-
M102	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-
M103	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-
M104	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-
M105	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-

Tabla 5. Muestras condicionadas para la optimización del motor de búsqueda en la aplicación psoriasis

- Dermatitis atópica

Internal ID	Nf-kB	STAT-3	PPAR- γ activity	PPAR- α activity	CB1 agonistic activity	CB2 agonistic activity	TRPV-1 agonistic activity	TRPV-1 antagonistic activity	Autophagy in keratinocytes	Fillagrin gene induction
M106	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	+++
M107	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	+++
M108	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	+++
M109	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	+++
M110	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	+++

Tabla 6. Muestras condicionadas para la optimización del motor de búsqueda en la aplicación dermatitis atópica

Mediante la introducción de estos compuestos en las bases de datos de ingredientes que constituyen el espacio de búsqueda, se ha podido optimizar la configuración del motor de búsqueda empleando como control de calidad la frecuencia de uso de los compuestos ficticios en las combinaciones propuestas por el sistema para psoriasis y dermatitis atópica.

Finalmente, una vez se ha optimizado el algoritmo, se ha procedido a su aplicación, eliminando previamente del espacio de búsqueda las muestras condicionadas, para la búsqueda de compuestos que compongan el producto final para el cuidado de la psoriasis y la dermatitis atópica.

Resultados

LIMS

La implementación del LIMS ha permitido generar un flujo de resultados entre la plataforma de *screening* e INCOS®. El LIMS almacena tanto la información comercial como los resultados procedentes de la caracterización biológica de los diferentes compuestos en formato XML, un estándar utilizable no solo por el *software* de combinación, sino por un amplio rango de aplicaciones informáticas.

Optimización del motor de búsqueda

Parámetros configurables

Tras sucesivas pruebas con la nueva versión del motor, se ha llegado a la conclusión de que los parámetros ideales para realizar las búsquedas de combinaciones de cuatro ingredientes son:

- **Número de tuplas por cromosoma: 4**

De esta forma se pueden crear combinaciones de hasta cuatro ingredientes. Se ha escogido este número de ingredientes debido a que presenta un equilibrio entre la adecuación al problema biológico (representada por el *fitness*) y el gasto en compuestos activos, como se puede apreciar en la siguiente gráfica:

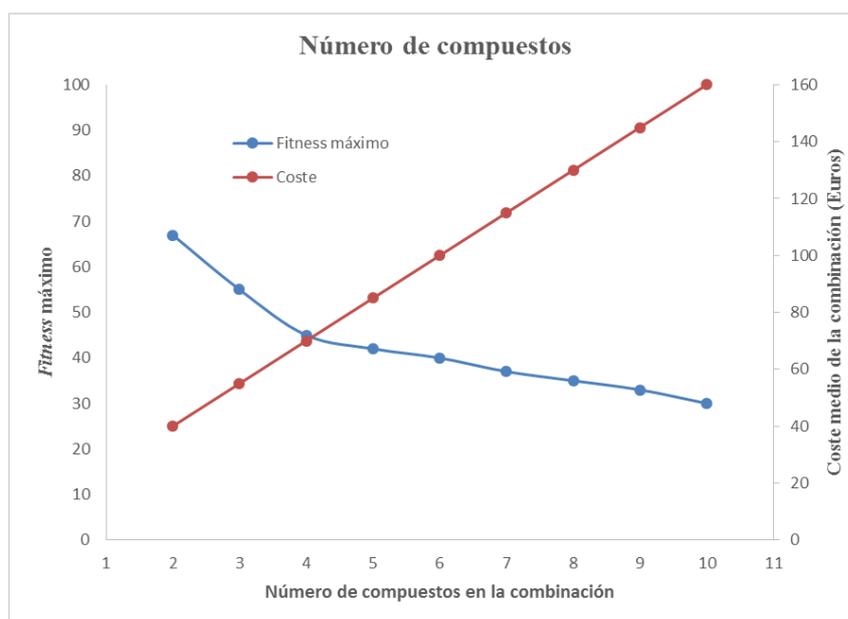


Figura 4. Gráfica que representa número de compuestos frente a *fitness* máximo y coste medio de la combinación. Los datos del *fitness* se han obtenido de búsquedas reales y se ha utilizado un coste medio de 300 euros/kg de compuesto activo (50 gramos por combinación).

- **Tamaño de la población: 300**

Se ha observado que con un tamaño de la población mayor, la evolución del algoritmo se aleja de la progresión determinista y, sin embargo, no se obtienen mejores resultados, mientras que con un tamaño de población menor, el algoritmo proporcionaría soluciones con peor evaluación, habiéndose encontrado un uso deficitario de muestras condicionadas. En la siguiente tabla se puede apreciar un ejemplo donde un tamaño de población de 50 imposibilita encontrar combinaciones constituidas en su totalidad por muestras condicionadas.

Parámetros

Parameter	Value
Tuples per chromosome	4
Poulation size	50
Evolutive epochs	500
Mutation rate	0.02

Combinación resultante

Ingredient
M105
M102
M103
ESC82

Tabla 7. Ejemplo de combinación obtenida utilizando un tamaño de población de 50.

- **Número de épocas: 500**

Este valor, junto con el tamaño de población estipulado, proporciona una buena evolución del sistema y una alta reproducibilidad de los resultados, obteniéndose en todas las búsquedas combinaciones de cuatro muestras condicionadas.

- **Tasa de mutación: 0.02%**

Esta tasa de mutación se aplica durante la síntesis de la nueva generación de individuos mediante la recombinación (*crossover*) de aquellos mejor puntuados en la generación precedente. Una tasa de mutación superior al 0.02% compromete la principal ventaja del AG, ya que una excesiva variabilidad en la secuencia de las nuevas soluciones podría determinar un riesgo de perder las características que pretenden heredarse de las soluciones mejor evaluadas.

Actualización del motor de búsqueda

Utilizando como control de calidad la frecuencia de uso de muestras condicionadas, las implementaciones que se han introducido en el motor de búsqueda han mejorado notablemente tanto la precisión como la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Con el objetivo de mostrar visualmente cómo se ha optimizado el algoritmo, se ejecutaron tres búsquedas consecutivas para la aplicación psoriasis antes de la implementación de las actualizaciones.

En las siguientes imágenes se pueden observar los resultados para todas estas búsquedas, ejecutadas con los parámetros de configuración definidos en el apartado anterior:

- Búsqueda 1 – Psoriasis (Pre-actualización)

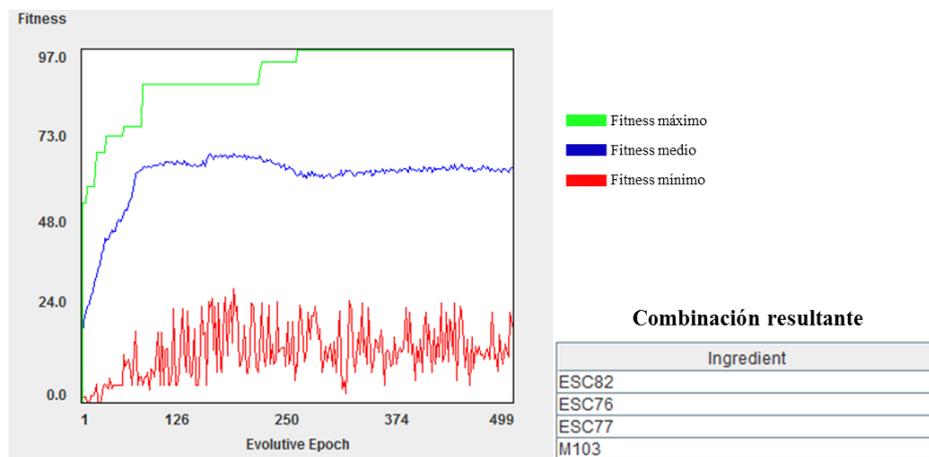


Figura 5. Resultado de la primera búsqueda para psoriasis antes de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

- Búsqueda 2 – Psoriasis (Pre-actualización)

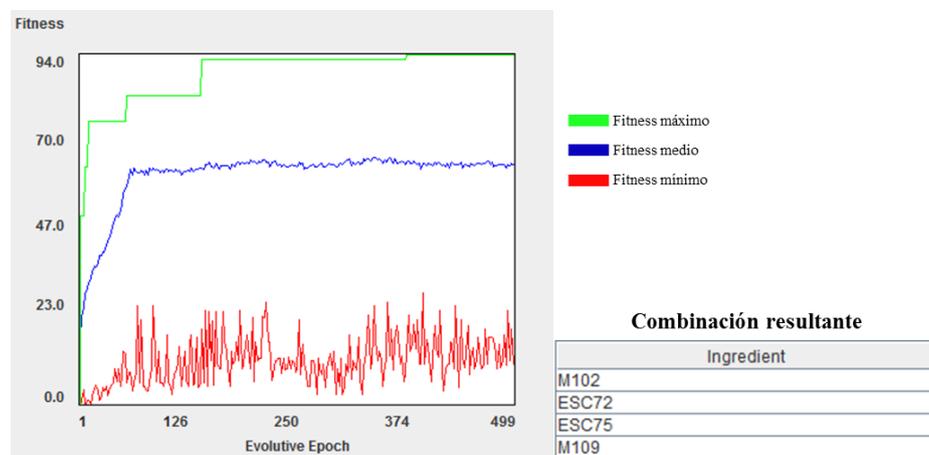


Figura 6. Resultado de la segunda búsqueda para psoriasis antes de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Búsqueda 3 – Psoriasis (Pre-actualización)

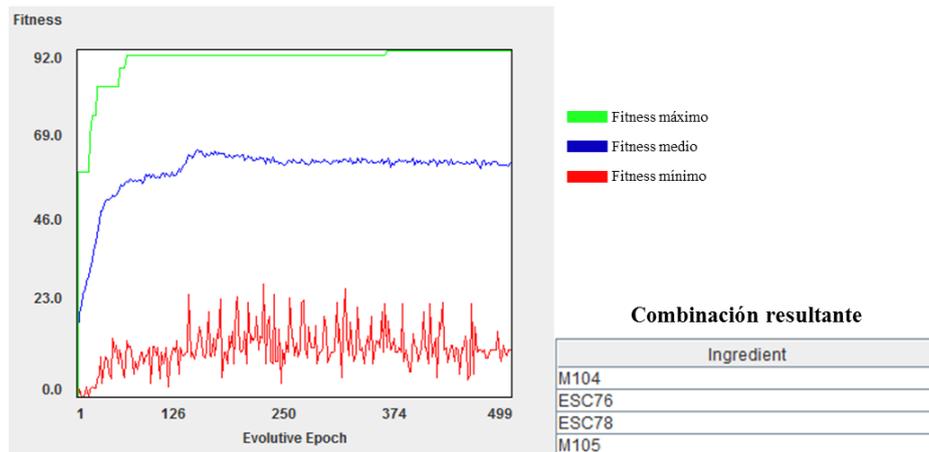


Figura 7. Resultado de la tercera búsqueda para psoriasis antes de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

En ninguna de las tres búsquedas realizadas se ha obtenido una combinación de cuatro muestras condicionadas. La línea verde representa el *fitness* asignado a la combinación mejor puntuada, la línea azul el *fitness* medio de todas las combinaciones y la línea roja el *fitness* de la combinación peor puntuada.

Tras la implementación del filtro primario y la nueva función de evaluación, se han obtenido los siguientes resultados para las búsquedas correspondientes a las aplicaciones psoriasis y dermatitis atópica:

Búsqueda 1 – Psoriasis

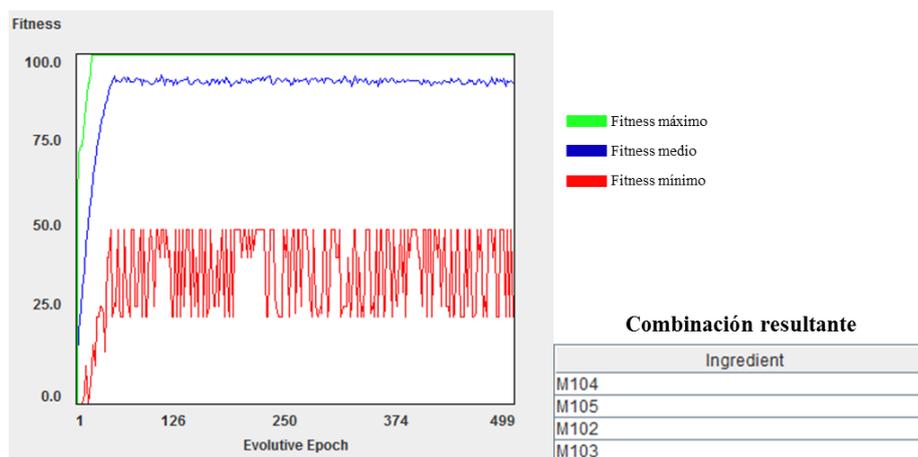


Figura 8. Resultado de la primera búsqueda para psoriasis después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Búsqueda 2 – Psoriasis

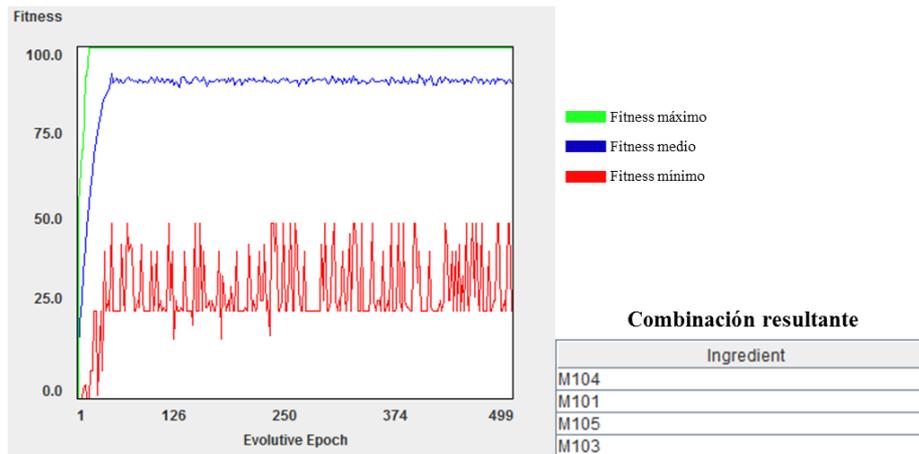


Figura 9. Resultado de la segunda búsqueda para psoriasis después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Búsqueda 3 – Psoriasis

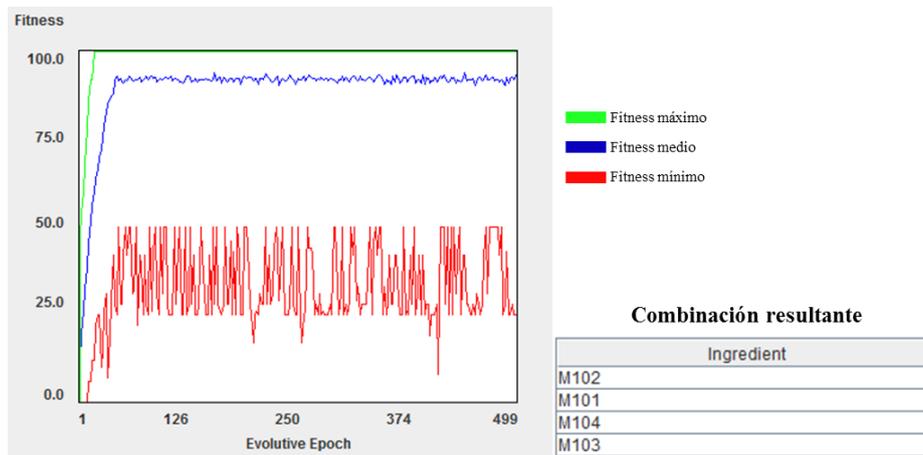


Figura 10. Resultado de la tercera búsqueda para psoriasis después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Como se puede observar, en todas las búsquedas ejecutadas el motor ha devuelto una combinación de cuatro muestras condicionadas para psoriasis. Esto significa que ha sido capaz de encontrar la mejor solución al problema planteado, alcanzando un *fitness* de 100.

Búsqueda 1 – Dermatitis atópica

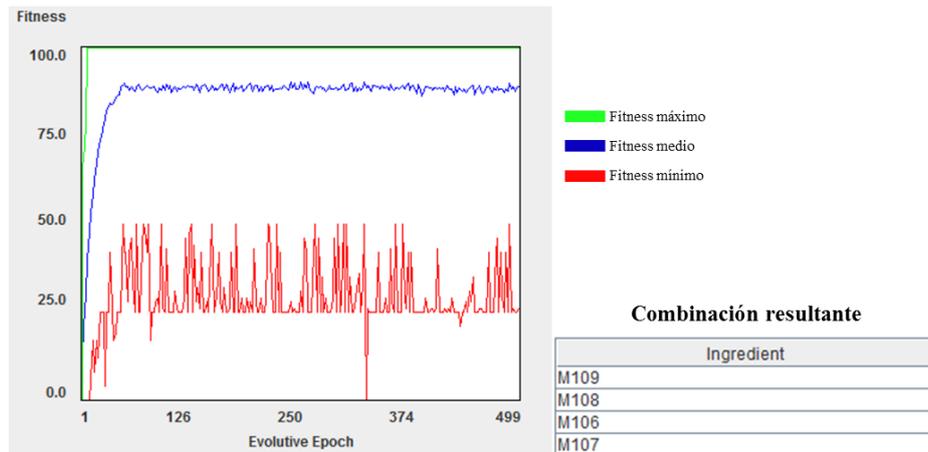


Figura 11. Resultado de la primera búsqueda para dermatitis atópica después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Búsqueda 2 – Dermatitis atópica

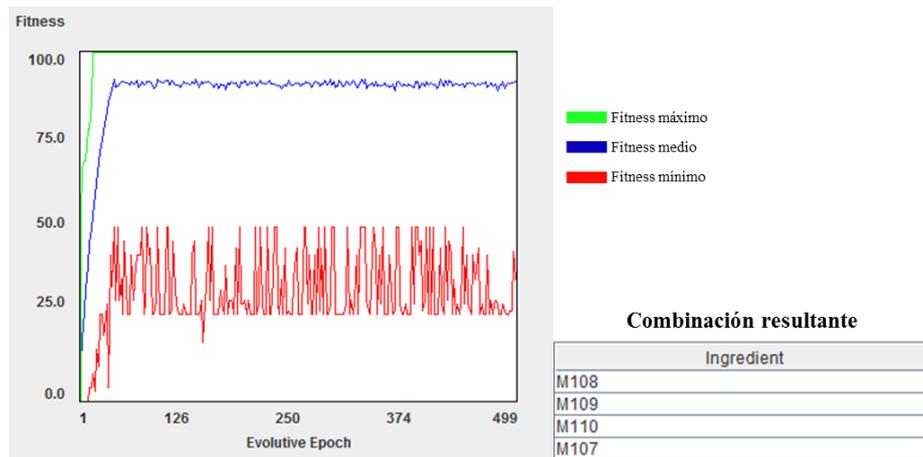


Figura 12. Resultado de la segunda búsqueda para dermatitis atópica después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Búsqueda 3 – Dermatitis atópica

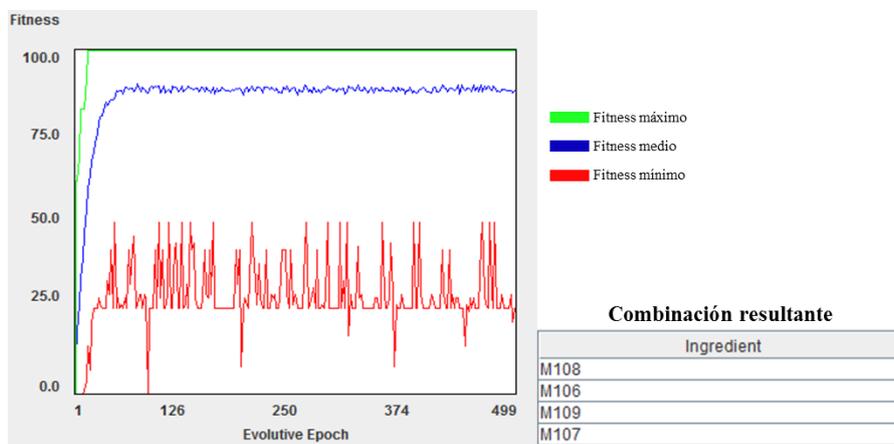


Figura 13. Resultado de la tercera búsqueda para dermatitis atópica después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda con muestras condicionadas.

Al igual que ha ocurrido con las búsquedas para psoriasis, el motor ha devuelto únicamente combinaciones de muestras condicionadas, que alcanzan un *fitness* del 100%.

Combinación de compuestos para el cuidado de la psoriasis

Una vez eliminadas las muestras condicionadas, el espacio de búsqueda se compone de una lista de más de cien compuestos activos de valor dermatológico y dermocosmético. El siguiente paso tras la actualización del motor de búsqueda, es su aplicación para generar una combinación de compuestos útil para el cuidado de las dos patologías abordadas en este trabajo.

Tras ejecutar el algoritmo varias veces, todas las combinaciones obtenidas para psoriasis presentan la misma composición, que se puede apreciar en la imagen que se expone a continuación:

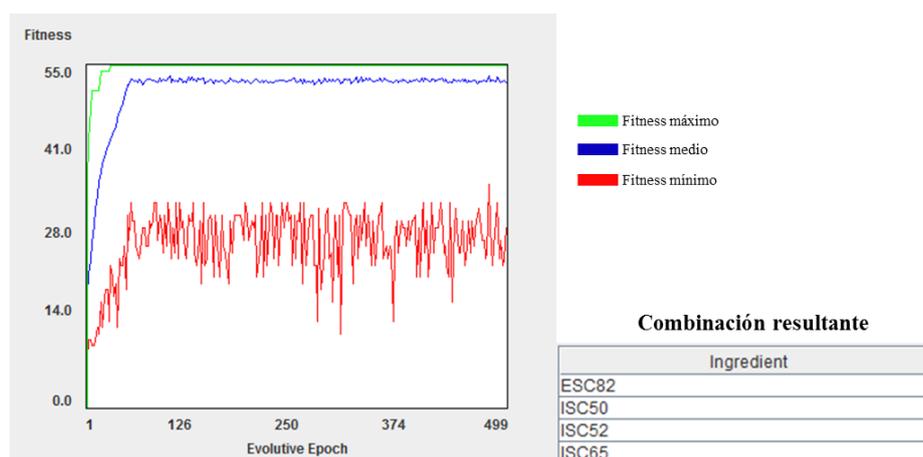


Figura 14. Resultado de la búsqueda para psoriasis después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda sin muestras condicionadas.

La combinación resultante contiene los siguientes ingredientes:

- ESC82
- ISC50
- ISC52
- ISC65

Por motivos de confidencialidad, no se puede revelar la información completa de estos ingredientes, sin embargo se puede presentar como una combinación de varios extractos de origen vegetal reforzados con compuestos puros. En concreto, esta combinación contendría extractos de *Santalum Album* y *Silybum Marianum* en combinación con compuestos orgánicos de la familia del ácido ximenínico.

Combinación de compuestos para el cuidado de la dermatitis atópica

A diferencia de la búsqueda realizada para psoriasis, la búsqueda para dermatitis atópica ha devuelto tres combinaciones diferentes. El filtro primario nos ha servido para descartar todos los ingredientes con actividad agonista de CB2, algunos de los cuales aparecerían en la combinación de no ser así (como por ejemplo el ESC82). En las siguientes imágenes se presentan las tres combinaciones obtenidas para dermatitis atópica:

Combinación 1

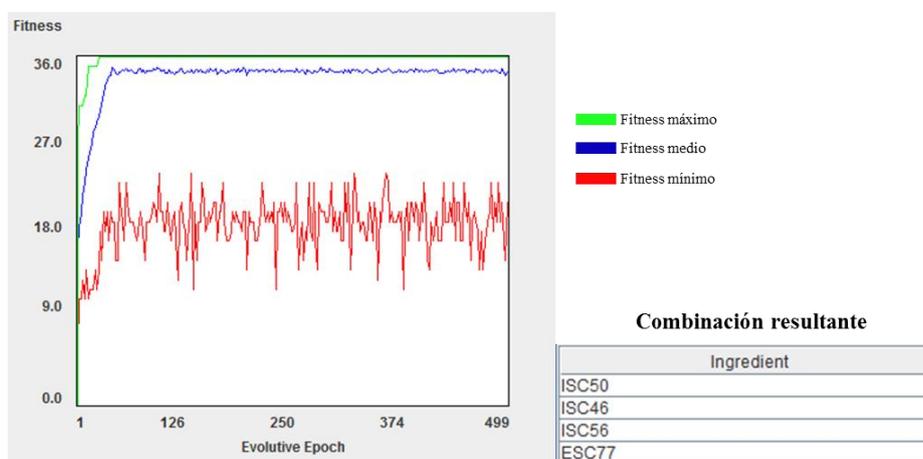


Figura 15. Resultado 1 de la búsqueda para dermatitis atópica después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda sin muestras condicionadas.

Combinación 2

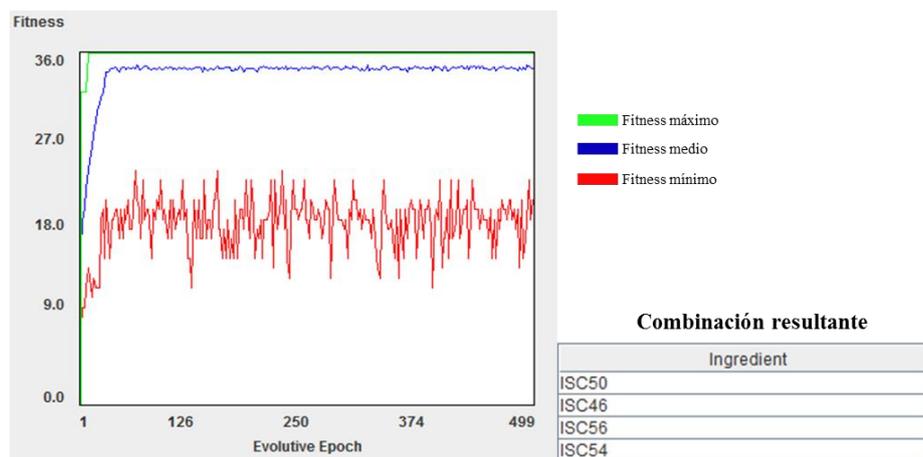


Figura 16. Resultado 2 de la búsqueda para dermatitis atópica después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda sin muestras condicionadas.

Combinación 3

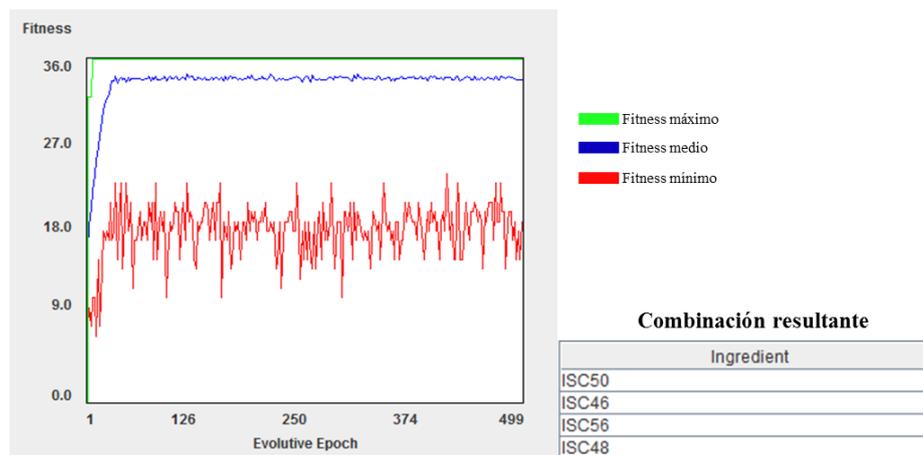


Figura 17. Resultado 3 de la búsqueda para dermatitis atópica después de la actualización del motor. Espacio de búsqueda sin muestras condicionadas.

La combinación resultante contiene los siguientes ingredientes:

- ISC50
- ISC46
- ISC56
- ESC77 / ISC54 / ISC48

Esta combinación contendría extractos vegetales de *Vaccinium myrtillus*, *Centella asiatica*, *Serenoa Repens* y el alga *Cyanidium caldarium* en combinación con compuestos puros de la familia del ácido ximenínico.

Discusión

Asociaciones Modelo Experimental/Aplicación Dermatológica

La finalidad de este trabajo es, en última instancia, la aplicación de la tecnología que se ha actualizado para la creación de combinaciones de compuestos para el cuidado de la piel afectada por psoriasis y dermatitis atópica. Con este objetivo, se ha desglosado el problema biológico asociado a estas enfermedades para su caracterización mediante un grupo de modelos experimentales de inflamación, diferenciación e hiperproliferación epidérmica, defensa frente al daño oxidativo y activación de receptores sensoriales incluidos en la plataforma **SimDerma**[®].

1.1. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad con un marcado carácter inflamatorio, el cual ejerce un papel central en el desarrollo de su inmunopatogénesis ¹. El proceso inflamatorio afecta al tejido epidérmico provocando la activación de las terminaciones nerviosas cutáneas, produciendo sensación de picor, y la pérdida de la homeostasis por hiperproliferación de queratinocitos basales, con la consecuente hiperplasia de la epidermis ³.

La aproximación planteada para el diseño del tratamiento se basa en la actuación sobre estos tres eventos para la corrección de la sintomatología de la enfermedad. La inflamación es un proceso mediado por múltiples factores, para algunos de los cuales existen modelos en la plataforma de *screening*, habiéndose seleccionado aquellos cuya asociación con psoriasis cuenta con respaldo bibliográfico. Así, la inhibición de los factores NF- κ B ^{26,27} y STAT3 ^{27,30} es el mecanismo elegido para paliar el componente inflamatorio de la psoriasis. Por otra parte, se ha demostrado que la actividad agonista frente a PPAR γ reduce la inflamación en pacientes con psoriasis, probablemente a través de un mecanismo indirecto que puede interferir con NF- κ B ³⁵, por lo que este modelo experimental se ha asociado a psoriasis para reforzar la acción antiinflamatoria ejercida mediante la inhibición de NF- κ B y STAT3.

Se ha demostrado que el picor asociado a la inflamación en procesos psoriasiformes se encuentra regulado por el receptor TRPV-1 ⁴³, existiendo un producto en fase de ensayo clínico para el tratamiento de éste síntoma que ejerce su efecto a través del mismo ⁴⁴. De esta forma, se ha propuesto la actividad antagonista frente a TRPV-1 como modelo de alivio de picor provocado por lesiones psoriásicas.

Para el componente hiperplásico se han empleado como modelos la activación de PPAR α y del proceso de autofagia. Se ha demostrado que la aplicación tópica de un agonista del receptor es capaz de restaurar la homeostasis del tejido ³⁶. Por su parte, la autofagia en queratinocitos es un proceso importante para la homeostasis epidérmica, que además es capaz de controlar la inflamación en este tejido ⁴⁷.

En el siguiente esquema se resumen las vías de actuación seleccionadas para el control de los efectos de la psoriasis:

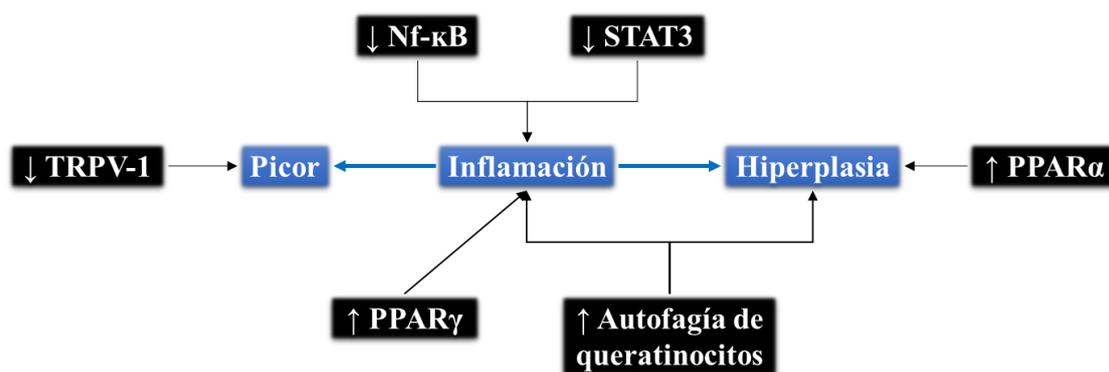


Figura 18. Vías de actuación de la combinación sobre los procesos asociados a psoriasis.

La combinación propuesta cubre todas las dianas vinculadas a psoriasis excepto autofagia en queratinocitos.

1.2. Dermatitis atópica

Para abordar el estudio de la dermatitis atópica, la teoría *inside-outside-inside* propone que el efecto de retroalimentación que caracteriza su mecanismo fisiopatogénico se debe principalmente a tres componentes: inflamación, picor y fallo de barrera epidérmica ¹³. Como se ha hecho para el caso de la psoriasis, los componentes de la enfermedad se han caracterizado de forma independiente mediante los modelos experimentales de la plataforma.

Para controlar el proceso inflamatorio, se ha elegido la inhibición de NF- κ B ^{48,49} y la activación de CB1 ⁵⁶, incluyendo también la activación de PPAR γ por sus efectos indirectos sobre la inflamación a través de NF- κ B ³⁵.

Sin embargo, la activación de PPAR γ para el tratamiento de la dermatitis atópica tiene una doble función, puesto que, junto con la activación de PPAR α , promueve la diferenciación de queratinocitos y la recuperación de la barrera epidérmica ^{50,51,53}. Un

tercer modelo de protección de barrera epidérmica que se ha incluido en las definiciones es la expresión de filagrina en queratinocitos ^{16,18}.

Finalmente, se ha optado también por el bloqueo de TRPV-1 como modelo de alivio del picor ⁵⁸.

Las vías de actuación elegidas para el cuidado de la dermatitis atópica se representan en el siguiente esquema:

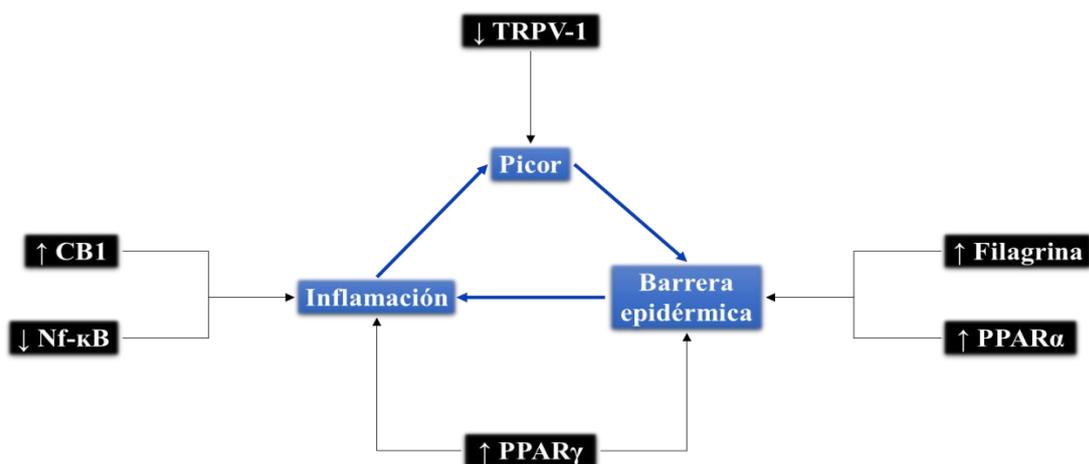


Figura 19. Vías de actuación de las combinaciones sobre los procesos asociados a dermatitis atópica

La combinación propuesta cubre todas las dianas vinculadas a psoriasis excepto filagrina y CB1. No obstante, al actuar sobre NF-κB y PPARα, se obtienen los efectos biológicos perseguidos por estas dianas no cubiertas.

1.3. Asociaciones negativas

Como se ha explicado, debido a los procedimientos experimentales pueden encontrarse compuestos que presenten actividad tanto agonista como antagonista frente a TRPV-1, si bien no es esperable encontrar una elevada potencia para ambos modelos experimentales. Así, se ha decidido incluir una penalización específica para la actividad agonista de TRPV-1, sin excluir el uso de compuestos con esta característica.

Por su parte, los efectos contraproducentes sobre la homeostasis de la piel asociados a la activación de receptores CB2 han determinado la clasificación de esta actividad como incompatible para uso en dermatitis atópica^{54,61}, habiéndose incluido entre los filtros primarios para la exclusión de compuestos positivos en dicho ensayo.

Actualización del motor de búsqueda de INCOS®

Las actuaciones llevadas a cabo sobre el motor de búsqueda de INCOS®, así como la optimización de los parámetros de configuración en tiempo de ejecución, han permitido crear una nueva versión de la herramienta con mejores prestaciones en su campo de aplicación, aumentando su aplicabilidad frente a los problemas biológicos planteados, la reproducibilidad de los resultados y, en último término, la actividad de las combinaciones creadas.

La reproducibilidad es una característica que le confiere fiabilidad a cualquier sistema de búsqueda basado en métodos estocásticos, como es el caso de los AGs. En su estado previo a la actualización, los resultados proporcionados por INCOS® estaban afectados por una alta dispersión, con una baja coincidencia en la composición de combinaciones procedentes de búsquedas ejecutadas con configuraciones equivalentes.

Para explicar estos efectos, conviene introducir algunos conceptos relativos a los métodos de búsqueda. Un árbol de decisión es la representación esquemática de un problema mediante un sistema de nodos y aristas, donde los nodos representan soluciones parciales al problema y las aristas las posibilidades de combinación entre estas soluciones parciales para obtener soluciones más avanzadas. El espacio de búsqueda es el conjunto de posibles soluciones parciales y globales al problema. El campo de búsqueda es un subconjunto restringido del espacio de búsqueda sobre el que opera el algoritmo de búsqueda. Por último, el espacio de soluciones es el conjunto de todas las posibles soluciones globales al problema, procedentes de todas las posibles combinaciones de soluciones parciales.

Es importante matizar que el AG es aplicable únicamente si el espacio de soluciones admite cierta tolerancia, como es el caso que trata el presente trabajo, donde diferentes combinaciones de activos pueden tener una misma aplicación en tanto su actividad biológica sea similar. Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados indica que la búsqueda avanza por la rama correcta del árbol de decisiones. El interés del uso de métodos estocásticos, y de AGs en particular, como motores de búsqueda reside en su capacidad de restringir el campo de búsqueda dentro del espacio global, descartando las ramas del árbol de decisión que presentan una baja probabilidad de conducir a una solución óptima al problema planteado. Esto es especialmente relevante cuando se trata de espacios de búsqueda complejos, donde el uso de métodos lineales, que evalúan de

forma individual cada una de las soluciones posibles dentro del espacio de búsqueda, consumiría una alta cantidad de recursos y tiempo de computación. La capacidad de restringir el espacio de búsqueda la proporciona la función heurística, que es una estimación de la distancia entre un nodo del espacio de búsqueda, que representa una solución parcial, y la solución global del problema planteado. De este modo, una función heurística adecuadamente formulada permitiría reducir el campo de búsqueda, confinando el espacio de soluciones y proporcionando por tanto mayor reproducibilidad al sistema.

En el caso de los AGs, la función heurística empleada es la función de evaluación que se aplica a las soluciones parciales en cada generación, la cual ha constituido el principal objetivo de las actuaciones sobre el motor de búsqueda. La función empleada en la versión previa de INCOS[®] evaluaba únicamente los perfiles de actividad en modelos experimentales asociados a efectos beneficiosos frente a la aplicación solicitada. La actualización ha consistido en ampliar este concepto para penalizar perfiles de actividad en modelos experimentales asociados a riesgo o efectos deletéreos frente a la aplicación solicitada. La inclusión de esta nueva variable determina una mayor restricción del campo de búsqueda y por tanto del espacio de soluciones, aumentando la reproducibilidad del sistema.

Una segunda actuación ha sido la implementación de un filtro primario para excluir del espacio de búsqueda compuestos que respondan a determinados patrones de actividad. Los filtros primarios actúan a nivel del espacio de búsqueda, previamente a la ejecución del motor. Como ya se ha descrito, la activación de CB2 es incompatible con tratamientos para dermatitis atópica, por lo que se eliminan los compuestos con este perfil de actividad, restringiéndose el espacio de búsqueda y por lo tanto el campo de búsqueda y el espacio de soluciones, con lo que una vez más aumentaría la reproducibilidad del sistema.

Así, la actualización de la herramienta ha consistido en la introducción de asociaciones actividad biológica/aplicabilidad dermatológica con carácter negativo que, sumadas a las asociaciones positivas ya existentes, proporcionan una descripción más precisa del problema biológico a modelizar y por lo tanto aumenta la probabilidad de éxito en la búsqueda racional de soluciones.

Casos prácticos de aplicación de la nueva versión de INCOS®

La aplicación del motor de búsqueda para diseño de tratamientos para psoriasis y dermatitis atópica ha devuelto las combinaciones que se presentan en la siguiente tabla:

Psoriasis	Dermatitis atópica
ESC82	ISC50
ISC50	ISC46
ISC52	ISC56
ISC65	ESC77 / ISC54 / ISC48

Tabla 8. Combinaciones finales de compuestos activos para el cuidado de la psoriasis y la dermatitis atópica.

Para el caso de psoriasis, el sistema ha propuesto la misma combinación en todas las búsquedas efectuadas, mientras que en dermatitis aparecen de forma recurrente tres combinaciones diferentes, en las que varía uno de los compuestos. Esto se debe probablemente a que estos tres compuestos aportan una actividad similar, por lo que su inclusión proporciona una evaluación equivalente a las combinaciones durante la ejecución del motor de búsqueda.

Por motivos comerciales, los compuestos se encuentran codificados. Las combinaciones finales surgen de la unión de extractos naturales de origen vegetal, procedentes de las especies como *Santalum Album*⁶⁵, *Silybum Marianum*⁶⁶, *Vaccinum Myrtillus*⁶⁷ y *Centella asiatica*⁶⁸, con compuestos puros de la familia del ácido ximenínico.

El presente trabajo constituye una aproximación teórica para la búsqueda de las combinaciones que se presentan. Para validar la actividad biológica que se asigna a estas combinaciones, así como para identificar posibles efectos cooperativos o interacciones adversas por el uso combinado de sus componentes, deben someterse al proceso de análisis en la plataforma de *screening* e, idealmente, a un ensayo de eficacia *in vivo*.

Potencial de INCOS® en futuros desarrollos

El motor de búsqueda optimizado en este trabajo posee un gran potencial en el descubrimiento de combinaciones activas en múltiples campos. La herramienta permite utilizar los resultados generados por una plataforma de *screening* (en este caso) o procedentes de conocimiento bibliográfico para combinar compuestos naturales o

sintéticos a partir de la información contenida en una base de datos, la cual está continuamente actualizándose con nuevos resultados que se introducen mediante el LIMS.

El procedimiento para diseñar una combinación activa para un aplicación específica consistiría en los siguientes pasos:

- Estudio de la aplicación que se desea cubrir mediante la combinación, que puede estar relacionado con el tratamiento de la sintomatología de una enfermedad o condición específica de piel, la prevención frente a agresiones externas, o corrección de defectos visuales de interés en medicina estética o en dermocosmética.
- Parametrización de la aplicación mediante la asociación de modelos experimentales vinculados de forma positiva o negativa, lo cual se llevaría a cabo mediante el LIMS.
- Ejecución de la búsqueda mediante la herramienta INCOS[®] para la obtención de las combinaciones en base al contenido de las bases de datos.
- Síntesis de las combinaciones en laboratorio de química húmeda y validación *in vitro* mediante la plataforma de *screening* para la identificación de posibles defectos funcionales.
- Análisis *in vivo*, que se llevará a cabo generalmente con personas voluntarias evaluándose parámetros objetivos y encuestas de satisfacción, si bien sería necesario el desarrollo de una fase de ensayo clínico regulada en caso de que se reivindicque un valor farmacológico para el producto.

Conclusiones

- Mediante una combinación de compuestos activos con un coste relativamente asequible, es posible abordar diferentes aspectos patológicos asociados a enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis o la dermatitis atópica.
- La introducción de un sistema de penalización para determinadas actividades biológicas en el motor de búsqueda ha proporcionado una mayor adecuación de las combinaciones obtenidas a las enfermedades.
- La optimización de la función de evaluación ha aumentado la reproducibilidad y eficacia de las búsquedas realizadas mediante el algoritmo genético.
- Debido a la complejidad de los sistemas biológicos y a la gran cantidad de información disponible, los métodos de análisis lineal adquieren papel secundario frente a los métodos computacionales para toma de decisiones (inteligencia artificial) como el algoritmo genético.

Bibliografía

1. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. *Lancet*. 2015;386(9997):983-994. doi:10.1016/S0140-6736(14)61909-7.
2. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, et al. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):377-385. doi:10.1038/jid.2012.339.
3. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(5):496-509. doi:10.1056/NEJMra0804595.
4. Mahil SK, Capon F, Barker JN. Genetics of psoriasis. *Dermatol Clin*. 2015;33(1):1-11. doi:10.1016/j.det.2014.09.001.
5. Mahler V, Diepgen T, Skudlik C, et al. Psoriasis predisposition and occupational triggering factors in the appraisal of occupational medical expertises. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014;12(6):519-529. doi:10.1111/ddg.12262.
6. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:227-255. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120225.
7. Kim J, Krueger JG. The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin*. 2015;33(1):13-23. doi:10.1016/j.det.2014.09.002.
8. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 1:8-16. doi:10.1159/000370220.
9. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9537):733-743. doi:10.1016/S0140-6736(06)69283-0.
10. Mancini AJ, Kaulback K, Chamlin SL. The socioeconomic impact of atopic dermatitis in the United States: a systematic review. *Pediatr Dermatol*. 25(1):1-6. doi:10.1111/j.1525-1470.2007.00572.x.
11. Ong PY. New insights in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Pediatr Res*. 2014;75(1-2):171-175. doi:10.1038/pr.2013.196.

12. Silverberg NB, Silverberg JI. Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis? *Cutis*. 2015;96(6):359-361.
13. Elias PM, Steinhoff M. "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1067-1070. doi:10.1038/jid.2008.88.
14. Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(6):1337-1343. doi:10.1016/j.jaci.2008.01.022.
15. Weidinger S, Rodríguez E, Stahl C, et al. Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):724-726. doi:10.1038/sj.jid.5700630.
16. Filipowska-Grońska A, Weryńska-Kalemba M, Bożek A, et al. The frequency of polymorphic variants of filaggrin gene and clinical atopic dermatitis. *Postępy dermatologii i Alergol*. 2016;33(1):37-41. doi:10.5114/pdia.2015.48036.
17. Brown SJ, McLean WHI. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 2):751-762. doi:10.1038/jid.2011.393.
18. Riethmuller C, McAleer MA, Koppes SA, et al. Filaggrin breakdown products determine corneocyte conformation in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1573-1580.e1-e2. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.042.
19. Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res*. 1996;288(8):442-446.
20. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*. 1990;29(40):9432-9440.
21. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 2):949-963. doi:10.1038/jid.2011.435.
22. Novak N, Koch S, Allam J-P, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):50-59. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.019.

23. Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(5):1110-1118. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.053.
24. Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2013;69(2):89-94. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.11.002.
25. Palumbo S, Bosetti F. Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: role of cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;89(5):273-278. doi:10.1016/j.plefa.2013.08.008.
26. Yan S, Xu Z, Lou F, et al. NF- κ B-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nat Commun*. 2015;6:7652. doi:10.1038/ncomms8652.
27. Andrés RM, Montesinos MC, Navalón P, Payá M, Terencio MC. NF- κ B and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: in vitro and in vivo effects of BTH. *J Invest Dermatol*. 2013;133(10):2362-2371. doi:10.1038/jid.2013.182.
28. Zheng X-F, Sun Y-D, Liu X-Y. Correlation of expression of STAT3, VEGF and differentiation of Th17 cells in psoriasis vulgaris of guinea pig. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(4):313-316. doi:10.1016/S1995-7645(14)60046-8.
29. Sano S, Chan KS, Carbajal S, et al. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*. 2005;11(1):43-49. doi:10.1038/nm1162.
30. Miyoshi K, Takaishi M, Nakajima K, et al. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol*. 2011;131(1):108-117. doi:10.1038/jid.2010.255.
31. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):726-741. doi:10.1124/pr.58.4.5.
32. Gupta M, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Rawat R. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: the “future” in

- dermatology therapeutics? *Arch Dermatol Res.* 2015;307(9):767-780. doi:10.1007/s00403-015-1571-1.
33. Ellis CN, Varani J, Fisher GJ, et al. Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative skin disease: ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibit keratinocyte proliferation. *Arch Dermatol.* 2000;136(5):609-616.
 34. Kuenzli S, Saurat J-H. Effect of topical PPARbeta/delta and PPARgamma agonists on plaque psoriasis. A pilot study. *Dermatology.* 2003;206(3):252-256. doi:68897.
 35. Mastrofrancesco A, Kovacs D, Sarra M, et al. Preclinical studies of a specific PPAR γ modulator in the control of skin inflammation. *J Invest Dermatol.* 2014;134(4):1001-1011. doi:10.1038/jid.2013.448.
 36. Kömüves LG, Hanley K, Man MQ, Elias PM, Williams ML, Feingold KR. Keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis: topical application of PPARalpha activators restores tissue homeostasis. *J Invest Dermatol.* 2000;115(3):361-367. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00076.x.
 37. Rau KK, Jiang N, Johnson RD, Cooper BY. Heat sensitization in skin and muscle nociceptors expressing distinct combinations of TRPV-1 and TRPV2 protein. *J Neurophysiol.* 2007;97(4):2651-2662. doi:10.1152/jn.00840.2006.
 38. Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:135-161. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958.
 39. Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, et al. TRPV-1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci.* 2009;29(1):153-158. doi:10.1523/JNEUROSCI.4901-08.2009.
 40. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-824. doi:10.1038/39807.
 41. Szallasi A, Sheta M. Targeting TRPV-1 for pain relief: limits, losers and laurels. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012;21(9):1351-1369. doi:10.1517/13543784.2012.704021.

42. Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol*. 2006;4(3):197-206.
43. Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M, et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*. 2014;510(7503):157-161. doi:10.1038/nature13199.
44. Roblin D, Yosipovitch G, Boyce B, et al. Topical TrkA Kinase Inhibitor CT327 is an Effective, Novel Therapy for the Treatment of Pruritus due to Psoriasis: Results from Experimental Studies, and Efficacy and Safety of CT327 in a Phase 2b Clinical Trial in Patients with Psoriasis. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(5):542-548. doi:10.2340/00015555-2047.
45. Akinduro O, Sully K, Patel A, et al. Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol*. March 2016. doi:10.1016/j.jid.2016.03.016.
46. Douroudis K, Kingo K, Traks T, et al. Polymorphisms in the ATG16L1 gene are associated with psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(1):85-87. doi:10.2340/00015555-1183.
47. Lee H-M, Shin D-M, Yuk J-M, et al. Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *J Immunol*. 2011;186(2):1248-1258. doi:10.4049/jimmunol.1001954.
48. Choi JH, Jin SW, Han EH, et al. Platycodon grandiflorum root-derived saponins attenuate atopic dermatitis-like skin lesions via suppression of NF- κ B and STAT1 and activation of Nrf2/ARE-mediated heme oxygenase-1. *Phytomedicine*. 21(8-9):1053-1061. doi:10.1016/j.phymed.2014.04.011.
49. Choi JK, Oh H-M, Lee S, et al. Oleanolic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;269(1):72-80. doi:10.1016/j.taap.2013.03.001.
50. Behshad R, Cooper KD, Korman NJ. A retrospective case series review of the peroxisome proliferator-activated receptor ligand rosiglitazone in the treatment of atopic dermatitis. *Arch Dermatol*. 2008;144(1):84-88. doi:10.1001/archdermatol.2007.22.
51. Yan Y, Furumura M, Numata S, et al. Various peroxisome proliferator-activated

- receptor (PPAR)- γ agonists differently induce differentiation of cultured human keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2015;24(1):62-65. doi:10.1111/exd.12571.
52. Chiba T, Takeuchi S, Esaki H, et al. Topical application of PPAR α (but not β/δ or γ) suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Allergy*. 2012;67(7):936-942. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02844.x.
 53. De Belilovsky C, Roo-Rodriguez E, Baudouin C, Menu F, Chadoutaud B, Msika P. Natural peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist cream demonstrates similar therapeutic response to topical steroids in atopic dermatitis. *J Dermatolog Treat*. 2011;22(6):359-365. doi:10.3109/09546634.2010.499932.
 54. Roelandt T, Heughebaert C, Bredif S, et al. Cannabinoid receptors 1 and 2 oppositely regulate epidermal permeability barrier status and differentiation. *Exp Dermatol*. 2012;21(9):688-693. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01561.x.
 55. Nam G, Jeong SK, Park BM, et al. Selective Cannabinoid Receptor-1 Agonists Regulate Mast Cell Activation in an Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis Model. *Ann Dermatol*. 2016;28(1):22-29. doi:10.5021/ad.2016.28.1.22.
 56. Kim HJ, Kim B, Park BM, et al. Topical cannabinoid receptor 1 agonist attenuates the cutaneous inflammatory responses in oxazolone-induced atopic dermatitis model. *Int J Dermatol*. 2015;54(10):e401-e408. doi:10.1111/ijd.12841.
 57. Bevan S, Quallo T, Andersson DA. TRPV-1. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;222:207-245. doi:10.1007/978-3-642-54215-2_9.
 58. Yun J-W, Seo JA, Jeong YS, et al. TRPV-1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. *J Dermatol Sci*. 2011;62(1):8-15. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.10.014.
 59. Yun J-W, Seo JA, Jang W-H, et al. Antipruritic effects of TRPV-1 antagonist in murine atopic dermatitis and itching models. *J Invest Dermatol*. 2011;131(7):1576-1579. doi:10.1038/jid.2011.87.
 60. Ilves T, Tiitu V, Suttle M-M, Saarinen JV, Harvima IT. Epidermal Expression of Filaggrin/Profilaggrin Is Decreased in Atopic Dermatitis: Reverse Association With Mast Cell Tryptase and IL-6 but Not With Clinical Severity. *Dermat contact, atopic, Occup drug*. 26(6):260-267. doi:10.1097/DER.0000000000000143.

61. Oka S, Wakui J, Ikeda S, et al. Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J Immunol.* 2006;177(12):8796-8805.
62. Karnan M, Thangavel K. Automatic detection of the breast border and nipple position on digital mammograms using genetic algorithm for asymmetry approach to detection of microcalcifications. *Comput Methods Programs Biomed.* 2007;87(1):12-20. doi:10.1016/j.cmpb.2007.04.007.
63. de Carvalho Filho AO, de Sampaio WB, Silva AC, de Paiva AC, Nunes RA, Gattass M. Automatic detection of solitary lung nodules using quality threshold clustering, genetic algorithm and diversity index. *Artif Intell Med.* 2014;60(3):165-177. doi:10.1016/j.artmed.2013.11.002.
64. Kolmogorov A. *Grundbegriffe Der Wahrscheinlichkeitsrechnung, von A. Kolmogoroff.* Berlin: J. Springer; 1933.
65. Santha S, Dwivedi C. Anticancer Effects of Sandalwood (*Santalum album*). *Anticancer Res.* 2015;35(6):3137-3145.
66. Torres M, Rodríguez-Serrano F, Rosario DJ, Rodríguez-Perez F, Toro DH. Does *Silybum marianum* play a role in the treatment of chronic hepatitis C? *P R Health Sci J.* 2004;23(2 Suppl):69-74.
67. Togni S, Maramaldi G, Di Pierro F, Biondi M. A cosmeceutical formulation based on boswellic acids for the treatment of erythematous eczema and psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:321-327. doi:10.2147/CCID.S69240.
68. Klövekorn W, Tepe A, Danesch U. A randomized, double-blind, vehicle-controlled, half-side comparison with a herbal ointment containing *Mahonia aquifolium*, *Viola tricolor* and *Centella asiatica* for the treatment of mild-to-moderate atopic dermatitis. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2007;45(11):583-591.