

# Una mezcla de colágeno y extractos botánicos activa seis genes de colágeno en los fibroblastos.

**Objetivo:** evaluar los beneficios de una mezcla de colágeno y compuestos botánicos en la expresión del genoma focalizada en fibroblastos.

**Patrocinador:** LifeVantage Corp.

**Investigador principal:** LifeVantage Corp.

**Referencia:** LifeVantage Corp., Lehi, Utah, USA (LV-56)

---

## Presentación

Hemos investigado una mezcla de colágeno y compuestos botánicos sintetizados en un shot listo para beber que contiene 10 tipos distintos de péptidos hidrolizados de colágeno de pescado junto con cereal de quinoa roja y una mezcla de arándanos y cítrico Ponkan joven.

Varios ingredientes encontrados en la mezcla de colágeno y compuestos botánicos, como la quinoa roja y la mezcla de cítrico Ponkan joven y arándanos, han sido evaluados in vitro por su capacidad para potenciar la secreción de colágeno, con excelentes resultados.

Se ha demostrado que la quinoa roja activa y regula los genes de la barrera de la piel además de aumentar de forma significativa la activación de los genes *COL1A2*, los cuales codifican una proteína que es un elemento clave de la producción de colágeno del Tipo 1.

El colágeno Tipo 1 es el tipo más abundante que se encuentra en el cuerpo humano.

La evaluación de la eficacia de la quinoa roja también se ha realizado en sujetos humanos y ha mostrado mejoras significativas en la humidificación de la piel, su brillo, su suavidad y la aparición de las patas de gallo, además de la densidad del colágeno de la piel.

Para entender mejor los beneficios de la combinación completa de ingredientes de la mezcla de colágeno y compuestos botánicos, no solo de sus ingredientes individuales, se han llevado a cabo estudios más específicos centrados en la expresión genética.

Se han investigado genes adicionales implicados en la producción de colágeno, genes de soporte estructural y genes de la barrera.

### *Fibroblastos*

Seleccionar el tipo de célula correcto fue el primer paso clave en el desarrollo de un protocolo para este estudio de la expresión genética. Se eligieron primero los fibroblastos porque estos fueron empleados en los estudios originales sobre la quinoa roja, y queríamos tener una comparación clara entre los resultados sobre la quinoa roja en comparación a la mezcla entera de colágeno y compuestos botánicos. Este tipo de célula también fue seleccionada porque los fibroblastos se encuentran en todo el cuerpo. Su papel primario es proporcionar soporte a los tejidos. El papel de los fibroblastos en la piel específicamente es producir y organizar los componentes de la piel que actúan como bastida o soporte para la piel a través de proteínas, incluyendo colágeno, elastina y laminina.

Los fibroblastos producen el colágeno y las proteínas de la matriz extracelular para la piel y los órganos a través del cuerpo, incluyendo los intestinos, el bazo, el cerebro, los pulmones, el hígado, los riñones y los vasos sanguíneos, lo que los convierte en esenciales para la salud estructural general. Proporcionan soporte a las estructuras capilares. Los fibroblastos cardíacos en las paredes del corazón dan soporte al ritmo cardíaco. Los músculos contienen tres capas de fibroblastos que dan soporte a los músculos relacionados con el esqueleto. También son importantes para los tendones y los huesos. Como resultado, los fibroblastos poseen la versatilidad funcional que permite la investigación de una amplia gama de posibles efectos cuando se tratan con la mezcla de colágeno y compuestos botánicos.

Se utilizó la expresión genética focalizada para investigar estas potenciales influencias.

### *¿Qué es la expresión genética focalizada?*

La expresión genética focalizada se refiere a la activación o expresión de un gen en concreto de forma deliberada en un tejido en concreto, un tipo de célula o bajo condiciones específicas.

La expresión genética focalizada se refiere a la activación o expresión de un gen en concreto de forma deliberada en un tejido en concreto, un tipo de célula o bajo condiciones específicas. Esencialmente, la expresión genética focalizada nos otorga un control preciso sobre condiciones experimentales y nos permite estudiar las funciones de los genes de interés en un entorno simplificado y aislado. Al usar células fibroblastos, podemos regular variables como el tiempo y la dosis, haciendo que sea más fácil entender cómo un gen específico afecta al comportamiento de los fibroblastos. Los estudios in vitro son además más rápidos, menos costosos y éticamente menos complejos que los experimentos "in vivo", lo

---



que los convierte en candidatas ideales para los ensayos de alto rendimiento antes de avanzar a otros modelos.

La expresión genética cambia a medida que nos hacemos mayores y, en muchos casos, pueden ralentizarse o disminuir en fibroblastos, particularmente en el caso de los genes implicados en el mantenimiento, reparación y regeneración de la producción de colágeno. Esto tiene como resultado las arrugas en la piel, la debilitación de los huesos, la reducción de la elasticidad de la piel y el adelgazamiento epidérmico.

En este estudio hemos buscado los genes directamente implicados en los procesos de construcción del colágeno, así como los genes que degradan el colágeno y los genes de la función de barrera de la epidermis. El colágeno Tipo 1 (COL1A1 y COL1A2) es un componente muy importante de la piel, los huesos, los tendones, los ligamientos y los dientes. Forma unas fibras de colágeno espesas que proveen fuerza tensora y soporte estructural. El colágeno Tipo 2 (COL2A1) también provee con fuerza tensora y soporte estructural. Se encuentra principalmente en el cartílago elástico y el cartílago hialino -un tipo de cartílago translúcido que se encuentra principalmente en las articulaciones-, y permite al cartílago resistir la compresión y mantener la forma. El colágeno Tipo 3 (COL3A1) se encuentra junto con el Tipo 1 en la piel, los pulmones y los vasos sanguíneos. Da a estos tejidos la flexibilidad y la fuerza que necesitan para el funcionamiento adecuado, lo cual es importante en los órganos que necesitan expandirse y retraerse. El colágeno Tipo 7 (COL7A1) ancla la capa superior de la piel a la dermis inferior, lo que da soporte a la elasticidad y mantiene la piel fuerte e intacta. El colágeno Tipo 13 (COL13A1) es importante para mantener la integridad de la capa epitelial que se encuentra a lo largo de todo el cuerpo. La elastina (*ELN*) también fue un gen de interés en el estudio porque permite el enlace transversal de fibras elásticas de forma que se puedan expandir y contraer.

Otros genes investigados fueron los *MMP1* y *MMP9*, dos genes que codifican las metaloproteinasas matriz 1 y 9, enzimas altamente implicados en los procesos de degradación del colágeno.

El último conjunto examinado fue el de los genes de las proteínas estructurales clave implicadas en la formación y el funcionamiento de la barrera epidérmica de la piel. La claudina 1 (*CLDN1*) codifica una proteína de articulación estrecha y es una parte integral del control de la permeabilidad de la piel y la barrera de la piel respecto a la pérdida de agua. La filagrina (*FLG*) codifica un filamento de queratina agregado, también crucial para la hidratación de la piel, la integridad de la barrera y el control del pH de la piel. Tanto la loriscrina (*LOR*) como la involucrina (*IVL*) llevan a la producción de proteínas estructurales de la piel que proporcionan fuerza mecánica y una barrera a la capa de la piel córnea —la parte más externa de la epidermis.

## MÉTODOS

### *Expresión del genoma focalizada en fibroblastos (células CCD-986Sk)*

El estudio se llevó a cabo en tres partes:

1. Un estudio de determinación de dosis
2. Un estudio de expresión genética simple para verificar la temporalización y concentración de las dosis
3. Un estudio de la expresión genética focalizada de todos los genes de interés usando RT-qPCR

Una vez determinada la dosificación adecuada y los puntos temporales para la evaluación, los fibroblastos se trataron con y sin la mezcla de colágeno y compuestos botánicos.

### *qPCR a tiempo real de la expresión genética focalizada*

Se procuraron células CCD-986SK durante todo el ATCC (ATCC Cat.# CRL-1947). Se cultivaron células en un medio de cultivo IMDM con L-glutamina, suplementado con un suero bovino fetal al 10% y una solución antibiótica al 1% P/S..

Se cultivaron células en un medio de cultivo IMDM con L-glutamina, suplementado con un suero bovino fetal al 10% y una solución antibiótica al 1% P/S. En el caso de los estudios de expresión, las células se sembraron con un 70% de confluencia en placas de petri de tejidos de 10 cm y se expusieron al agente de prueba el día siguiente. Con los tiempos indicados, se extrajo ARN usando el Mini Kit PureLink RNA (Thermo-Fisher Scientific, Waltham MA, N° Catálogo 12183018A). Las células se sometieron a lisis en la placa usando 600 µL de tampón de lisis; excepto en este caso, se siguieron todas las instrucciones del fabricante. Se diluyó el ARN con 45 µL de agua libre de ARN y se cuantificó la solución en una UV5 Nano (Mettler Toledo).

La síntesis de la primera cadena de cADN se llevó a cabo con 0,5 µg de ARN, usando SuperScript VILO Master Mix (Thermo-Fisher Scientific, N° Catálogo # 11755050) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una disolución de 6 pliegues con cada cADN en agua grado PCR, y 6,5 µL de esta solución se analizaron con qRT-PCR. (Tabla 1)

PCR primers were purchased from Thermo Fisher Scientific as follows:



**Tabla 1.**

Símbolo	Identificador	Etiqueta
COL1A1	Hs00164004_m1	FAM
COL1A2	Hs01028956_m1	FAM
COL2A1	Hs00264051_m1	FAM
COL3A1	Hs00943809_m1	FAM
COL7A1	Hs00164310_m1	FAM
COL13A1	Hs01103890_m1	FAM
ELN	Hs00355783_m1	FAM
MMP1	Hs00899658_m1	FAM
MMP9	Hs00957562_m1	FAM
CLDN1	Hs00221623_m1	FAM
FLG	Hs00856927_g1	FAM
LOR	Hs01894962_s1	FAM
IVL	Hs00846307_s1	FAM
ACTB	Hs01060665_g1	VIC

Las reacciones se completaron en un volumen total de 15  $\mu$ L según sigue: 6,5  $\mu$ L cADN, 6  $\mu$ L agua grado PCR, 0,5  $\mu$ L muestra gen bajo estudio (etiqueta FAM label), 0,5  $\mu$ L muestra de actina (etiqueta VIC), 7,5  $\mu$ L Mezcla Maestra de Actuación Rápida Taqman (Thermo Fisher Scientific, N° Catálogo #4444963). Las reacciones se ejecutaron en un Instrumento PCR a tiempo real de Applied Biosystems QuantStudio (Thermo Fisher Scientific) bajo las siguientes condiciones: 50°C - 2 minutos, 95°C - 20 segundos, 40 ciclos de (95°C – 3 segundos, 60°C – 30 segundos). El ciclo umbral (CT) fue determinado por el software del instrumento. Las diferencias en el ciclo del umbral entre el gen bajo estudio y la actina ( $\Delta C_t$ ) se determinaron para cada mezcla y se utilizaron para determinar la inducción de pliegues de cada gen bajo estudio, en comparación a controles sin tratamiento (método  $\Delta\Delta C_t$  [Delta Delta Ct]).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias a los estudios anteriores, sabemos que la quinoa roja aumentó la expresión genética de *COL1A2* en un 43% y disminuyó la expresión de *MMP9* en un 33%. Este estudio demostró que la mezcla de colágeno y componentes botánicos, junto con sus ingredientes en sinergia, incluyendo la quinoa roja, aumentó la expresión de *COL1A2* en un 130% y disminuyó la expresión de *MMP9* en un 79%. También presenciamos una disminución en otro gen de un enzima de degradación del colágeno, el *MMP1*, en un 57% (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cambios en las expresiones del genoma de *COL1A2*, *MMP9* y *MMP1* después del tratamiento con la mezcla de colágeno y compuestos botánicos..

Gen	Quinoa roja sola	Mezcla de colágeno y compuestos botánicos
COL1A2	Aumento del 43%	Aumento del 130%
MMP9	Disminución del 33%	Disminución del 79%
MMP1	-	Disminución del 57%



Además, se activaron 5 genes de colágeno adicionales juntamente con otros genes estructurales (Tabla 3).

**Tabla 3.** Además, se activaron 5 genes de colágeno adicionales juntamente con otros genes estructurales (Tabla 3).

Gen	Mezcla de colágeno y compuestos botánicos
COL1A1	33%
COL2A1	169%
COL3A1	59%
COL7A1	31%
COL13A1	15%
ELN	18%
CLDN1	208%
FLG	27%
LOR	33%
IVL	42%

## CONCLUSIÓN

Los fibroblastos son una parte integral de nuestros órganos estructurales y nuestra piel, ejemplos de lo cual son los intestinos, el bazo, el cerebro, la piel, las articulaciones, los pulmones, el hígado, los riñones y los vasos sanguíneos. Estos proporcionan la base al sistema vascular y los músculos relacionados con el esqueleto, los huesos y los tendones, por lo que estos fueron un excelente tipo celular para estudiar los efectos beneficiosos de la mezcla de colágeno y compuestos botánicos.

La mezcla de colágeno y compuestos botánicos combina los péptidos de colágeno marino con los compuestos botánicos que han mostrado de forma individual estimular la síntesis de colágeno y apoyar la barrera de la piel además de reducir el MMP9, un enzima que destruye el colágeno. A partir de un estudio del consumidor sobre la quinoa roja, los testigos subjetivos informaron de efectos beneficiosos en la apariencia de la piel, la salud de las articulaciones y el bienestar general.

El objetivo de la nueva investigación era mostrar los beneficios en sinergia de la totalidad de la mezcla de colágeno y compuestos botánicos, utilizando como cimientos los datos de estudios existentes sobre los ingredientes en concreto. Elegimos investigar los fibroblastos a causa de su importancia en el cuerpo. Esto nos permitió focalizar sobre genes implicados en la síntesis de colágenos Tipo I, II, III, VII y XIII, además de otras proteínas estructurales de la piel.

Observamos que la expresión genética aumenta en todos los componentes de proteínas estructurales y colágenos probados. Fue especialmente alentador observar que la mezcla de colágeno y compuestos botánicos activaba ambos genes requeridos para crear las fibras de proteína 2-alpha1(I) y 1-alpha2(I) que sintetizan una proteína de colágeno Tipo 1 completa, la proteína más abundante en el cuerpo humano. Ambos genes *COL1A1* y *COL1A2* se activaron en un 33% y un 130%, respectivamente. Los otros genes de colágeno investigados, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL7A1* y *COL13A1*, también aumentaron en un 169%, 59%, 31% y 15%, respectivamente. La mezcla de colágeno y compuestos botánicos aumentó la expresión de *COL1A2* por 3x en comparación al ingrediente de la quinoa roja por independiente. Esta sinergia también se observó con la disminución en la expresión genética de *MMP9*, de un -33% a un -79%. Junto con la disminución del otro gen de metaloproteínasa matriz *MMP1* en un 57%.

Se activaron otros genes estructurales y de barrera para apoyar la producción de las proteínas estructurales y de la barrera de la piel. La expresión genética de elastina (*ELN*) aumentó en un 18%, la de claudina-1, (*CLDN1*) en un 208%, la de filagrina, (*FLG*) en un 27%, la de lorricrina, (*LOR*) en un 33% y la de involucrina, (*IVL*) en un 42%. Cada uno de estos genes contribuye a la activación de los péptidos y las proteínas que dan apoyo estructural a una piel más sana desde dentro y desde fuera.

Esto demuestra que los efectos de la sinergia entre los componentes que componen la mezcla de colágeno y compuestos botánicos pueden tener un impacto significativo en su salud, tanto interna como externamente.

