



**MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS**  
**IP LAWYERS**

**BOGOTA - COLOMBIA**

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

Bogotá D.C., 6 de agosto de 2018

Señores  
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
Ciudad

**REFERENCIA: Expediente No. 16 – 102.140**

**TÍTULO: “COMPOSICIÓN COSMÉTICA LIPOSOMADA CON UNA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS, SALES DE ZINC Y EXTRACTOS DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS CON ENZIMAS REPARADORAS DEL ADN”**

**SOLICITANTE: DERMOPARTNERS, S.L.**

**TRÁMITE: Respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 3.127 del 21 de marzo de 2018.**

**JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**, en mi condición de apoderado de la sociedad **DERMOPARTNERS, S.L.**, dentro del término legal, presento respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 3.127 del 21 de marzo de 2018.

## **1. DE LA SOLICITUD DE PATENTE.**

### **REIVINDICACIONES (Art 30 D 486, Art 22 PCT)**

El Examinador objeto el capítulo reivindicatorio porque:

*“La reivindicación 1 carece de sustento descriptivo, debido a que se incluyen rangos porcentuales de los componentes que no se encuentran divulgados en la solicitud original, la siguiente tabla describe la materia para cuyo alcance no existe soporte descriptivo:....”.*

Visite nuestra página web: [www.mdelaw.com](http://www.mdelaw.com)



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

*“La reivindicación 1 carece de claridad y concisión ya que la expresión “extracto” es ambigua, no se define el tipo de extracto ya que los componentes obtenidos difieren de dependiendo del solvente o mezclas de estos y la técnica de obtención del extracto por lo cual el extracto debe definirse incluyendo el medio de extracción utilizado”.*

*“La reivindicación 1 abarca una sal de zinc que incluye las sales cloruro, gluconato, clorhidrato, no es claro a qué se refiere la solicitante con la sal clorhidrato, o qué diferencia existe entre esta y el cloruro de zinc, si la solicitante se está refiriendo a los hidratos de cloruro de zinc debe indicar a cuál de los cuatro hidratos de cloruro de zinc se está refiriendo. De igual forma, la expresión “o análogas”, es ambigua y abarca materia que no es apropiada para una composición cosmética, ya que existen sales de zinc que no son adecuadas para uso cosmético debido a su toxicidad o capacidad irritante como por ejemplo el fosforo de zinc el cual es un veneno rodenticida e insecticida. En consecuencia, no es claro cómo cualquier sal de zinc es apropiada para la presente solicitud”.*

*“No es claro en la reivindicación 1 si la concentración de 10 a 15% corresponde a la concentración de zinc en la formulación, a la concentración de la sal de zinc con respecto al liposoma o a la concentración de liposomas que contienen una sal de zinc con respecto a peso total de la composición”.*

*“La reivindicación 1 carece de claridad ya que se indica un % de concentración de cada uno de los componentes, pero no se establecen las unidades de dicho porcentaje, si son p/p o p/v”.*

*“La reivindicación 3 carece de coherencia con la reivindicación de la que depende ya que esta indica la pureza de la fosfatidil colina (lecitina) como agente de formulación de los liposomas, sin embargo, la reivindicación 1 no señala un único agente formador de liposomas, sino que permite la utilización de cualquiera, por lo tanto, no es claro cuándo se va a utilizar fosfatidil colina y en qué situaciones se utilizaría otro agente para la formación de los liposomas. Tampoco existe soporte en la descripción que permita establecer que todas las formulaciones liposomales propuestas están desarrolladas con base en fosfatidil colina bajo dicho grado de pureza”.*

**R/:** El solicitante **de acuerdo con las observaciones del Examinador**, procedió a modificar y aclarar algunas de las expresiones objetadas, tal como se indica a continuación:

Se indica que la **Reivindicación 1** carece de sustento descriptivo por **incluir rangos porcentuales** que no se encuentran divulgados en la solicitud original.

Visite nuestra página web: [www.mdelaw.com](http://www.mdelaw.com)



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

En este sentido, toda memoria descriptiva muestra realizaciones preferentes de la invención reivindicada como ejemplos preferentes que no implica que cualquier realización deba ser idéntica a la indicada y en las reivindicaciones se establecen unos rangos fuera de los cuales el inventor considera que la invención nos soluciona al problema propuesto en la misma.

También se indica que “los rangos de concentración de los componentes no han sido divulgados en la solicitud original tal como fue radicada en este Despacho, y en consecuencia la materia reclamada carece de sustento descriptivo y corresponde a una ampliación de la solicitud original.”

En este sentido la solicitante expone que los **rangos de concentración** fueron divulgados como tales en la publicación de la solicitud original de la **PCT/ES2013/070818** con fecha 4 de junio de 2015 con el número **WO2015079074** por lo que, respetuosamente, exponemos que en ningún momento puede suponer una ampliación de la solicitud original

La indicación de **extracto de plancton en la Reivindicación 1** se ha concretado a que se refiere a un **extracto hidroalcohólico** sin que esta característica del mismo suponga una ampliación del objeto de la invención al limitar el tipo de extracto al que se refiere. Se **incluye en esta contestación la ficha técnica del componente** en cuestión.

Por lo referente a los reparos señalados en cuanto a la **sal de zinc utilizada** y a la expresión “**análogas**” han sido **modificadas las Reivindicaciones eliminando la expresión “análogas” y limitando las sales de Zinc, a dos.**



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIP – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

En la **memoria aportada** se indica la **concentración de Zinc** en la **formulación** y se ha **aclarado en las nuevas Reivindicaciones** que el **porcentaje es de liposomas con este ingrediente con respecto al total de la formulación.**

También se ha **aclarado** que las **expresiones de porcentajes** son todas en **peso con respecto al peso de la formulación total** indicando tanto en la **descripción como en las reivindicaciones p/p.**

Por lo referente a las **Reivindicaciones 2 y 3** relativas a la inclusión por separado de cada principio activo en liposomas para dar mayor estabilidad al conjunto de la composición y en cuanto a la pureza de la fosfatidil colina, la **Reivindicación 2 se ha sido fusionado con la Reivindicación 1,** especificando que los liposomas incluyen los principios activos por separado.

En cuanto a que la **Reivindicación 3** carece de coherencia con la descripción y que hace referencia a la pureza de la fosfatidil colina **se elimina esta reivindicación superándose el reparo señalado.**

Por lo expresado anteriormente, el solicitante considera que las modificaciones mencionadas superan todas las objeciones a las reivindicaciones originales. Por lo cual pone a consideración del Examinador Técnico de Patentes un **NUEVO CAPITULO REIVINDICATORIO** el cual consta de una **(1) nueva reivindicación** en un folio.



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

### 3. ANÁLISIS DE PATENTABILIDAD.

#### Nivel Inventivo (Art. 18 D486)

El Examinador objeto el nivel inventivo de las reivindicaciones 1 - 3 con los documentos **D1 (US2003/0223982)**, **D2 (ES 2423760)** y **D3 (US20090220481)** porque:

*“El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga una composición cosmética o farmacéutica que comprende fotoliasa y/o T4 endonucleasa V, al menos una sustancia seleccionada de vitaminas, provitaminas o vitaminas precursoras de vitamina B, al menos un extracto de planta y al menos otra sustancia inhibidora de colagenasa MMP 1 (Pág. 14, reiv. 14);”.*

*“La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición divulgada en D1 consiste en la inclusión de liposomas individuales para cada principio activo en la composición cosmética. “En consecuencia, la reivindicación 1 carece de novedad, según lo divulgado en los documentos D1, D2 y D3 de forma independiente.”.*

*“En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría el uso de los liposomas individuales para cada principio activo de la composición del documento D2 en la composición divulgada en el documento D1 para así llegar al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia”.*

*“Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 y 3 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.”.*

*“La diferencia entre la formulación de D3 y las composiciones de la presente solicitud, consiste en que la anterioridad no divulga de manera explícita que los activos puedan estar contenidos en el interior de liposomas y tampoco se señala la presencia de una sal de zinc”.*

*“En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la adición de activos encapsulados en liposomas individuales para incrementar su estabilidad como lo enseña el documento D2 en la composición divulgada en el documento D3 para así llegar al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud, la cual es una formulación alternativa. Por lo cual se considera obvia”.*



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTÁ - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIP – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

*“La reivindicación 2 carece de nivel inventivo, porque el documento D2 enseña que los componentes activos de la formulación renovadora se adicionan a la formulación en forma de liposomas individuales (Pág. 2, párrafo [0005])”.*

**R/:** Nuestro poderdante se permite manifestar en cuanto a las objeciones de **falta de nivel inventivo de la invención** por parte del Examinador, lo siguiente:

La solicitante se permite adjuntar **el estudio completo del efecto producido por la combinación de enzimas reparadores y sales de zinc.**

En lo referente a la falta de concreción de la expresión “**análogas**”, esta **ha sido eliminada de la Reivindicación 1** y se han especificado únicamente **dos sales de zinc lo que no supone una ampliación del objeto de la invención.**

En el **estudio adjunto** se demuestra como la inclusión de enzimas reparadoras y sales de zinc reducen los dímeros de timina en un 36% +/- 15% respecto a la crema vacía y también se aprecia una reducción en los otros casos con respecto al control.

Se puede apreciar en el estudio aportado **aclaraciones a los resultados medibles referentes a la reparación celular.**

Más concretamente lo referente a que lo que se presenta en la Figura 3 sobre los resultados a tiempos  $t=0$  y  $t=15$  no son estadísticamente significativos en cuanto a la expresión de la histona H2AX, en este sentido queremos indicar se observa que los niveles de H2AX disminuyen de manera similar a como lo hacen los niveles de DT a  $t=15$ , indicando una

Visite nuestra página web: [www.mdelaw.com](http://www.mdelaw.com)



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTÁ - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

correlación entre la expresión de H2AX y la presencia de DT. Sin embargo, debido a la alta variabilidad detectada en el control, la disminución no es estadísticamente significativa. Esto no implica más que el hecho de que debido a la variabilidad de los resultados en el control no se puede deducir que haya una relación clara entre la disminución de los niveles de la H2AX en la reparación endógena.

La solicitante se reitera sus argumentos referentes a los efectos reparadores de la piel, ya que no es extrapolable el hecho de que el uso de enzimas reparadoras por una parte más el uso de aminoácidos y sales de zinc y el resultado de la reducción de dímeros de timina, es decir, el efecto reparador sobre la piel vaya a ser la suma de los dos efectos de cada uno por separado.

Se está afirmando que en la Figura 5 la reducción de la barra Z es debida a la inclusión de aminoácidos, pero la solicitante afirma, sustentándose en las argumentaciones expuestas en nuestra anterior contestación al oficio, que **la inclusión de sales de zinc, en forma de cloruro o gluconato, son las que favorecen la reparación celular.**

En la **presente solicitud de patente de invención**, se está reivindicando **una composición que comprende un conjunto de principios activos liposomados por separado de tres tipos, por un lado los liposomas con las enzimas reparadoras** (característica ya divulgada en unos u otros de los documentos **D1, D2 y D3**), por otra parte **liposomas con aminoácidos** (característica divulgada en forma de aminoácidos o péptidos en unos u



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTÁ - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

otros de los documentos **D1, D2 y D3)** y por último **liposomas con sales de Zinc.**

El caso es que ninguno de los antecedentes señalados incluye **estos tres tipos de componentes formando un conjunto, con sus componentes liposomados por separado**, y el solicitante ha **demostrado en los estudios aportados que el conjunto tiene un efecto reparador de la piel y es un efecto superior al que pueden tener las enzimas reparadoras.**

Se está **reivindicando unas características que se refieren al conjunto de los componentes**, y es eso, **el conjunto, de los tres tipos de componentes liposomados por separado lo que se reivindica y cuyo efecto del conjunto se ha mostrado.** Las pruebas realizadas no permiten deducir si el efecto producido en la columna E se debe al conjunto de las cuatro enzimas reparadoras o solamente a una de ellas, pero lo que está claro es que tiene un efecto, lo mismo sucede en la columna Z donde no se puede deducir que los efectos se deban a un aminoácido concreto, o a todos ellos, pero lo que sí está claro es que uso del conjunto de todos ellos, enzimas, aminoácidos y sales de zinc produce un efecto claro.

Con ello, en el caso de obtener una resolución favorable, no se pretende tener la posibilidad de monopolizar el uso de cada uno de los componentes, o el hecho de que los componentes estén liposomados por separado, lo que se **reivindica es el conjunto cuyos efectos han sido probados.**

El solicitante ha incluido en una preparación cosmética un conjunto de **principios activos** y ha demostrado que **el conjunto tiene un efecto claro**



MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS  
IP LAWYERS

BOGOTA - COLOMBIA

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPi – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

**sobre la reparación de la piel** y pretende reivindicar esta preparación cosmética con este conjunto de componentes liposomados en estas proporciones cuyos efectos ha comprobado.

En conclusión, **ninguno de los documentos D1, D2 y D3** antecedentes señalados **incluye los tres tipos de componentes liposomados por separado y el titular de la patente ha comprobado que tiene un efecto reparador claro sobre la piel**, sin que se pueda afirmar que el efecto es fruto de la suma de los efectos de cada componente por separado, y una persona del oficio normalmente versada en la materia podría hacer muchas combinaciones de estos u otros principios activos, pero la **solicitante solamente reivindica este conjunto en las proporciones indicadas basándose en que ha comprobado que tiene un efecto claro.**

La mayoría de las invenciones se basan en combinar mecanismos, formas, componentes o disposiciones ya conocidas pero que dan lugar a un resultado beneficioso y suponen la solución a un problema existente y, **en el caso que nos ocupa se trata de favorecer la reparación de la piel al ser expuesta a rayos UV y se ha demostrado que la composición de la presente solicitud produce ese efecto reparador.**

En el mundo de la cosmética la mayoría de los principios activos son ya conocidos y en muchos casos son conocidos sus efectos y por ellos se utilizan en determinadas preparaciones cosméticas pero hay que probar que el conjunto tiene un efecto para lo que se destina, cosa que se ha hecho en este caso.



**MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS**  
**IP LAWYERS**

**BOGOTA - COLOMBIA**

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

Por lo anterior consideramos que, con las **modificaciones introducidas** en el **Capítulo Reivindicatorio propuesto**, que contiene **1 nueva Reivindicación**, los documentos **D1, D2 y D3** mencionados por el Examinador **no describen, ni revelan, ni enseñan las características técnicas de las Composición cosmética liposomada de la presente invención** de nuestro poderdante. Por lo tanto, la invención es **NOVEDOSA**, tiene **NIVEL INVENTIVO y APLICACIÓN INDUSTRIAL**, es decir cumple con los requisitos de exigidos por la Decisión 486 del Acuerdo de la Comisión de la Comunidad Andina; además, estamos dando respuesta al Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 3.127 del 21 de marzo de 2018.

Finalmente, el solicitante pone a consideración del Examinador Técnico de Patentes una **NUEVA DESCRIPCION, NUEVA REIVINDICACION 1 y FIGURAS**, en trece folios.

Por lo anteriormente mencionado, solicito respetuosamente se proceda a **CONCEDER** la Patente de Invención titulada: **“COMPOSICIÓN COSMÉTICA LIPOSOMADA CON UNA MEZCLA DE AMINOÁCIDOS, SALES DE ZINC Y EXTRACTOS DE PANTAS Y MICROORGANISMOS CON ENZIMAS REPARADORAS DEL ADN”** a nombre de la sociedad **DERMOPARTNERS, S.L.**, para la **nueva Reivindicación 1**.

Atentamente,



**JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

C.C. No. 19.270.955 Bogotá  
T.P. No. 43.308 C.S.J.

Visite nuestra página web: [www.mdelaw.com](http://www.mdelaw.com)



**MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS SAS**  
**IP LAWYERS**

**BOGOTA - COLOMBIA**

AK. 24 No. 37 31 Of. 202  
TEL. (571) 2444096 – 3690624 –  
2444938 - Fax (571) 2442496  
E-mail: [mde@mdelaw.com](mailto:mde@mdelaw.com)  
MIEMBROS  
INTA – ASIPI – AIPPI – ACPI  
AAAPI – ABPI – ABAPI

Anexo:

Nueva Descripción, Reivindicación (1), Dibujos, en trece folios.

Ficha técnica del componente en 15 folios.

Estudio sobre Reparación ADN 2012 en 28 folios.

Determinación de la Capacidad de Dos Compuestos para Reparar El ADN Dañado tras la exposición a radiación UV en 11 folios.

# **COMPOSICION COSMETICA LIPOSOMADA CON UNA MEZCLA DE AMINOACIDOS, SALES DE ZINC Y EXTRACTOS DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS CON ENZIMAS REPARADORAS DEL ADN**

5

## **OBJETO DE LA INVENCION**

La invención que se propone se refiere a un nuevo producto cosmético con propiedades reparadoras del ADN que ha sufrido daños  
10 después de la exposición de la piel a la radiación UV y que tiene su aplicación en el sector de los centros de belleza, cosmética y dermatología.

## **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

Se conocen hasta la fecha diferentes preparaciones para reparar el ADN que incluyen principios activos de varios tipos, pero no se conocen preparaciones que incluyan liposomas unilamelares de naturaleza fosfolipídica con ingredientes activos como: aminoácidos,  
20 sales de Zinc y enzimas reparadoras del ADN.

Lo mas próximo conocido dentro del estado de la técnica es la patente EP0707844, en la que se describe un producto para la reparación del ADN celular después de la exposición a radiación UV,  
25 donde los principios activos son complejos de vitaminas y polipéptidos, tirosina o sus derivados, glicoproteínas con iones metálicos de cobre, zinc o magnesio y enzimas reparadoras del ADN.

El producto descrito en esta patente utiliza derivados de la  
30 tirosina, vitaminas en un complejo proteico y forskolin, a diferencia del producto descrito en la presente memoria, además de incorporar una

fotoliasa.

Además, encapsulan en un mismo liposoma varios principios activos a diferencia de la invención aquí descrita, en la que se encapsulan en los liposomas cada principio activo por separado, lo que proporciona mayor estabilidad a cada uno de los liposomas y por ello al producto final.

No se conoce ningún producto para la reparación del ADN celular después de la exposición a radiación UV con las características de la presente invención.

La fosfatidilcolina empleada en la formulación del liposoma es una lecitina de pureza > 94%, mientras que la de la patente citada la pureza es del > 25%.

15

## **DESCRIPCION DE LA INVENCION**

El producto que la invención propone consiste en una preparación liposomada en la que los liposomas incorporan, como principios activos, una mezcla de los aminoácidos arginina, glicina, prolina, fenilalanina, cisteína, serina, tirosina, glutamina, metionina, junto con sales de Zinc (cloruro, gluconato, clorhidrato, etc ), además de otros principios activos que contienen enzimas reparadoras como arabidopsis thaliana, extracto de plancton, fermento lisado de bifida, lisado de micrococcus, etc.

25

Debido a sus rutas metabólicas podemos justificar la incorporación de los siguientes aminoácidos a la invención, pese a no estar en la fórmula:

30

Serina: es precursor de cisteína y glicina.

Tirosina: su precursor es fenilalanina. Se obtiene por hidroxilación de fenilalanina.

Metionina: producto intermedio de la síntesis de cisteína. Cisteína obtiene el átomo de azufre de metionina.

5

Glutamina: se sintetiza a través de la reacción química entre glutamato y el ion amonio y la glutamina puede convertirse en glutamato y la prolina se forma a partir de la cadena pentacarbonada del ácido glutámico.

10

La exposición de la piel a las radiaciones UV del sol da lugar a unos daños en el ADN de las células de la piel. Este daño puede ser medido, entre otras formas por los dímeros de timina o citosina que se producen en la cadena del ADN celular.

15

**REALIZACION PREFERENTE DE LA INVENCION**

Como realización preferente se propone un producto cosmético liposomado, que presenta distintas formas cosméticas como solución, serum, emulsión, suspensión etc. en el que los diferentes componentes se pueden encontrar en uno de los casos en las siguientes proporciones de ingrediente activo y de liposomas:

20

| COMPONENTE INCI    | % Total<br>(p/p) | % de Liposomas (p/p) |
|--------------------|------------------|----------------------|
| AGUA               | 70-80            |                      |
| GLICERINA          | 4-5              |                      |
| LECITINA           | 4-5              |                      |
| ALCOHOL            | 3-4              |                      |
| ACEITE DE CASTOR   |                  |                      |
| HIDROGENADO PEG-40 | 2-3              |                      |
| CICLOPENTASILOXANO | 2-3              |                      |

|                                     |      |                     |
|-------------------------------------|------|---------------------|
| POLISORBATO 20                      | 1    |                     |
| FENOXIETANOL                        | <1   |                     |
| COLATO DE SODIO                     | <0,5 |                     |
| CITRONELILO<br>METILCROTONATO       | <0,5 |                     |
| PERFUME                             | <0,5 |                     |
| ACETATO DE TOCOFEROL                | <0,5 |                     |
| ARGININA                            | <0,5 | ARGININA 6-7%       |
| DIMETICONA                          | <0,5 |                     |
| ETHYLHEXYLGLYCERIN                  | <0,5 |                     |
| POLISILICONA-11                     | <0,5 |                     |
| GLICINA                             | <0,5 | GLICINA 5-7%        |
| PROLINA                             | <0,5 | PROLINA 5-7%        |
| BUTILENGLICOL                       | <0,5 |                     |
| ACIDO LACTICO                       | <0,5 |                     |
| EDTA DISODICO                       | 0,1  |                     |
| CLORURO DE SODIO                    | <0,1 |                     |
| FERMENTO LISADO DE BIFIDA           | <0,1 | ENZIMAS BIFIDA 7-8% |
| CAPRILICO/CAPRICO<br>TRIGLICERIDO   | <0,1 |                     |
| FENILALANINA                        | <0,1 | FENILALANINA 5-7%   |
| CISTEINA                            | <0,1 | CISTEINA 5-7%       |
| EXTRACTO DE ARABIDOPSIS<br>THALIANA | <0,1 | ARABIDOPSIS 10-12%  |
| LISADO DE MICROCOCCUS               | <0,1 | MICROCOCCUS 10-12%  |
| HIDROXIDO SODICO                    | <0,1 |                     |
| EXTRACTO DE PLANCTON                | <0,1 | PLANCTON 6-7%       |
| DECILGLUCOSIDO                      | <0,1 |                     |
| CLORURO DE ZINC                     | <0,1 | ZINC 10-12%         |
| TEPRENONA                           | <0,1 | TREPENONA 7-8%      |

|                   |          |  |
|-------------------|----------|--|
| ACIDO CLORHÍDRICO | <0,1     |  |
| CAPRILILGLICOL    | <0,1     |  |
| HEXILENGLICOL     | <0,1     |  |
|                   | 100,0000 |  |

**DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Para complementar la descripción que se está realizando, y con  
5 objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del  
invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte  
integrante de la misma, una serie de figuras.

Una parte de las figuras incluidas en esta memoria se  
10 corresponden con los ensayos realizados sobre embriones de peces  
de la especie Medaka, con este tipo de productos y que nos  
demuestran su capacidad reparadora del ADN.

Del mismo modo, veremos como el mecanismo de acción para  
15 dicha reparación del ADN, es la activación de la expresión de las  
proteínas P53 y P21, que mediremos por PCR cuantitativa (qPCR).

En estas figuras, con carácter ilustrativo se ha representado lo  
siguiente:

20 Figura 1.- Muestra un esquema del efecto de la radiación UV sobre las  
cadenas de ADN y la formación de dímeros de timina, entre dos bases  
de una misma hélice de ADN.

25 Figura 2.- Presenta un esquema de los daños producidos en el ADN  
con respecto al control a tiempo 0 y a los 15 minutos. Este ensayo se  
realiza con muestras NO tratadas, donde aumenta el daño al ADN  
(tiempo= 0), pero la célula utiliza sus propios mecanismos endógenos

para reparar este daño y a los 15' los niveles de DT son similares al control.

Figura 3.- Muestra la variación de la expresión de la Histona H2Ax y de los niveles de dímeros de timina con respecto al control a tiempo 0 y a los 15 minutos. Aunque sabemos que la H2Ax fosforilada actúa como reclamo de los compuestos enzimáticos de reparación del ADN. Los resultados a  $t = 0$  y  $t = 15'$ , no son estadísticamente significativos.

Figura 4.- Representa la variación de las células en las fases del ciclo celular G0-G1, G2-M y S a tiempo 0 y a los 15 minutos. Los tratamientos No inducen cambios estadísticamente significativos en la distribución de células en las fases del ciclo celular que puedan afectar los resultados.

Figura 5.- Muestra los niveles de DT, en el caso control, incluye la crema base sin los ingredientes activos, la E: incluye crema base con enzimas reparadoras, Z: crema base con aminoácidos y sal de Zn y E+Z: crema base con enzimas reparadoras + aminoácidos+ sal de Zn. La combinación E+Z reduce la presencia de DT en un 36% respecto al control.

## ESTUDIOS CLÍNICOS

Para determinar la eficacia del producto que la invención propone se realizan unos ensayos en los que utilizan tres preparaciones cosméticas E, Z y E+Z. El ensayo se realiza in vitro sobre embriones de peces Eleutheroembryos de 4 días de edad.

De los tres productos usados en el estudio, el producto E contiene una mezcla de liposomas con enzimas reparadoras

(arabidopsis thaliana, extracto de plancton, fermento lisado de bifida, lisado de micrococcus), el producto Z contiene una mezcla de liposomas con aminoácidos (arginina, glicina, prolina, fenilalanina, cisteína) y cloruro de zinc y el producto E+Z la mezcla de liposomas con todas las enzimas reparadoras citadas en el producto E, más los AA y Zn del producto Z.

En primer lugar se analiza la posible toxicidad de las muestras y el tiempo de tratamiento a utilizar en los ensayos.

10

Se preparan muestras control sin irradiar, irradiadas sin tratar e irradiadas tratadas después de la irradiación. Los productos se aplicarán a los embriones antes y después de la irradiación para detectar la posible reparación del ADN tras la inducción del daño.

15

Para ello se hace un análisis de la presencia de dímeros de timina ya que la radiación UV induce la formación de dímeros de pirimidina en el ADN que pueden ser detectados por anticuerpos específicos para estos dímeros (bien de timina, bien de citosina). Utilizando un anticuerpo específico cuantificaremos la cantidad de dímeros de timina inducidos por la radiación UV. (ver Fig. 1)

Las muestras se fijan y procesan para su análisis por Citometría de flujo que se realiza de la siguiente forma:

25

Los embriones se disgregan con un tratamiento enzimático con tripsina para separar las células sin dañarlas. Se fijan con paraformaldehído y se tiñen con el anticuerpo para dímeros de timina DT y para el compuesto para teñir ADN (Hoescht) y calcular su cantidad. A partir de la cantidad de ADN se determinan las fases del ciclo celular en las que se encuentran las células.

30

Tras tratar las muestras con las cremas se exponen a la radiación UV y se analiza el daño celular basándonos en la presencia de dímeros de timina inducidos por UV, la activación de la histona H2Ax y alteraciones en el ciclo celular.

Tras la exposición a la radiación UV aumenta el daño al ADN (tiempo = 0) respecto a las muestras no tratadas (C). La célula utiliza sus propios mecanismos para reparar este daño (34 %) y a los 15 min. (t=15) los niveles de DT son similares al control. (Ver Fig. 2)

10

Tras la exposición a la radiación UV aumenta la expresión de H2AX (tiempo = 0) y a t=15 se observa que los niveles de H2AX disminuyen de manera similar a como lo hacen los niveles de DT a t=15, indicando una correlación entre la expresión de H2AX y la presencia de DT. Sin embargo, debido a la alta variabilidad detectada en el control, la disminución no es estadísticamente significativa. (Ver Fig. 3)

La fase G0-G1 es la etapa de reposo de la célula o preparación para entrar en división. La fase G2-M es la de separación de cromátidas y división celular (mitosis). La fase S es la de síntesis de ADN. E+Z parece aumentar ligeramente la fase G2-M, pero la diferencia no es significativa. (ver Fig. 4)

La combinación de E+Z reduce la presencia de dímeros de timina en un  $36 \pm 14 \%$  (22-50 %) respecto al control.

La crema control ("vacía") es la misma que para E, Z y E+Z pero sin estos componentes. Las muestras se tratan con las cremas, se irradian y se analizan, tomando como referencia (C) la cantidad de DT detectados en la muestra tratada con la crema "vacía". (ver Fig. 5)

Por último, cabe destacar, el ensayo realizado para comprobar la activación de los mecanismos de acción que provoca dicha reparación. Elegimos 2 proteínas, la P53 y P21, ambas intervienen en este mecanismo de acción y se activan por la radiación UV.

El experimento se realiza por duplicado, utilizando 10 embriones, con un grupo control, sin tratar con crema, de los cuales la mitad se tratan con radiación UV 15' y la otra mitad no. Y el grupo tratado donde se aplica la crema durante 1H.

Tras el análisis por qPCR los resultados son: Tras la irradiación con luz UV, los embriones tratados con E+Z aumentan la expresión génica de p53 en un 46%. Del mismo modo, el tratamiento con E+Z aumenta la expresión de p21 a los 15' de la irradiación en un 130%.

Una vez descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, solamente queda por añadir que dicha invención puede sufrir ciertas variaciones en los componentes y porcentajes, siempre y cuando dichas alteraciones no varíen sustancialmente las características que se reivindican a continuación:

## REIVINDICACIONES

- 1.- Composición cosmética liposomada con una mezcla de aminoácidos, sales de zinc y extractos de plantas y microorganismos con enzimas reparadoras del ADN que comprende:
- un principio activo que consiste en una mezcla de liposomas que tienen en su interior y de forma separada los siguientes componentes con enzimas con propiedades reparadoras del ADN y en los siguientes porcentajes de liposomas con respecto al peso total de la formulación:
    - liposomas de extracto hidroalcohólico de plancton 5-10% p/p
    - liposomas de lisado de micrococcus 10-20% p/p
    - liposomas de arabidopsis thaliana 10-20% p/p
    - liposomas de lisado de bifida 5-10% p/p
  - un segundo principio activo que consiste en una mezcla de diferentes porcentajes de liposomas que incorporan en su interior, y de forma separada, los aminoácidos siguientes en las proporciones de liposomas con respecto al peso total de la formulación:
    - liposomas de arginina 6-7% p/p
    - liposomas de glicina 5-7% p/p
    - liposomas de prolina 5-7% p/p
    - liposomas de fenilalanina 5-7% p/p
    - liposomas de cisteína 5-7% p/p
  - un tercer principio activo son unos liposomas en un porcentaje con respecto al peso total de la formulación del 10 - 15% p/p con una sal de zinc de entre cloruro de zinc y/o gluconato de zinc.

## **resumen**

- 5            Producto cosmético con propiedades reparadoras del ADN demostradas que cuenta con una mezcla de liposomas que incorporan como principios activos diferentes enzimas reparadoras del ADN y una combinación de aminoácidos y sal de zinc además de otros componentes de uso cosmético.

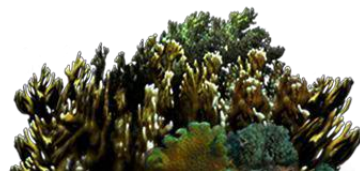
10



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### **EXTRACTO DE PLANCTON MARINO** **/ A / HGL / CA11 /**



**Nombre comercial:** EXTRACTO DE PLANCTON MARINO / A / HGL / CA11 /.

**Código:** EPMAHGLCA11.

**Nombre INCI:** AQUA, GLYCERIN, PLANKTON EXTRACT, POTASSIUM SORBATE.

**Estado INCI:** Conforme.

**Estado REACH:** Exento por bajo volumen.

**Nº CAS:** 7732-18-5; 56-81-5; 91079-57-1; 24634-61-5 / 590-00-1.

**Nº CE:** 231-791-2; 200-289-5; 293-445-7; 246-376-1.

**Origen:** GLYCERIN: Origen vegetal.



**PLANKTON EXTRACT:** Origen vegetal.

**POTASSIUM SORBATE:** Origen sintético.

**Procedimiento:** Libre de GMO. / No Etoxilación. / No Irradiación. / No Sulfonación. / No BSE/TSE. / No CMR. / No SVHC. / No Nanomaterial. / No DEG. / No DEHP. / No Formaldehído. / No Ftalatos. /.

**Aditivos:** Conservantes: Potassium sorbate. Paraben Free. / Antioxidantes: Ninguno. / Otros aditivos: Ninguno.

**Disolventes utilizados:** Agua y glicerina.

**Aspecto:** Líquido transparente o ligeramente opalescente.

**Color:** Característico (entre amarillento y pardo intenso).

**Olor:** Característico.

**Densidad:** 1,050 - 1,300 g/cm<sup>3</sup> (20°C aprox.).

**Valor pH directo:** 4,5 - 6,5 (20°C aprox.).

**Soluble/ Miscible:** Agua. Tensioactivos. Mezclas hidroalcohólicas, hidroglicéricas e hidroglicólicas.

**Información ecológica:** Sostenible.

**Recuento microbiano:** **Aerobios totales:** Máx. 300 microorganismos/gramo.

**Hongos y levaduras:** Máx. 200 microorganismos/gramo.

**Patógenos:** Total ausencia en 1 gramo.

**Dosis empleo recomendadas:** 2,0 – 10,0%.

**Aplicaciones sugeridas:** Preparados hidratantes, nutritivos y regeneradores. Cremas vulnerarias, contra las quemaduras y para después del sol. Productos protectores cutáneos y capilares. Cremas antiarrugas, infantiles y contorno de ojos. Leches faciales y corporales. Champús específicos. Mascarillas capilares y faciales. Tintes y permanentes.

**Propiedades:** Hidratante, protectora, nutritiva, regeneradora y vulneraria.

**Embalaje industrial:** 1Kg., 5Kg., 25Kg., 225Kg.

**Condiciones de almacenamiento:** Es muy importante conservar el producto en los envases muy bien cerrados, alejados de la luz directa del sol y a temperaturas que no sobrepasen los 15°C. En el caso de no disponer de neveras, almacenar el producto en la zona más fresca posible y exenta de luz artificial.

**Bibliografía:** - Atlas Ilustrado de Plantas Medicinales y Curativas, Ed. Susaeta.

- Dumont's grosse Kräuter Enzyklopädie.

- Fitocosmeticos ALVAREZ CRUZ i BAGUE SERRANO.

- Gran enciclopedia de las plantas medicinales, BERDONCES i SERRA.

- Plantas medicinales, FONT i QUER.

- Proserpio G., Martelli A., Patri GF.; Elementi di Fitocosmeci; Ed. Sepem / Milano 1983.

- Websites.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
[www.biogrundl.es](http://www.biogrundl.es)  
[info@biogrundl.es](mailto:info@biogrundl.es)

---

## ESPECIFICACIONES

### **GENERALIDADES**

El Plancton marino es un conjunto de organismos errantes (del griego plangtós que significa errante), generalmente de pequeño tamaño, que viven suspendidos en las aguas de mares y océanos. En él hay que distinguir los de naturaleza vegetal, fitoplancton, y los de constitución animal, zooplancton. Ambos se caracterizan por la brevedad del ciclo vital y su alta proliferación que se ven, así, compensadas.

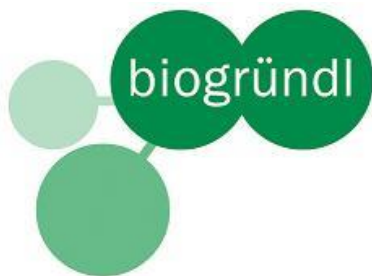
Las especies más características del plancton marino son las diatomeas (Rhizosolenia), copépodos (Teomera acartia y Nauplius), hidroideas (Ofelia) y Peridium depressum; esta última muy común en el plancton superficial, especialmente, en primavera y verano.

El EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L. se obtiene, principalmente, de las especies antes citadas, pescadas por arrastre con redes de malla muy fina y sometidas a una hidrólisis de sus componentes proteicos con papaína, de forma tal que se degradan en más del 80% en oligopéptidos formados por seis, siete y ocho aminoácidos y cuyo peso molecular es como máximo de 2000 daltons.

El EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L. contiene los siguientes principios activos:

- Oligopéptidos, formados por hexa-, hepta- y octopéptidos en un 80% y cuyo peso molecular máximo es de 2000 daltons. Contienen los siguientes aminoácidos puestos en orden decreciente:

- Ácido Glutámico.
- Ácido Aspártico.
- Lisina.
- Leucina.
- Alanina.
- Glicina.
- Arginina.
- Valina.
- Treonina.
- Isoleucina.
- Serina.
- Prolina.
- Tirosina.
- Fenilalanina.
- Histidina.
- Hidroxiprolina.
- Triptófano.
- Metionina.
- Cistina.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

---

## ESPECIFICACIONES

- Oligoelementos, los más característicos son:

- Yodo.
- Calcio.
- Potasio.
- Magnesio.
- Cinc.
- Hierro.
- Cobre.
- Manganeseo.

- Vitaminas, contiene las siguientes:

- A (Retinol y carotenos).
- B<sub>8</sub> (Inositol).
- E (Tocoferoles).
- C (Ácido ascórbico).
- B<sub>5</sub> (Ácido pantoténico).
- F (Ácidos grasos poliinsaturados).
- PP (Nicotinamida).
- H (Biotina).
- B<sub>2</sub> (Riboflavina).
- B<sub>12</sub> (Cianocobalamina).

- Carbohidratos, son esencialmente de naturaleza polisacárida, formados por pentaglicanos y D-galacto-D-manoglicanos.

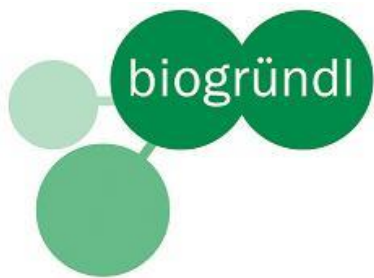
## **EMPLEO Y DOSIFICACIÓN**

La aplicación en cosmética del extracto de plancton marino está justificada por sus propiedades más destacadas: hidratante, protectora, nutritiva, regeneradora y vulneraria.

Muy útil en preparados hidratantes, nutritivos y regeneradores; en cremas vulnerarias, contra las quemaduras y para después del sol; en productos protectores cutáneos y capilares; en cremas antiarrugas, infantiles y contorno de ojos; en leches faciales y corporales; en champús específicos; en mascarillas capilares y faciales; en tintes y permanentes.

Si se observa turbidez, es aconsejable disolver previamente el producto en una parte del agua prevista para la preparación del producto final y filtrar después de unas 12-24 horas en reposo.

Las dosis de empleo recomendadas están entre 2 y 10%. En el caso de desear unos efectos muy especiales, puede elevarse la proporción hasta el 15%.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

---

## ESPECIFICACIONES

### **PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

**Aspecto:** Líquido transparente o ligeramente opalescente.

**Color:** Característico (entre amarillento y pardo intenso).

**Olor:** Característico.

**Valor pH directo:** 4,5 - 6,5 (20°C aprox.).

**Densidad:** 1,050 - 1,300 g/cm<sup>3</sup> (20°C aprox.).

**Solubilidad en agua:** Totalmente soluble (20°C aprox.).

**Solubilidad en otros disolventes:** Insoluble en disolventes orgánicos y lípidos. Soluble en tensioactivos y mezclas hidroalcohólicas, hidroglicéricas e hidroglicólicas.

**Metales pesados:** No más de 5 mg/Kg.

**Cenizas sulfatadas:** No más de 0,01%.

**Cloruros:** No más de 0,007%.

**Sulfatos:** No más de 0,002%.

**Otra información:** Ninguna.

**Aerobios totales:** Máx. 300 microorganismos/gramo.

**Hongos y levaduras:** Máx. 200 microorganismos/gramo.

**Patógenos:** Total ausencia en 1 gramo.

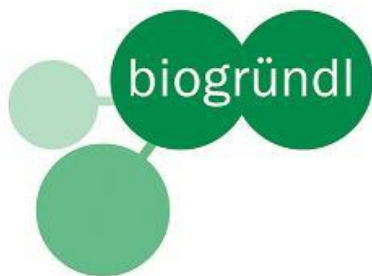
### **INOCUIDAD DERMATOLÓGICA**

Se realizó mediante el test del parche (Patch test) sobre 10 probantes. Para ello se añade a una emulsión O/W un 15% de EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.; se vierte sobre el parche 0,5 g. de esta emulsión y se fija en el antebrazo. Se mantiene así durante 24, 48 y 72 horas, al cabo de las cuales se evalúa la reacción habida, según la siguiente tabla de valores:

1. Ningún eritema.
2. Ligero eritema.
3. Eritema bien definido.
4. Severo eritema.

El resultado fue ausencia total de eritema en los 10 probantes.

A las concentraciones recomendadas, el preparado es inocuo para la piel.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

---

## ESPECIFICACIONES

### **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

Es muy importante conservar el producto en los envases muy bien cerrados, alejados de la luz directa del sol y a temperaturas que no sobrepasen los 15°C. En el caso de no disponer de neveras, almacenar el producto en la zona más fresca posible y exenta de luz artificial.

### **DENOMINACIÓN INCI**

AQUA, GLYCERIN, PLANKTON EXTRACT, POTASSIUM SORBATE.

### **PRUEBAS DE EFECTIVIDAD**

**Ensayo:** Doble punto ciego y posterior evaluación cosmética.

**Parámetros ensayados:** Acción hidratante. Acción protectora. Acción regeneradora.

**N (número voluntarios)** = 30 (17 ♀ y 13 ♂).

**Edad (voluntarios)** = 22 – 67 años.

**Parte izquierda tratada:**

Placebo, 30 voluntarios, base cosmética adecuada.

**Parte derecha tratada:**

EXTRACTO DE PLANKTON MARINO 2%, 15 voluntarios, base cosmética adecuada.

**Parte derecha tratada:**

EXTRACTO DE PLANKTON MARINO 5%, 15 voluntarios, base cosmética adecuada.

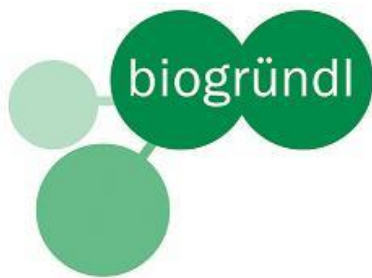


BIOGRÜNDL, S.L.  
 POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
 08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
 TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
 www.biogrundl.es  
 info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### Parámetros ensayados:

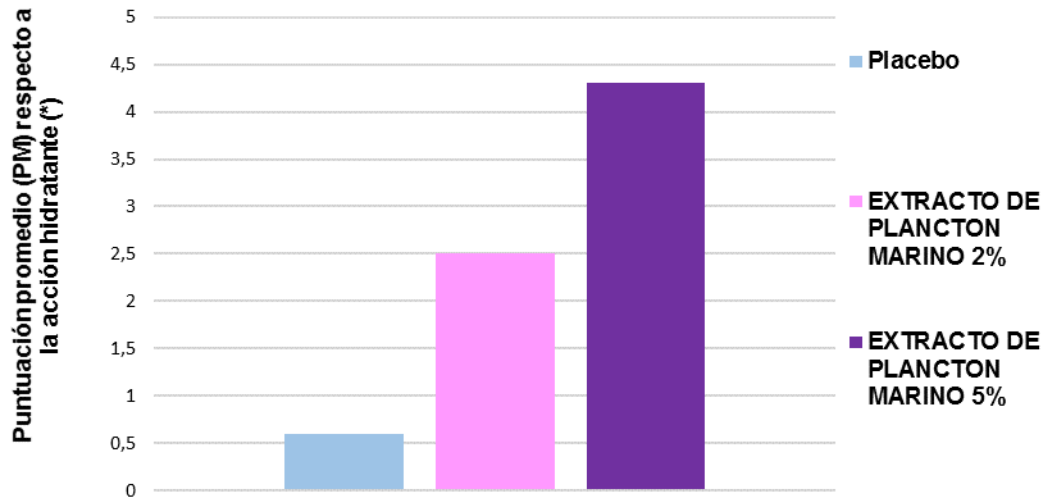
|                            | Ensayo                                              | N (voluntarios)     | Edad (voluntarios) | Placebo                  | EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%            | EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%            | Ensayo (Días) | Resultados medidos (Días) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|---------------------------|
| <b>Acción hidratante</b>   | Doble punto ciego y posterior evaluación cosmética. | N = 30<br>17 ♀ 13 ♂ | 22 – 67            | Parte izquierda tratada. | Parte derecha tratada.<br>15 voluntarios. | Parte derecha tratada.<br>15 voluntarios. | D = 30        | D' = 30                   |
| <b>Acción protectora</b>   | Doble punto ciego y posterior evaluación cosmética. | N = 30<br>17 ♀ 13 ♂ | 22 – 67            | Parte izquierda tratada. | Parte derecha tratada.<br>15 voluntarios. | Parte derecha tratada.<br>15 voluntarios. | D = 30        | D' = 1                    |
| <b>Acción regeneradora</b> | Doble punto ciego y posterior evaluación cosmética. | N = 30<br>17 ♀ 13 ♂ | 22 – 67            | Parte izquierda tratada. | Parte derecha tratada.<br>15 voluntarios. | Parte derecha tratada.<br>15 voluntarios. | D = 30        | D' = 1                    |



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EVALUACIÓN DEL ESTADO DE LA PIEL A LOS 30 DÍAS



(\*) La acción hidratante fue determinada mediante empleo de un aparato denominado Tewameter que evalúa la eficacia hidratante, suministrando los parámetros de TEWL (pérdida transepidérmica de agua), en la parte tratada de los voluntarios.

Número total de días en los que se realizó el ensayo (se aplicó el tratamiento):  
D = 30 días ( todos los días durante las pruebas del test de eficacia).

Número total de días en los que se midieron los resultados:  
D' = 30 días ( todos los días durante las pruebas del test de eficacia).

#### Puntuación Promedio:

**Peor resultado:** Se asigna el valor límite cero.

**Mejor resultado:** Se asigna el valor límite cinco.

Se asigna puntuación a los resultados obtenidos entre los dos valores límite.

Se realiza el cálculo promedio para cada grupo de resultados obtenidos:

Placebo, 2% EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.,  
5% EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.

#### Interpretación de los resultados:

PM rango entre 0 – 1: Sin cambios significativos.

PM rango entre 1 – 2: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 2 – 3: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 3 – 4: Gran mejoría respecto al placebo.

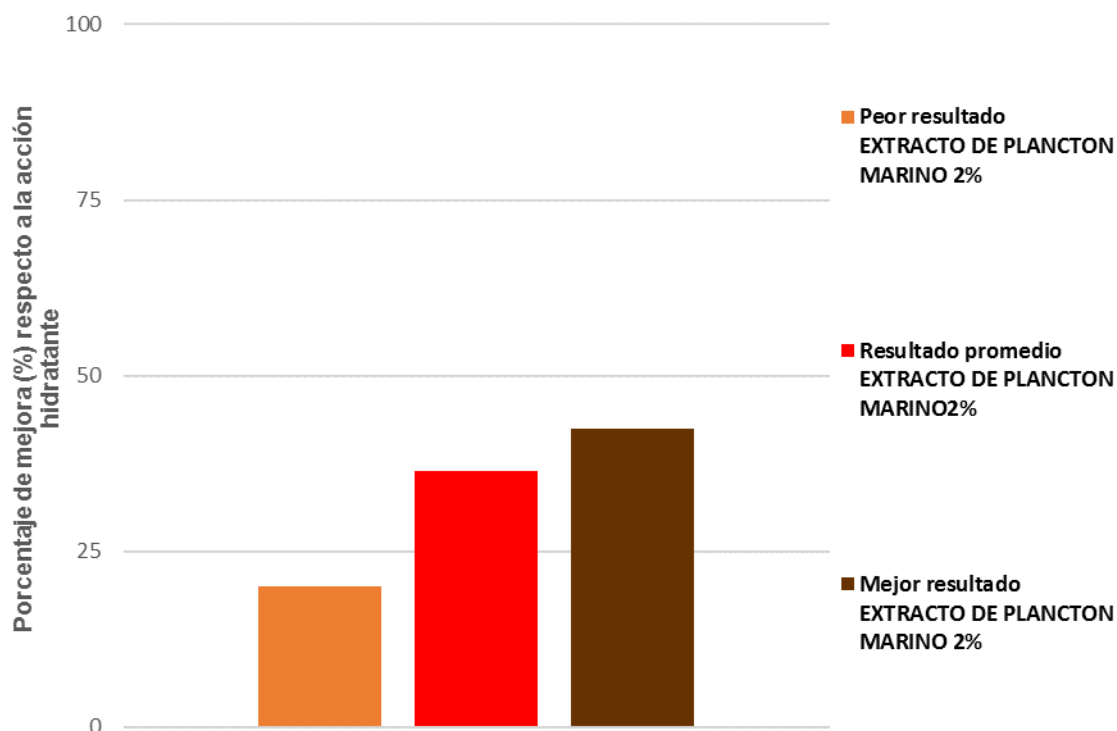
PM rango entre 4 – 5: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%



#### Resultados:

Peor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 20%.

Resultado promedio EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 36,5%.

Mejor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 42,5%.

#### Interpretación de los resultados:

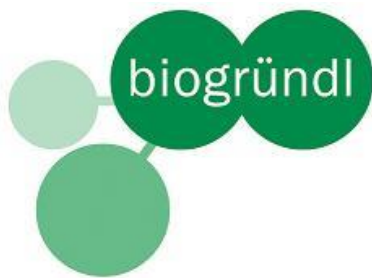
PM rango entre < 20%: Sin cambios significativos.

PM rango entre 21 – 40%: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 41 – 60%: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 61 – 80%: Gran mejoría respecto al placebo.

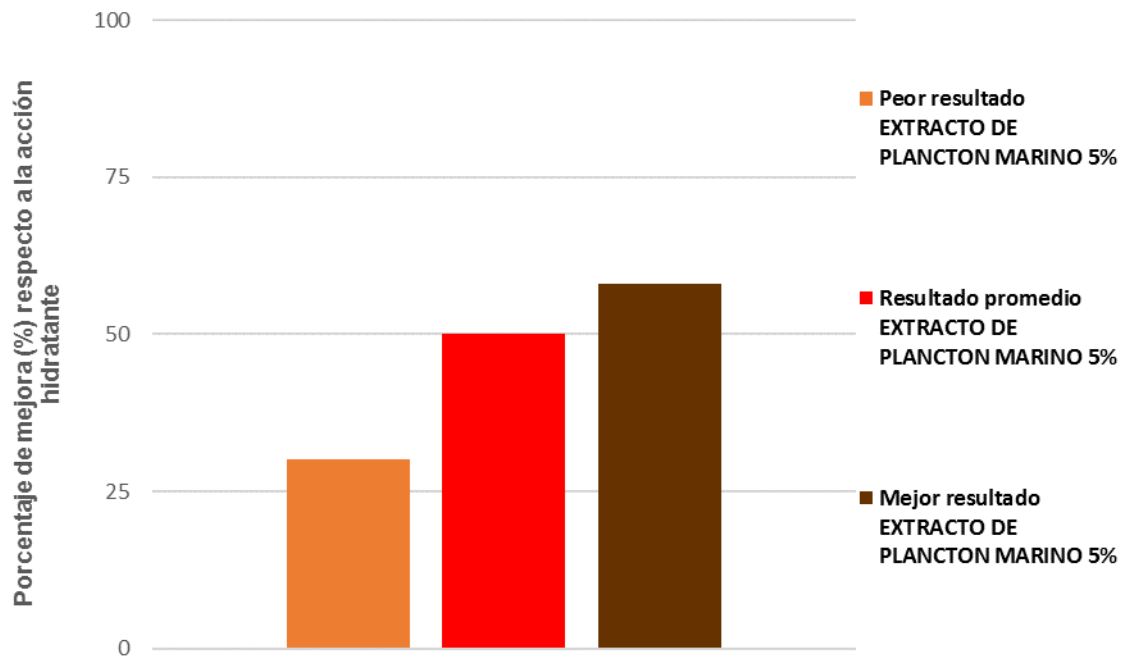
PM rango entre > 81%: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%



#### Resultados:

Peor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 30%.

Resultado promedio EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 50%.

Mejor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 58%.

#### Interpretación de los resultados:

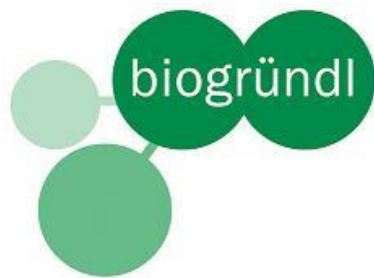
PM rango entre < 20%: Sin cambios significativos.

PM rango entre 21 – 40%: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 41 – 60%: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 61 – 80%: Gran mejoría respecto al placebo.

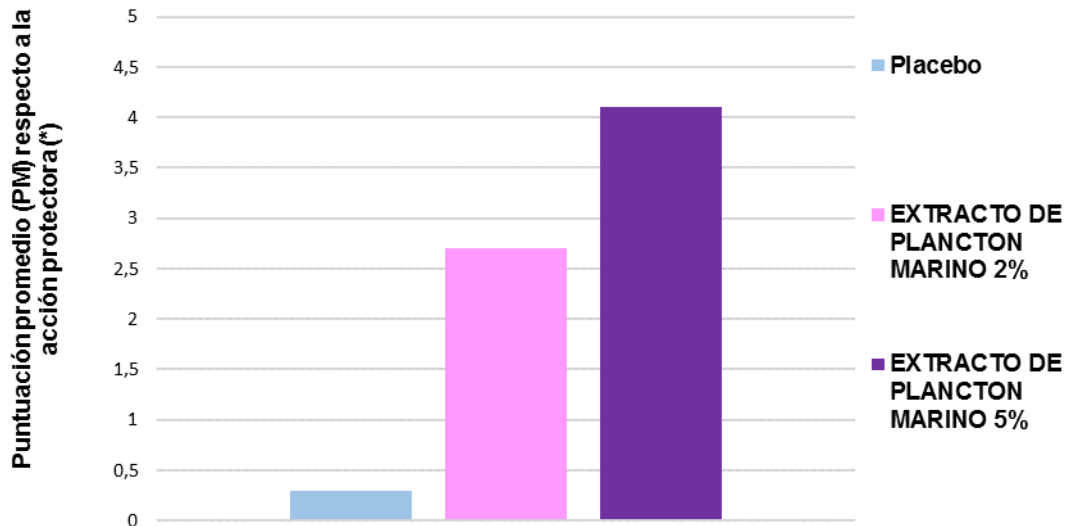
PM rango entre > 81%: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EVALUACIÓN DEL ESTADO DE LA PIEL A LOS 30 DÍAS



(\*) La acción protectora fue evaluada mediante observación directa de la protección al daño producido en la piel (medio ambiente desfavorable) de los voluntarios.

Número total de días en los que se realizó el ensayo (se aplicó el tratamiento):  
D = 30 días ( todos los días durante las pruebas del test de eficacia).

Número total de días en los que se midieron los resultados:  
D' = 1 día ( último día de las pruebas del test de eficacia).

#### Puntuación Promedio:

**Peor resultado:** Se asigna el valor límite cero.

**Mejor resultado:** Se asigna el valor límite cinco.

Se asigna puntuación a los resultados obtenidos entre los dos valores límite.

Se realiza el cálculo promedio para cada grupo de resultados obtenidos:

Placebo, 2% EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.,  
5% EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.

#### Interpretación de los resultados:

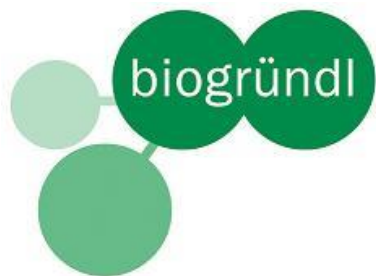
PM rango entre 0 – 1: Sin cambios significativos.

PM rango entre 1 – 2: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 2 – 3: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 3 – 4: Gran mejoría respecto al placebo.

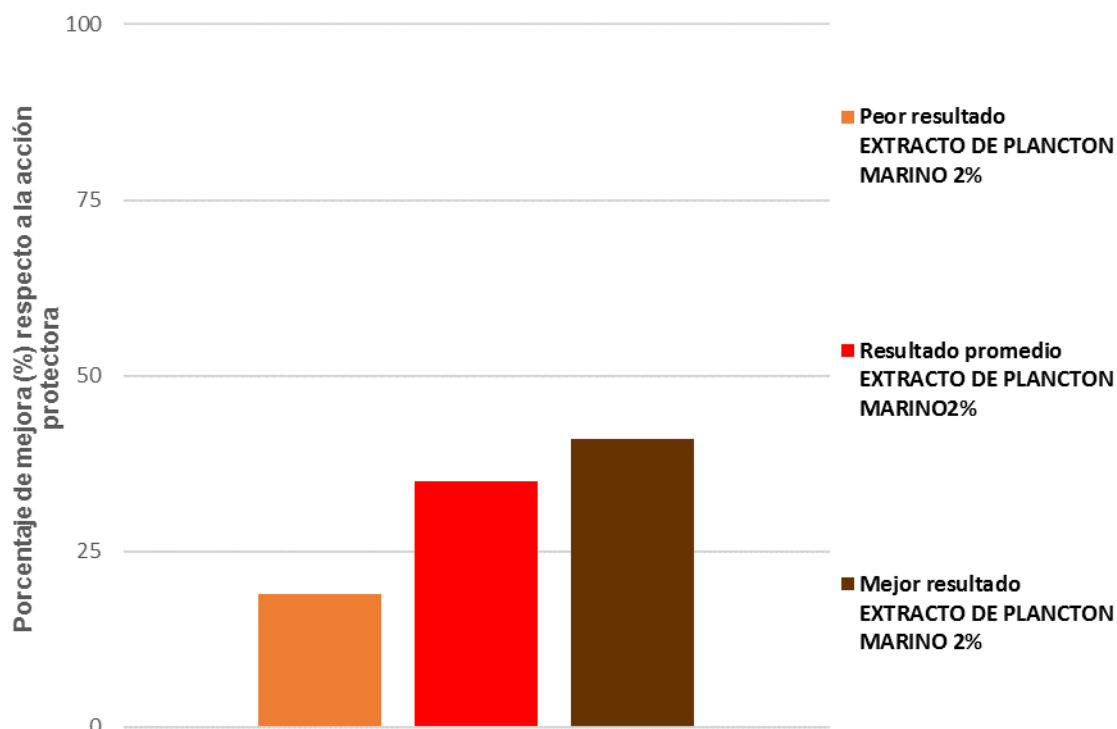
PM rango entre 4 – 5: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%



#### Resultados:

Peor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 19%.

Resultado promedio EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 35%.

Mejor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 41%.

#### Interpretación de los resultados:

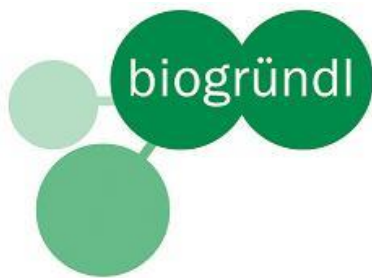
PM rango entre < 20%: Sin cambios significativos.

PM rango entre 21 – 40%: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 41 – 60%: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 61 – 80%: Gran mejoría respecto al placebo.

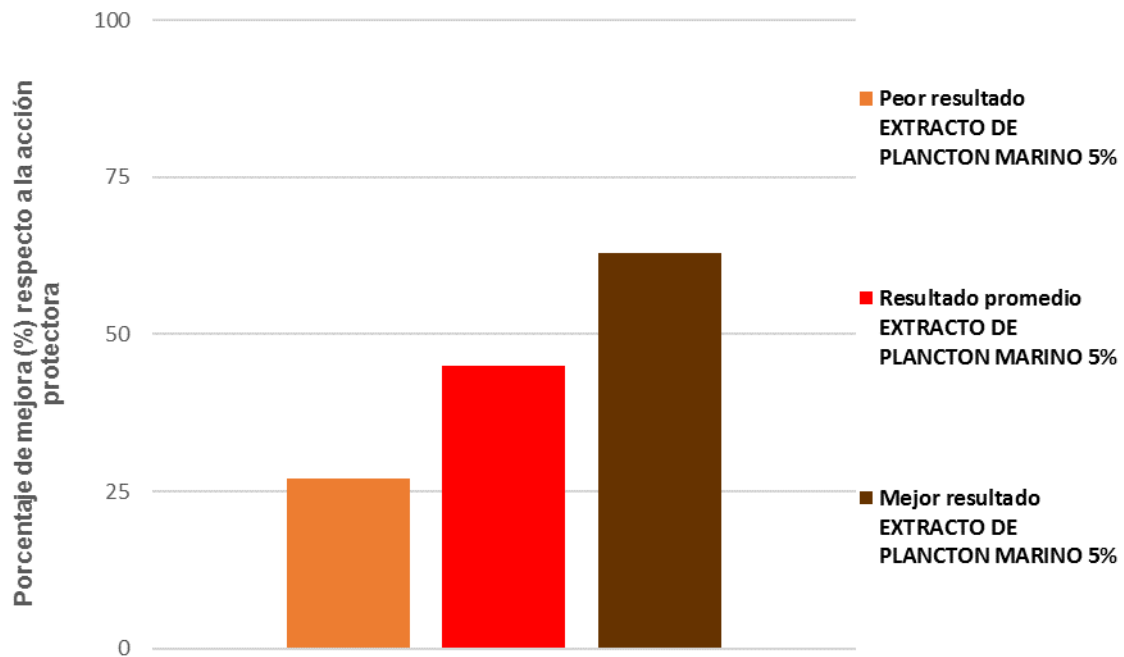
PM rango entre > 81%: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%



#### Resultados:

Peor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 27%.

Resultado promedio EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 45%.

Mejor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 63%.

#### Interpretación de los resultados:

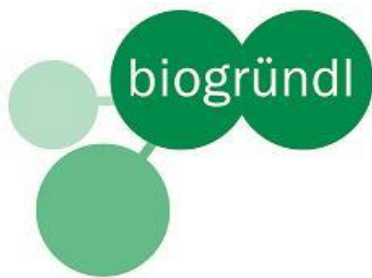
PM rango entre < 20%: Sin cambios significativos.

PM rango entre 21 – 40%: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 41 – 60%: Mejoría apreciable respecto al placebo.

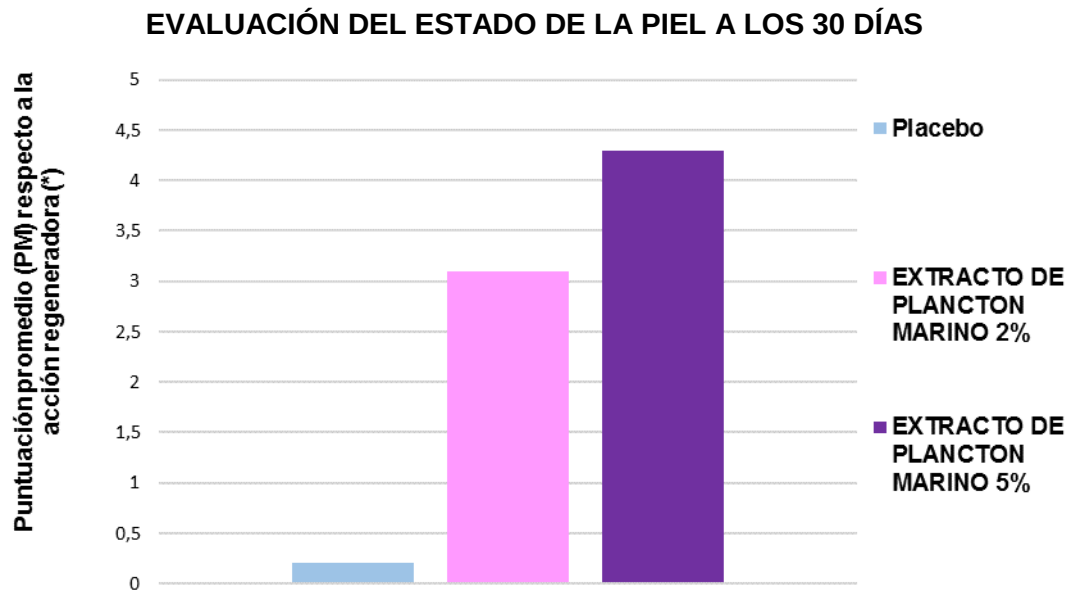
PM rango entre 61 – 80%: Gran mejoría respecto al placebo.

PM rango entre > 81%: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES



(\*) La acción regeneradora fue evaluada mediante la verificación del aumento de la proliferación de células a partir de un fragmento de tejido dérmico de los voluntarios.

Número total de días en los que se realizó el ensayo (se aplicó el tratamiento):

D = 30 días ( todos los días durante las pruebas del test de eficacia).

Número total de días en los que se midieron los resultados:

D' = 1 día ( último día de las pruebas del test de eficacia).

### Puntuación Promedio:

**Peor resultado:** Se asigna el valor límite cero.

**Mejor resultado:** Se asigna el valor límite cinco.

Se asigna puntuación a los resultados obtenidos entre los dos valores límite.

Se realiza el cálculo promedio para cada grupo de resultados obtenidos:

Placebo, 2% EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.,

5% EXTRACTO DE PLANCTON MARINO de BIOGRÜNDL, S.L.

### Interpretación de los resultados:

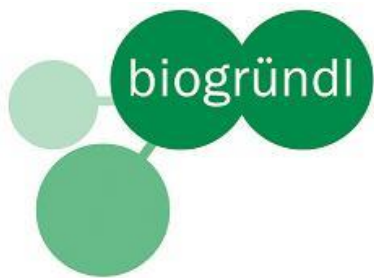
PM rango entre 0 – 1: Sin cambios significativos.

PM rango entre 1 – 2: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 2 – 3: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 3 – 4: Gran mejoría respecto al placebo.

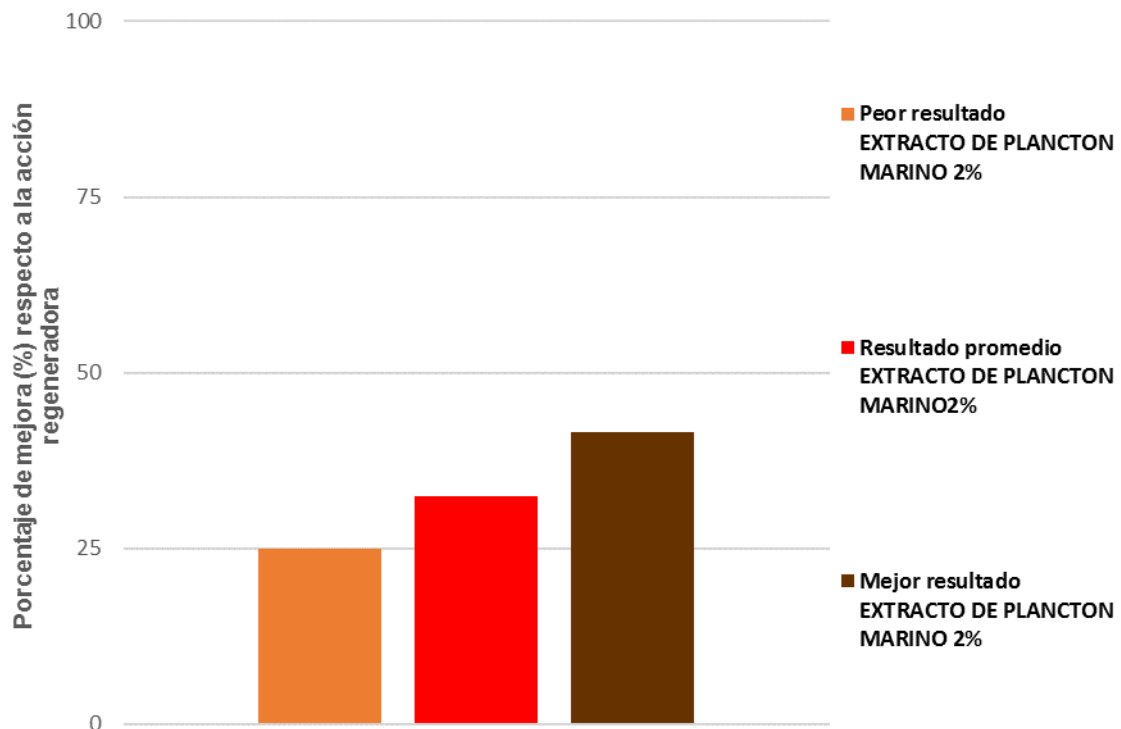
PM rango entre 4 – 5: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%



#### Resultados:

Peor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 25%.

Resultado promedio EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 32,5%.

Mejor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 2%: 41,5%.

#### Interpretación de los resultados:

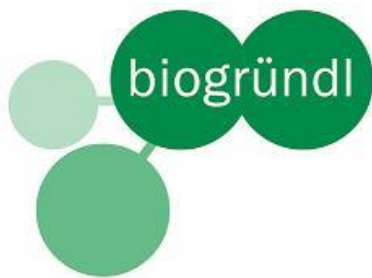
PM rango entre < 20%: Sin cambios significativos.

PM rango entre 21 – 40%: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 41 – 60%: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 61 – 80%: Gran mejoría respecto al placebo.

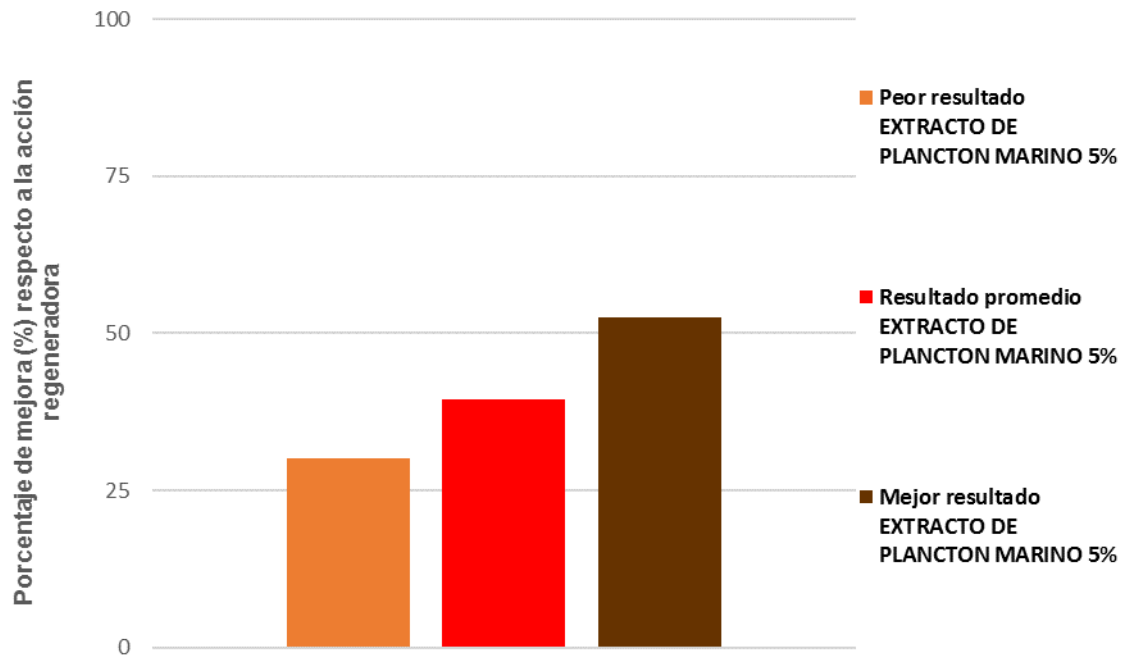
PM rango entre > 81%: Excelente resultado cosmético.



BIOGRÜNDL, S.L.  
POLÍGONO LES FALLULLES, NAVE 34 -SECTOR 2-  
08620 SANT VICENÇ DELS HORTS, BARCELONA (SPAIN)  
TELF: +34 93 660 55 12 / FAX: +34 93 660 55 13  
www.biogrundl.es  
info@biogrundl.es

## ESPECIFICACIONES

### EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%



#### Resultados:

Peor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 30%.

Resultado promedio EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 39,5%.

Mejor resultado EXTRACTO DE PLANCTON MARINO 5%: 52,5%.

#### Interpretación de los resultados:

PM rango entre < 20%: Sin cambios significativos.

PM rango entre 21 – 40%: Ligera mejoría respecto al placebo.

PM rango entre 41 – 60%: Mejoría apreciable respecto al placebo.

PM rango entre 61 – 80%: Gran mejoría respecto al placebo.

PM rango entre > 81%: Excelente resultado cosmético.



Proyecto: **Reparación ADN 2012**

Cliente: **Sesderma**

## Proyecto: **Reparación ADN 2012**

Cliente: **Sesderma**

Objetivo: Determinar la capacidad de tres sustancias para **reparar el ADN dañado** tras la exposición a radiación UV.

Sustancias: **E, Z, E+Z.**

Ensayo: Detección de dímeros de timina, ciclo celular y H2AX fosforilada. Análisis *multiplexado*.

# Proyecto: Reparación ADN 2012

## Cliente: Sesderma

### Diseño experimental

De acuerdo con los objetivos, se analizarán 3 productos proporcionados por Sesderma: E, Z y EZ. El ensayo se realizará in vitro sobre embriones de peces de **4 días** de edad.

En primer lugar se analizará la posible **toxicidad** de las muestras y el tiempo de tratamiento a utilizar en los ensayos.

Se preparan muestras control sin irradiar, irradiadas sin tratar e irradiadas tratadas después de la **irradiación**. Los productos se aplicarán a los embriones antes y después de la irradiación para detectar la posible reparación del ADN tras la inducción del daño.

Las muestras se **fijarán y procesarán para su análisis por Citometría** de flujo, para una explicación sencilla de la técnica: [http://en.wikipedia.org/wiki/Flow\\_cytometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry).

Se **analizarán los resultados** y se emitirá el correspondiente informe de análisis e interpretación de los datos obtenidos.

El análisis por citometría de flujo se realiza de la siguiente forma:

Los embriones se disgregan con un tratamiento enzimático con tripsina para separar las células sin dañarlas. Se fijan con paraformaldehído y se tiñen con el anticuerpo para dímeros de timina y para el compuesto para teñir ADN (Hoescht) y calcular su cantidad. A partir de la cantidad de ADN se determinan las fases del ciclo celular en las que se encuentran las células.

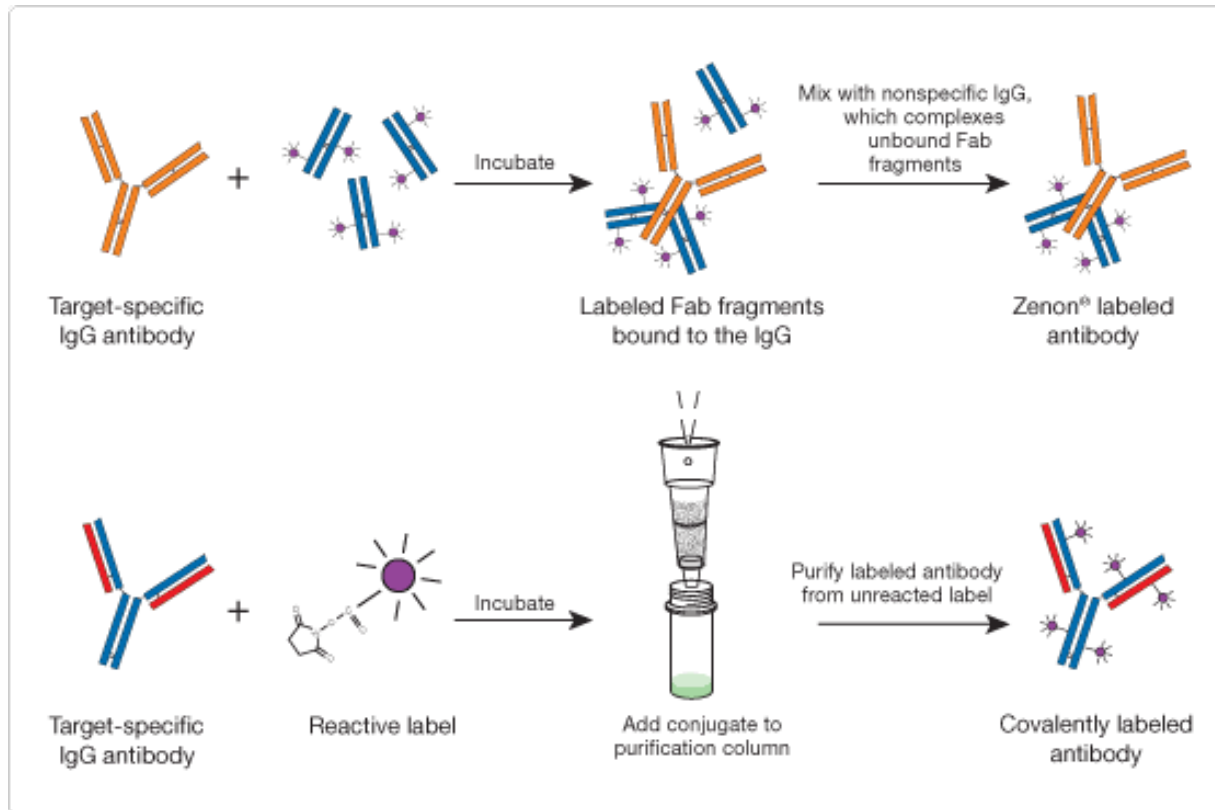
En esta fase no usamos el anticuerpo H2AX porque es muy caro y preferimos esperar a tener todas las condiciones bien diseñadas para ponerlo.

# Proyecto: Reparación ADN 2012

Cliente: **Sesderma**

## Diseño experimental

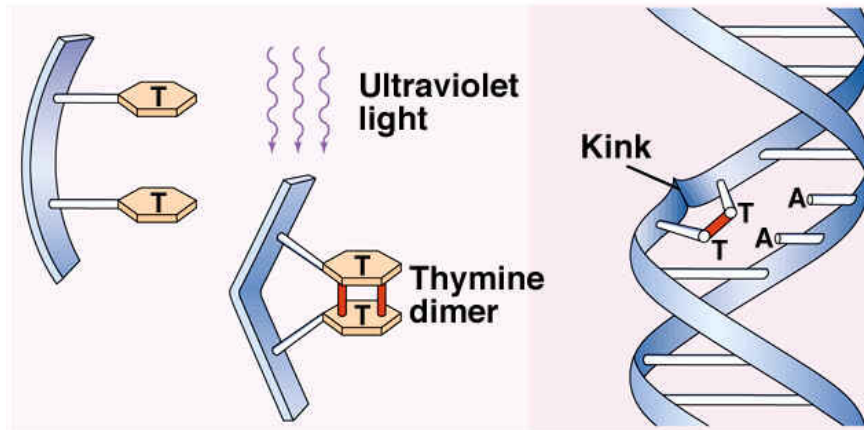
La detección del anticuerpo primario se realiza utilizando **Zenon**



- Análisis de la presencia de **dímeros de timina**: La radiación UV induce la formación de dímeros de pirimidina en el ADN que pueden ser detectados por anticuerpos específicos para estos dímeros (bien de timina, bien de citosina). Utilizando un anticuerpo específico cuantificaremos la cantidad de dímeros de timina inducidos por la radiación UV.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

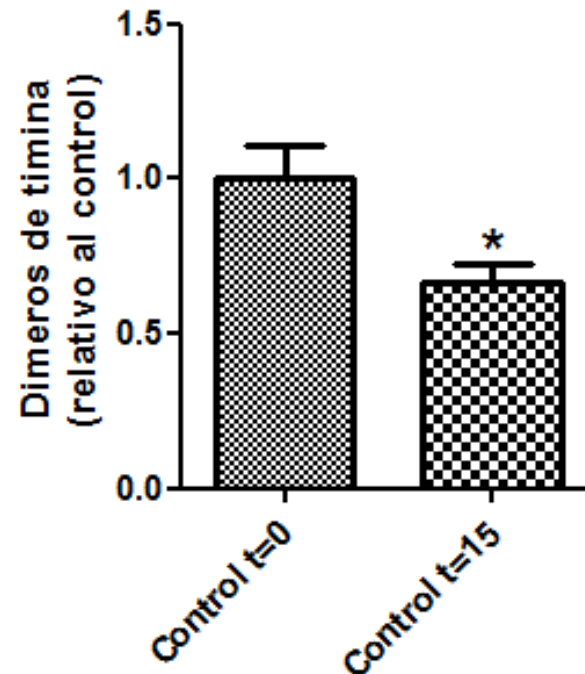
## Pyrimidine Dimer



## 1

## Resultados: Dímeros de Timina Reparación endógena (propia)

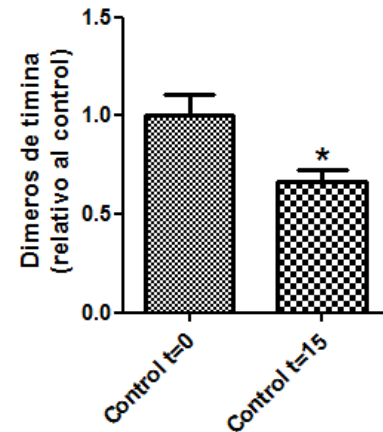
Tras la exposición a la radiación UV aumenta el daño al ADN (tiempo = 0) respecto a las muestras no tratadas (C). La célula utiliza sus propios mecanismos para reparar este daño (**34 %**) y a los 15 min (t=15) los niveles de DT son similares al control.



1

## Resultados: Dímeros de Timina Reparación endógena (propia)

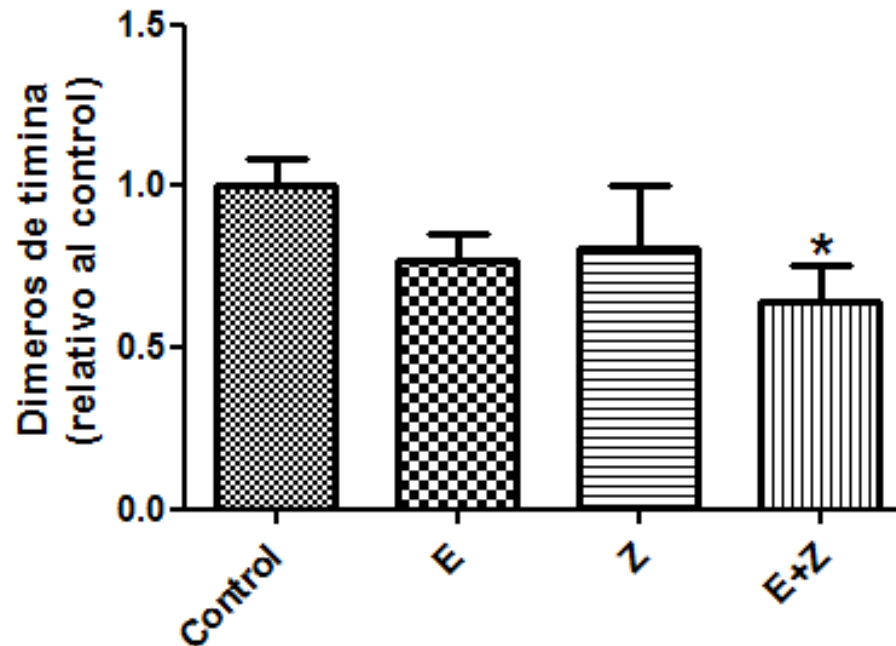
| Table Analyzed                              | Dimeros<br>Timina<br>controles    |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| Column A<br>vs<br>Column B                  | Control t=0<br>vs<br>Control t=15 |
| Unpaired t test                             |                                   |
| P value                                     | 0.013                             |
| P value summary                             | *                                 |
| Are means signif. different? ( $P < 0.05$ ) | Yes                               |
| One- or two-tailed P value?                 | One-tailed                        |
| t, df                                       | t=2.573 df=11                     |
| How big is the difference?                  |                                   |
| Mean $\pm$ SEM of column A                  | 1.000 $\pm$ 0.1070<br>N=7         |
| Mean $\pm$ SEM of column B                  | 0.6628 $\pm$<br>0.06583 N=6       |
| Difference between means                    | 0.3372 $\pm$ 0.1311               |
| 95% confidence interval                     | 0.04873 to<br>0.6258              |
| R squared                                   | 0.3757                            |
| F test to compare variances                 |                                   |
| F,DFn, Dfd                                  | 3.081, 6, 5                       |
| P value                                     | 0.2375                            |
| P value summary                             | ns                                |
| Are variances significantly different?      | No                                |



1

## Resultados: Dímeros de Timina Reparación inducida

La combinación de E+Z reduce la presencia de dímeros de timina en un **36 %** respecto al control.



La crema control (“vacía”) es la misma que para E, Z y E+Z pero sin estos componentes. Las muestras se tratan con las cremas, se irradian y se analizan, tomando como referencia (C) la cantidad de DT detectados en la muestra tratada con la crema “vacía”.

1

## Resultados: Dímeros de Timina Reparación inducida

### Table Analyzed

Column A  
vs  
Column D

### Dimeros Timina

Control  
vs  
E+Z

Unpaired t test

P value

0.0249

P value summary

\*

Are means signif. different? ( $P < 0.05$ )

Yes

One- or two-tailed P value?

Two-tailed

t, df

$t=2.562$  df=12

How big is the difference?

$1.000 \pm 0.08262$

Mean  $\pm$  SEM of column A

N=7

$0.6411 \pm 0.1131$

Mean  $\pm$  SEM of column D

N=7

Difference between means

$0.3589 \pm 0.1401$

95% confidence interval

0.05362 to 0.6642

R squared

0.3535

F test to compare variances

F,DFn, Dfd

1.875, 6, 6

P value

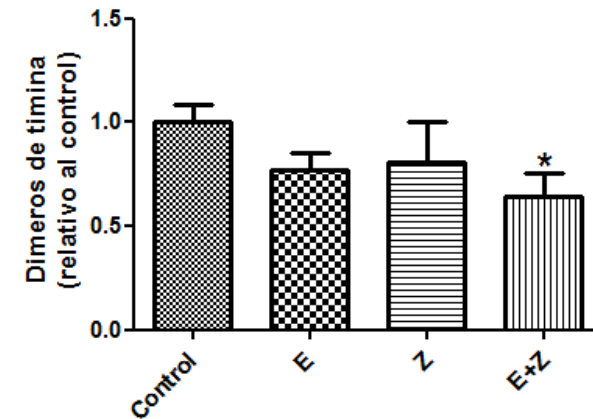
0.4634

P value summary

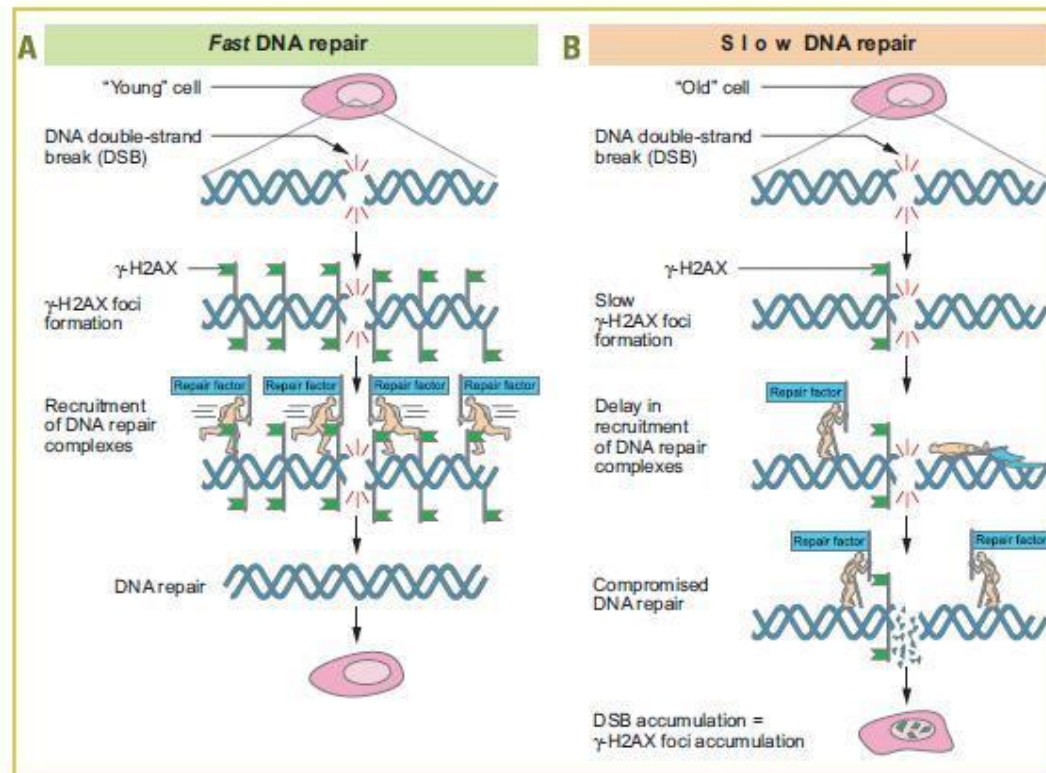
ns

Are variances significantly different?

No



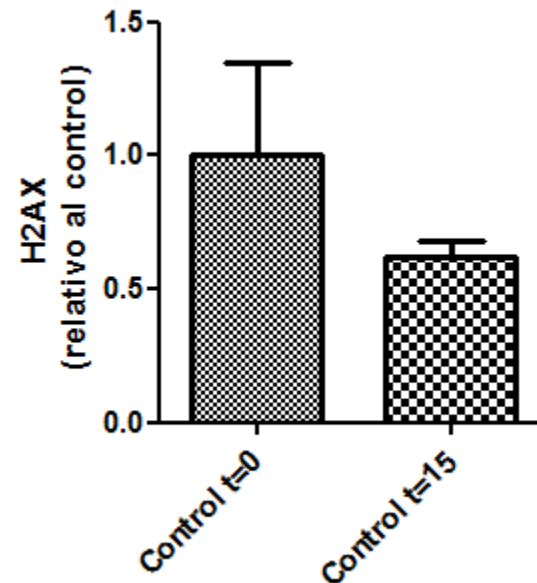
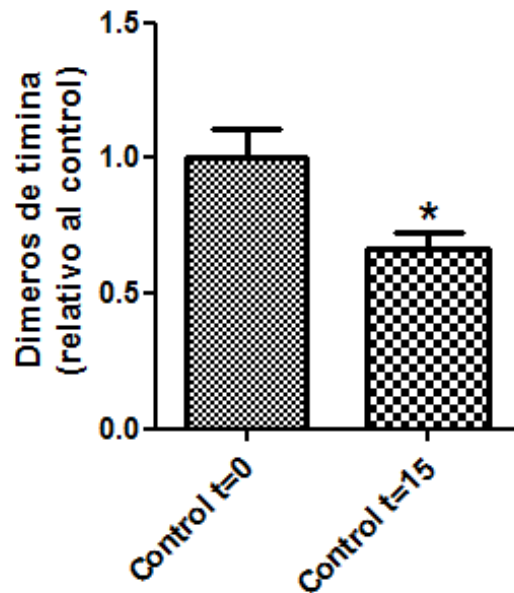
Análisis de la presencia de **H2AX**: La radiación UV ionizante induce la formación de roturas en la cadena doble de ADN. Estas roturas inducen a su vez la fosforilación de la Histona 2AX (H2AX) en el aminoácido Ser139. La H2AX es una forma de la H2A sobre la que se empaqueta el ADN en el núcleo celular. La función de la H2AX fosforilada no está clara, pero parece actuar como reclamo de los complejos enzimáticos de reparación del ADN y es un indicativo del daño generado al ADN por la radiación UV. Usaremos anticuerpos específicos para la H2AX que nos permitan detectar la cantidad de H2Ax inducida tras la irradiación y los tratamientos.



## 2

## Resultados: H2AX Reparación endógena (propia)

Tras la exposición a la radiación UV aumenta la expresión de H2AX (tiempo = 0) y a t=15 se observa que los niveles de H2AX disminuyen de manera similar a como lo hacen los niveles de DT a t=15, indicando una correlación entre la expresión de H2AX y la presencia de DT. Sin embargo, debido a la alta variabilidad detectada en el control, la disminución no es estadísticamente significativa.



## 2

# Resultados: H2AX Reparación endógena (propia)

### Table Analyzed

Column A

vs

Column B

### H2AX controles

Control t=0

vs

Control t=15

Unpaired t test

P value

0.3936

P value summary

ns

Are means signif. different? ( $P < 0.05$ )

No

One- or two-tailed P value?

Two-tailed

t, df

t=1.078 df=2

How big is the difference?

Mean  $\pm$  SEM of column A

1.000  $\pm$  0.3499 N=2

Mean  $\pm$  SEM of column B

0.6171  $\pm$  0.06061 N=2

Difference between means

0.3829  $\pm$  0.3551

95% confidence interval

-1.145 to 1.911

R squared

0.3677

F test to compare variances

F,DFn, Dfd

33.32, 1, 1

P value

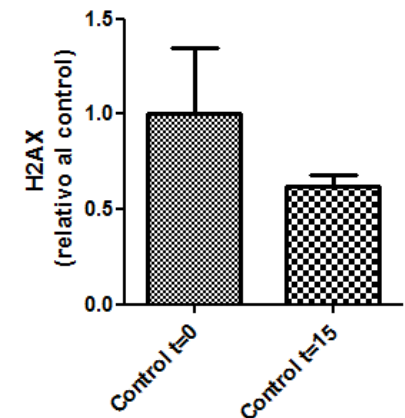
0.2184

P value summary

ns

Are variances significantly different?

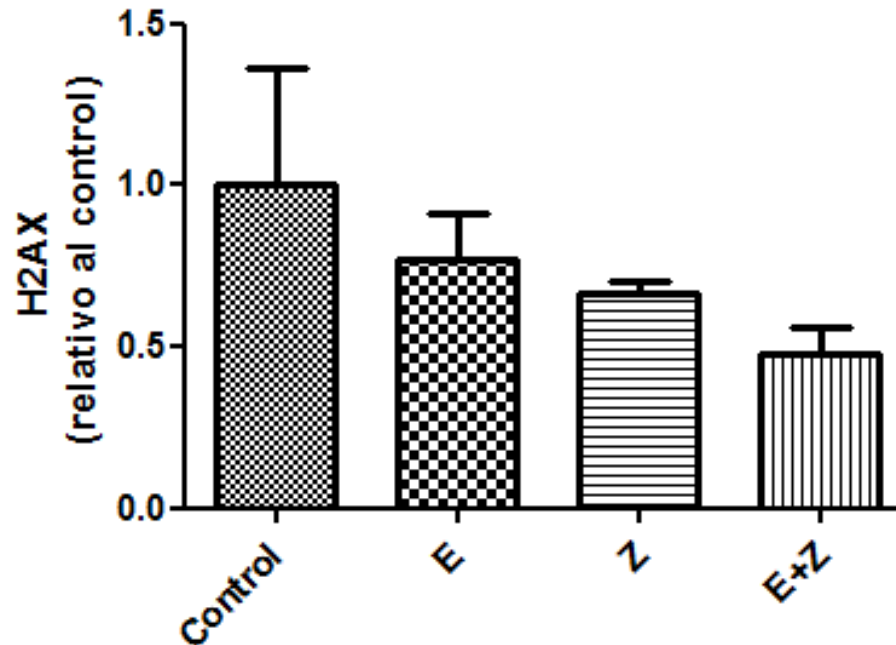
No



## 2

## Resultados: H2AX Reparación inducida

Los tratamientos con E, Z y E+Z disminuyen la expresión de H2AX, indicando una menor presencia de DT y por tanto una reparación del ADN. Sin embargo, debido a una alta variabilidad detectada en los controles que aumenta el error de la muestra las diferencias no son significativas.

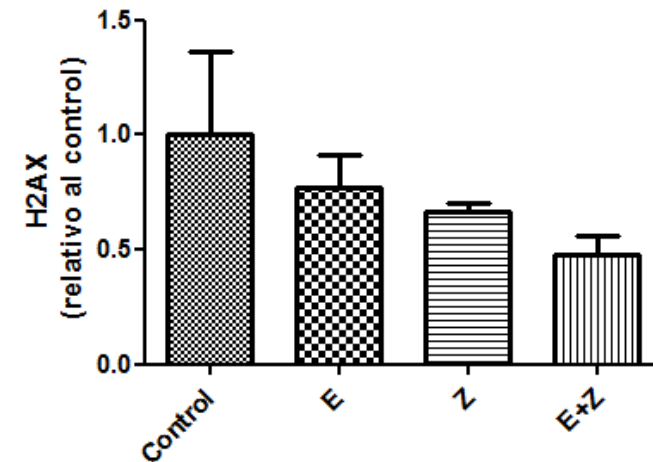


52  $\pm$  37 %

# 2

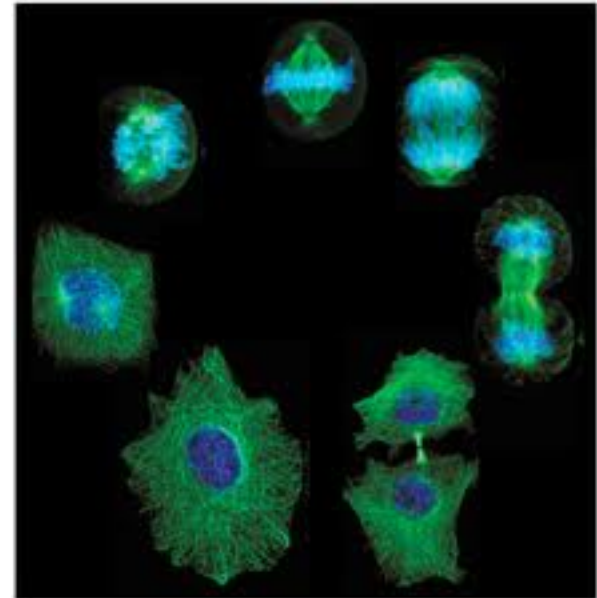
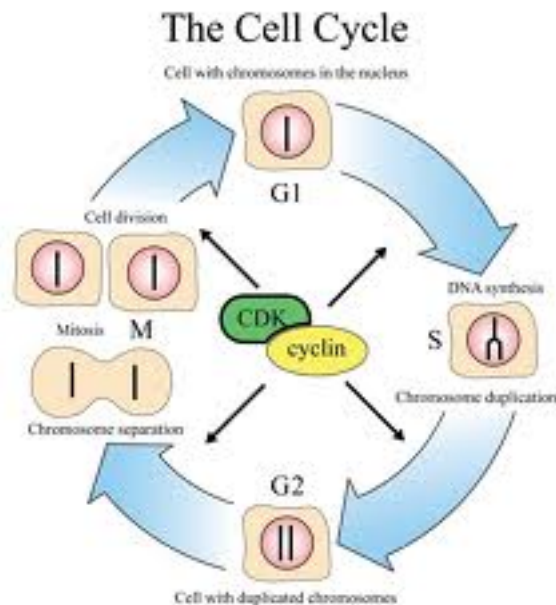
## Resultados: H2AX Reparación inducida

| Table Analyzed                              | H2AX                       |
|---------------------------------------------|----------------------------|
| Column A                                    | Control                    |
| vs                                          | vs                         |
| Column D                                    | E+Z                        |
| Unpaired t test                             |                            |
| P value                                     | 0.2927                     |
| P value summary                             | ns                         |
| Are means signif. different? ( $P < 0.05$ ) | No                         |
| One- or two-tailed P value?                 | Two-tailed                 |
| t, df                                       | $t=1.415$ $df=2$           |
| How big is the difference?                  |                            |
| Mean $\pm$ SEM of column A                  | $1.000 \pm 0.3595$ $N=2$   |
| Mean $\pm$ SEM of column D                  | $0.4774 \pm 0.08448$ $N=2$ |
| Difference between means                    | $0.5226 \pm 0.3693$        |
| 95% confidence interval                     | -1.067 to 2.112            |
| R squared                                   | 0.5003                     |
| F test to compare variances                 |                            |
| F,DFn, Dfd                                  | 18.11, 1, 1                |
| P value                                     | 0.2938                     |
| P value summary                             | ns                         |
| Are variances significantly different?      | No                         |



### 3

Análisis de la **apoptosis y ciclo celular** por citometría de flujo: En este caso mediremos el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0, G1, S, G2, M), en el mismo análisis mediremos la cantidad de células en apoptosis. Este ensayo nos permitirá determinar la calidad del ensayo y la posible disminución de la apoptosis celular debida a la reparación del daño al ADN.



# 3

## Resultados: Ciclo celular

La fase G0-G1 es la etapa de reposo de la célula o preparación para entrar en división. Un aumento de células en una fase tiene que ir acompañado por una disminución en otra fase y viceversa, el % total de células es el mismo, cambia su distribución, por eso se tienen que analizar las tres fases en paralelo.

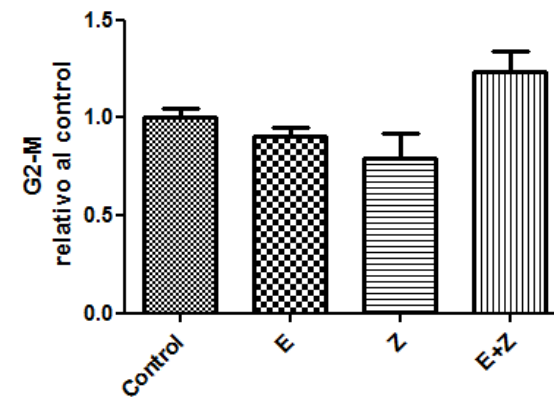
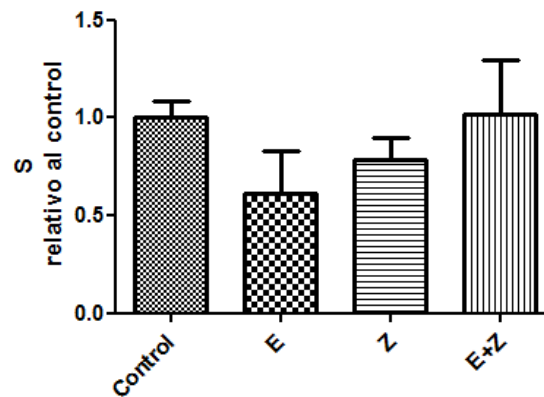
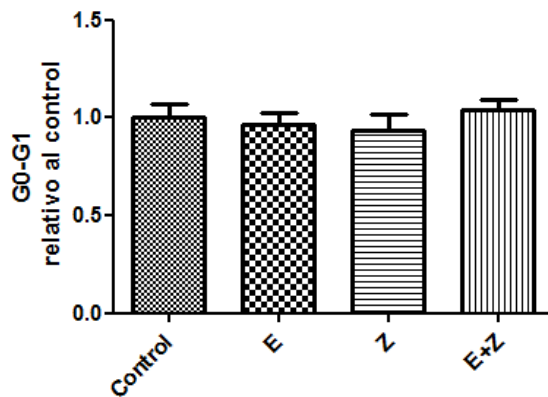
La fase S es la de síntesis de ADN y las fases G2-M son las de separación de cromátidas y división celular (mitosis). Ligeros cambios en el ciclo celular no afectarían los resultados obtenidos anteriormente.

### 3

## Resultados: Ciclo celular

Los tratamientos con E, Z y E+Z no afectan significativamente al ciclo celular en su fase inicial. El tratamiento E parece inhibir la fase S y por tanto la proliferación, pero la diferencia no es estadísticamente significativa. E+Z parece aumentar ligeramente la fase G2-M, pero la diferencia no es significativa. Estos ligeros cambios en el ciclo celular no afectarían los resultados obtenidos anteriormente.

**Por tanto, los tratamientos no inducen cambios estadísticamente significativos en la distribución de células en las fases del ciclo celular que pudieran afectar los resultados previamente obtenidos.**



# 3

## Resultados: Ciclo celular

### Table Analyzed

### G0-G1

One-way analysis of variance

P value 0.702

P value summary ns

Are means signif. different? ( $P < 0.05$ )  
No

Number of groups 4

F 0.4781

R squared 0.08227

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 1.14

P value 0.7673

P value summary ns

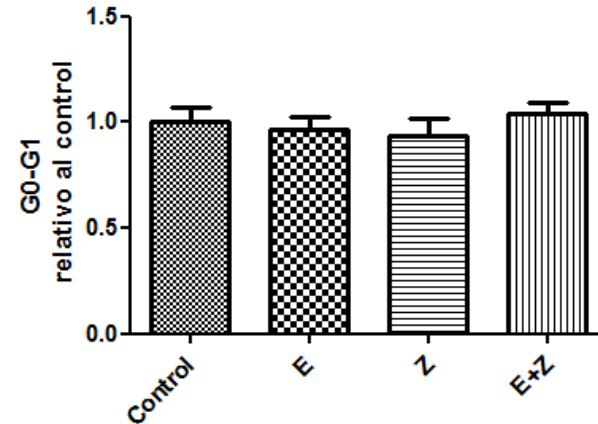
Do the variances differ signif. ( $P < 0.05$ )  
No

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 0.03447 3 0.01149

Residual (within columns) 0.3845 16 0.02403

Total 0.419 19



| Tukey's Multiple Comparison Test | Mean Diff. | q      | Significant? $P < 0.05$ ? | Summary | 95% CI of diff    |
|----------------------------------|------------|--------|---------------------------|---------|-------------------|
| Control vs E                     | 0.03726    | 0.5375 | No                        | ns      | -0.2432 to 0.3178 |
| Control vs Z                     | 0.0683     | 0.9853 | No                        | ns      | -0.2122 to 0.3488 |
| Control vs E+Z                   | -0.04273   | 0.6164 | No                        | ns      | -0.3232 to 0.2378 |
| E vs Z                           | 0.03104    | 0.4478 | No                        | ns      | -0.2494 to 0.3115 |
| E vs E+Z                         | -0.08      | 1.154  | No                        | ns      | -0.3605 to 0.2005 |
| Z vs E+Z                         | -0.111     | 1.602  | No                        | ns      | -0.3915 to 0.1695 |

# 3

## Resultados: Ciclo celular

### Table Analyzed

S

One-way analysis of variance

P value 0.4015

P value summary ns

Are means signif. different? (P < 0.05) No

Number of groups 4

F 1.04

R squared 0.1632

Bartlett's test for equal variances

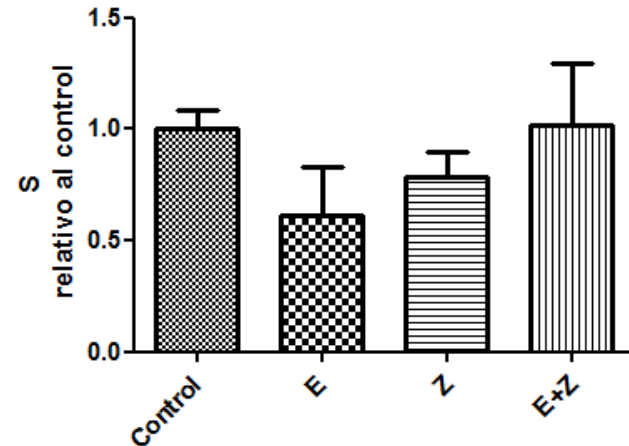
Bartlett's statistic (corrected) 5.711

P value 0.1265

P value summary ns

Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

| ANOVA Table                 | SS     | df | MS     |
|-----------------------------|--------|----|--------|
| Treatment (between columns) | 0.5526 | 3  | 0.1842 |
| Residual (within columns)   | 2.833  | 16 | 0.1771 |
| Total                       | 3.386  | 19 |        |



|                                  | Mean     |        | Significant? P < 0.05? | Summar |                   |
|----------------------------------|----------|--------|------------------------|--------|-------------------|
| Tukey's Multiple Comparison Test | Diff.    | q      |                        | y      | 95% CI of diff    |
| Control vs E                     | 0.384    | 2.041  | No                     | ns     | -0.3774 to 1.145  |
| Control vs Z                     | 0.2186   | 1.162  | No                     | ns     | -0.5428 to 0.9800 |
| Control vs E+Z                   | -0.01913 | 0.1017 | No                     | ns     | -0.7805 to 0.7423 |
| E vs Z                           | -0.1654  | 0.8792 | No                     | ns     | -0.9269 to 0.5960 |
| E vs E+Z                         | -0.4032  | 2.142  | No                     | ns     | -1.165 to 0.3582  |
| Z vs E+Z                         | -0.2377  | 1.263  | No                     | ns     | -0.9991 to 0.5237 |

# 3

## Resultados: Ciclo celular

### Table Analyzed

### G2-M

One-way analysis of variance

P value 0.0166

P value summary \*

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 4

F 4.601

R squared 0.4631

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected) 5.763

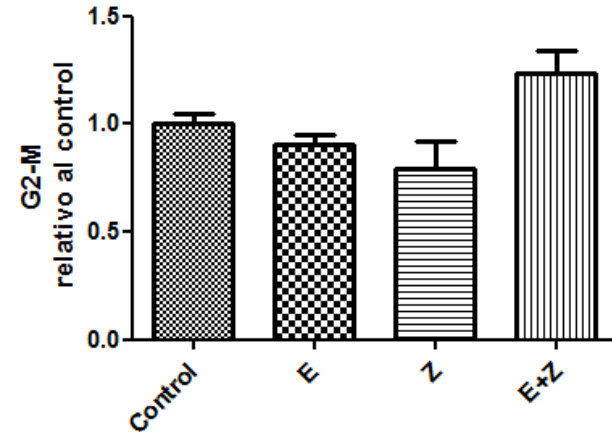
P value 0.1238

P value summary ns

Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table

|                             | SS     | df | MS      |
|-----------------------------|--------|----|---------|
| Treatment (between columns) | 0.526  | 3  | 0.1753  |
| Residual (within columns)   | 0.6097 | 16 | 0.03811 |
| Total                       | 1.136  | 19 |         |

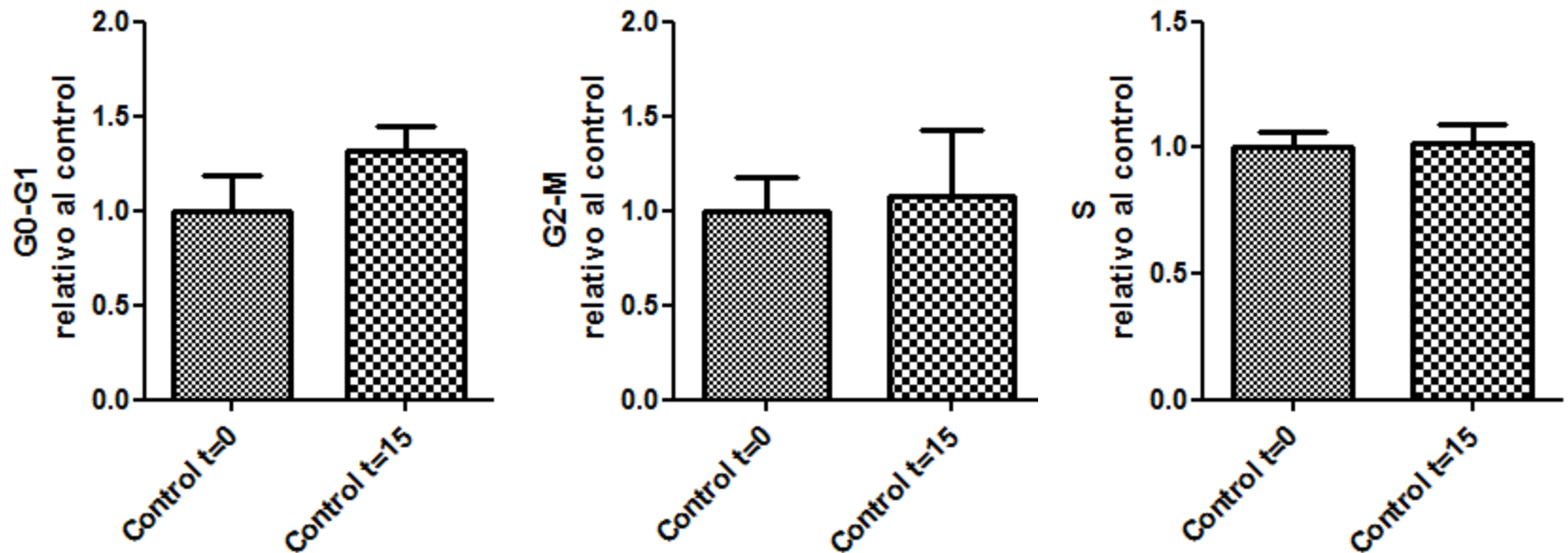


| Tukey's Multiple Comparison Test Diff. | Mean    | q     | Significant? P < 0.05? | Summar | 95% CI of diff      |
|----------------------------------------|---------|-------|------------------------|--------|---------------------|
| Control vs E                           | 0.0938  | 1.074 | No                     | ns     | -0.2594 to 0.4470   |
| Control vs Z                           | 0.2055  | 2.354 | No                     | ns     | -0.1477 to 0.5587   |
| Control vs E+Z                         | -0.235  | 2.691 | No                     | ns     | -0.5882 to 0.1183   |
| E vs Z                                 | 0.1117  | 1.279 | No                     | ns     | -0.2415 to 0.4649   |
| E vs E+Z                               | -0.3288 | 3.766 | No                     | ns     | -0.6820 to 0.02446  |
| Z vs E+Z                               | -0.4404 | 5.045 | Yes                    | *      | -0.7937 to -0.08722 |

### 3

## Resultados: Ciclo celular (solo irradiación)

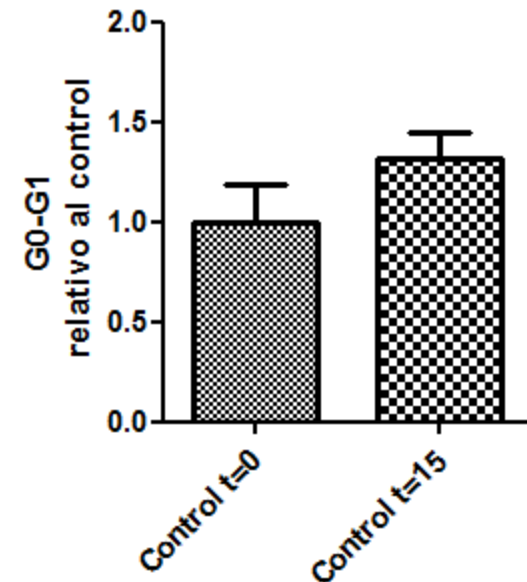
La fase G0-G1 es la etapa de reposo de la célula o preparación para entrar en división. La irradiación con luz UV induce un ligero aumento del número de células en G0-G1 que no es estadísticamente significativo y no afecta al resto de fases.



### 3

## Resultados: Ciclo celular (solo irradiación)

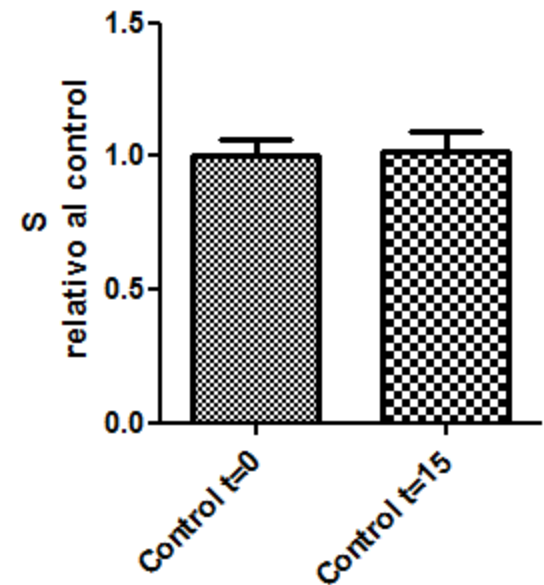
| Table Analyzed                          | G0-G1 controles        |
|-----------------------------------------|------------------------|
| Column A                                | Control t=0            |
| vs                                      | vs                     |
| Column B                                | Control t=15           |
| Unpaired t test                         |                        |
| P value                                 | 0.2004                 |
| P value summary                         | ns                     |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No                     |
| One- or two-tailed P value?             | Two-tailed             |
| t, df                                   | t=1.395 df=8           |
| How big is the difference?              |                        |
| Mean $\pm$ SEM of column A              | 1.000 $\pm$ 0.1907 N=5 |
| Mean $\pm$ SEM of column B              | 1.318 $\pm$ 0.1244 N=5 |
| Difference between means                | -0.3177 $\pm$ 0.2277   |
| 95% confidence interval                 | -0.8428 to 0.2073      |
| R squared                               | 0.1957                 |
| F test to compare variances             |                        |
| F,DFn, Dfd                              | 2.349, 4, 4            |
| P value                                 | 0.4285                 |
| P value summary                         | ns                     |
| Are variances significantly different?  | No                     |



# 3

## Resultados: Ciclo celular (solo irradiación)

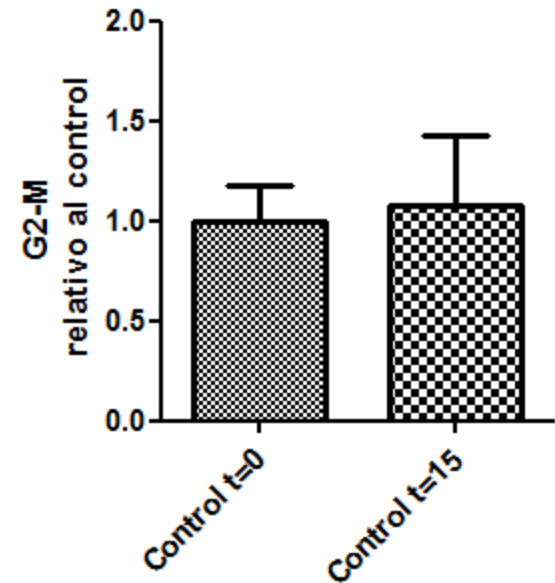
| Table Analyzed                          | S control           |
|-----------------------------------------|---------------------|
| Column A                                | Control t=0         |
| vs                                      | vs                  |
| Column B                                | Control t=15        |
| Unpaired t test                         |                     |
| P value                                 | 0.8321              |
| P value summary                         | ns                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | No                  |
| One- or two-tailed P value?             | Two-tailed          |
| t, df                                   | t=0.2190 df=8       |
| How big is the difference?              |                     |
| Mean ± SEM of column A                  | 1.000 ± 0.06377 N=5 |
| Mean ± SEM of column B                  | 1.021 ± 0.07120 N=5 |
| Difference between means                | -0.02093 ± 0.09558  |
| 95% confidence interval                 | -0.2413 to 0.1995   |
| R squared                               | 0.00596             |
| F test to compare variances             |                     |
| F,DFn, Dfd                              | 1.247, 4, 4         |
| P value                                 | 0.836               |
| P value summary                         | ns                  |
| Are variances significantly different?  | No                  |



# 3

## Resultados: Ciclo celular (solo irradiación)

| Table Analyzed                              | G2-M control           |
|---------------------------------------------|------------------------|
| Column A                                    | Control t=0            |
| vs                                          | vs                     |
| Column B                                    | Control t=15           |
| Unpaired t test                             |                        |
| P value                                     | 0.8502                 |
| P value summary                             | ns                     |
| Are means signif. different? ( $P < 0.05$ ) | No                     |
| One- or two-tailed P value?                 | Two-tailed             |
| t, df                                       | t=0.1951 df=8          |
| How big is the difference?                  |                        |
| Mean $\pm$ SEM of column A                  | 1.000 $\pm$ 0.1812 N=5 |
| Mean $\pm$ SEM of column B                  | 1.077 $\pm$ 0.3530 N=5 |
| Difference between means                    | -0.07740 $\pm$ 0.3968  |
| 95% confidence interval                     | -0.9924 to 0.8376      |
| R squared                                   | 0.004734               |
| F test to compare variances                 |                        |
| F,DFn, Dfd                                  | 3.795, 4, 4            |
| P value                                     | 0.2247                 |
| P value summary                             | ns                     |
| Are variances significantly different?      | No                     |





**Proyecto: Reparación ADN 2012**

**Cliente: Sesderma**

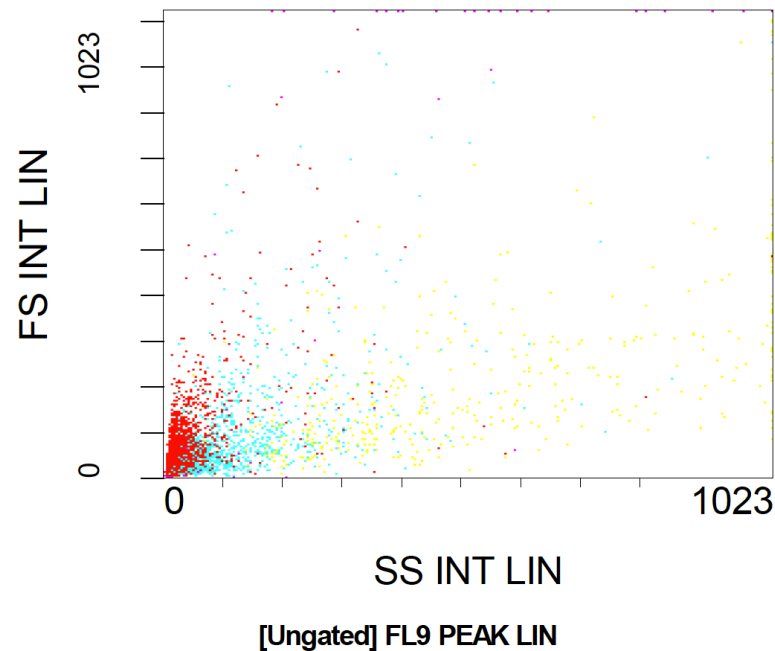
**ANEXOS**

## ANEXO 1: Breve explicación sobre la adquisición y análisis de datos

Tras tratar las muestras con las cremas se exponen a la radiación UV y se analiza el daño celular basándonos en la presencia de dímeros de timina inducidos por UV, activación de la H2Ax y alteraciones en el ciclo celular.

Eventos por morfología

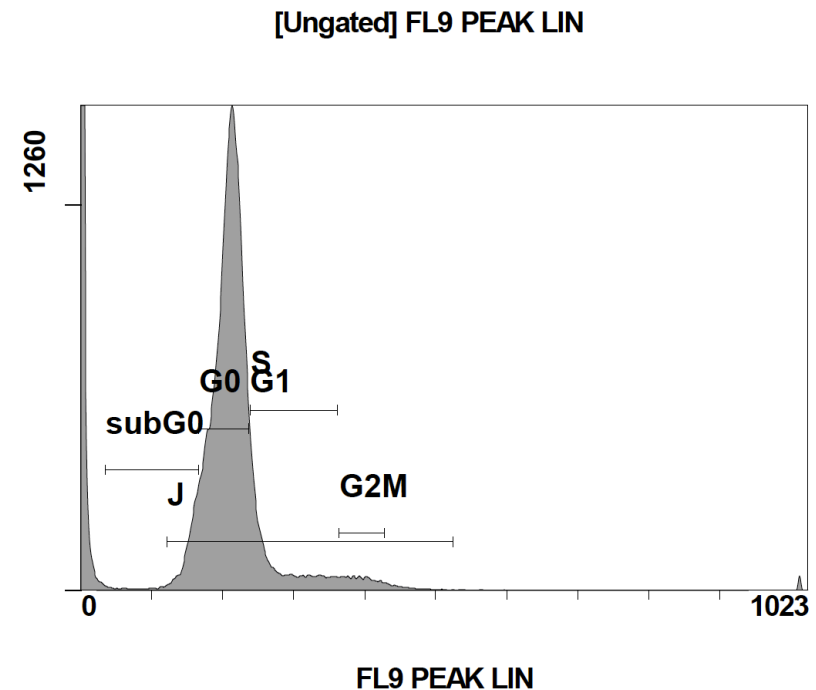
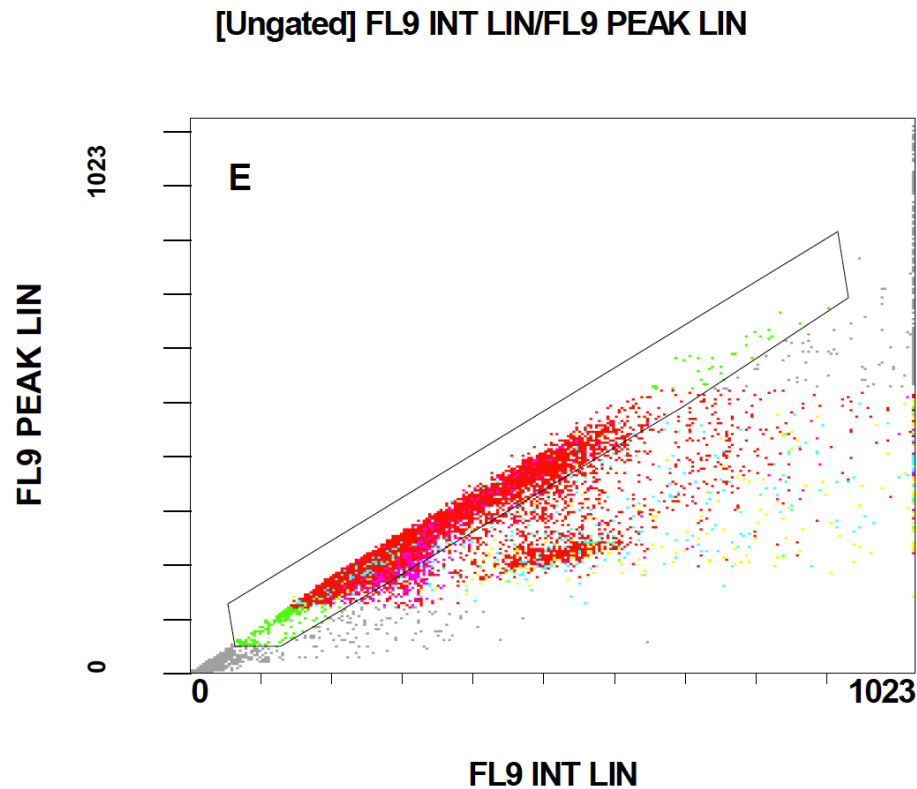
[J] SS INT LIN/FS INT LIN



## ANEXO 1: Breve explicación sobre la adquisición y análisis de datos

Ciclo celular (Tinción Hoechst)

Se eliminan los agregados y se selecciona el área J donde están todos los núcleos sanos para análisis de fluorescencia. El pico en 0 se descarta (debris).

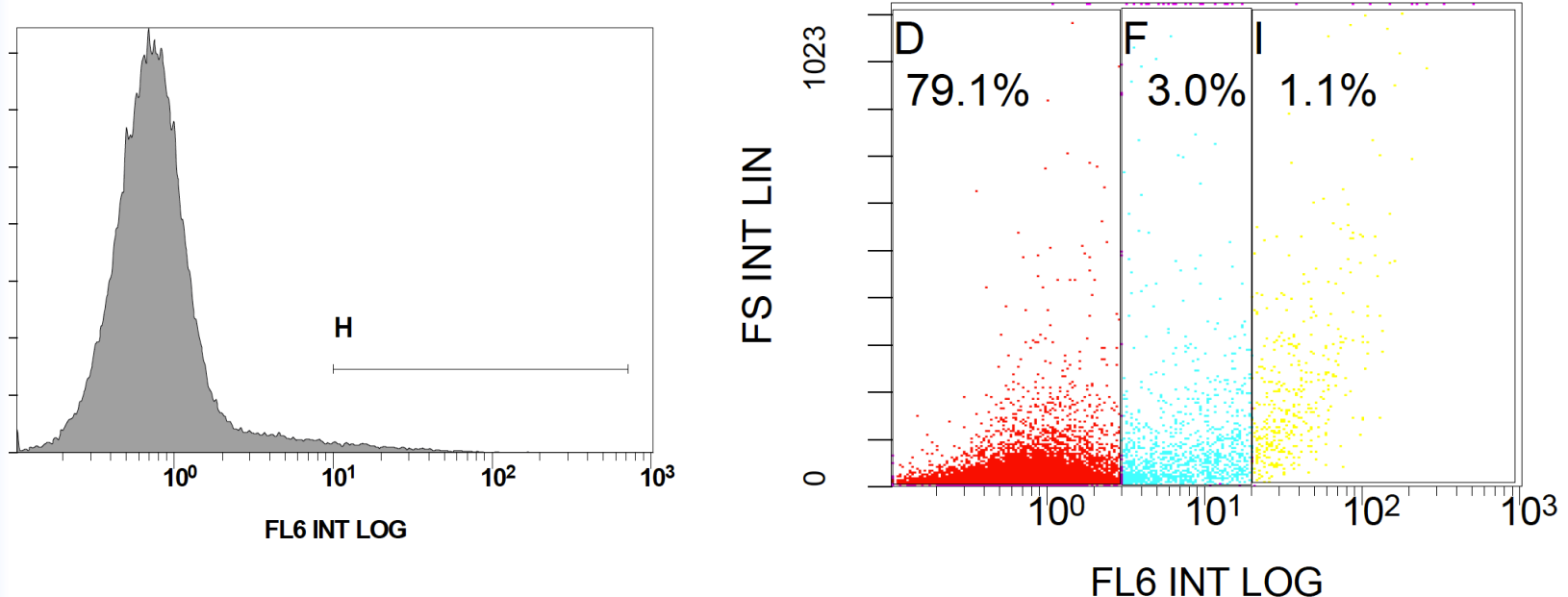


## ANEXO 1: Breve explicación sobre la adquisición y análisis de datos

Tinción dímeros de timina, análisis de la intensidad de fluorescencia.

Los núcleos identificados en la gráfica de ciclo celular se clasifican a continuación por su cantidad de fluorescencia.

Escala logarítmica, se identifican tres zonas de intensidad. Zona D (basal), zona F (intensidad alta) y zona I (intensidad muy alta).





**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE  
DOS COMPUESTOS PARA REPARAR EL  
ADN DAÑADO TRAS LA EXPOSICIÓN A  
RADIACIÓN UV**



# INFORME FINAL

“Determinación de la capacidad  
de dos compuestos para reparar el  
ADN dañado tras la exposición a  
radiación UV”

**INF.06.01.02**

---

**NOMBRE INVESTIGADOR PRINCIPAL**

BEATRIZ SALESA LANDETE

**NOMBRE DIRECTOR DE ESTUDIO**

JOSÉ LUIS MULLOR SANJOSÉ

**FECHA**

05/08/2013

**FECHA**

9/9/2013

## ÍNDICE

|                                                                        |                               |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Introducción .....</b>                                              | <b>1</b>                      |
| <b>1 Título estudio .....</b>                                          | <b>2</b>                      |
| <b>2 Producto de ensayo.....</b>                                       | <b>2</b>                      |
| <b>3 Nombre del investigador que ha llevado a cabo el estudio.....</b> | <b>2</b>                      |
| <b>4 Registro de fechas .....</b>                                      | <b>2</b>                      |
| <b>5 Plataforma utilizada .....</b>                                    | <b>2</b>                      |
| <b>6 Determinación del método y los materiales utilizados .....</b>    | <b>3</b>                      |
| 6.1 Equipamiento analítico .....                                       | 3                             |
| 6.2 Reactivos .....                                                    | 3                             |
| 6.3 Procedimiento.....                                                 | 3                             |
| <b>7 Resumen de los resultados .....</b>                               | <b>5</b>                      |
| 7.1 Primer ensayo.....                                                 | ¡Error! Marcador no definido. |
| 7.2 Segundo ensayo.....                                                | ¡Error! Marcador no definido. |
| 7.3 Tercer ensayo.....                                                 | ¡Error! Marcador no definido. |
| <b>8 Conclusiones .....</b>                                            | <b>6</b>                      |
| <b>9 Referencias y notas .....</b>                                     | <b>7</b>                      |

## Introducción

La radiación UV induce roturas y formación de nuevos enlaces covalentes entre los nucleótidos del ADN. Estas lesiones se reparan normalmente por mecanismos endógenos de reparación celular antes de la replicación del ADN. Pero si estas lesiones son demasiado frecuentes o numerosas pueden generar mutaciones durante la replicación que se fijan en el DNA y se transmitan a las células hijas. Entre los grupos de lesiones de formación de nuevos enlaces está la formación de dímeros de pirimidina (timina o citosina) en los que se fusionan dos nucleótidos contiguos de T o de C. Este tipo de lesiones se puede detectar usando anticuerpos monoclonales específicos para TT o para CC y cuantificar posteriormente usando citometría de flujo y midiendo la cantidad de anticuerpo que se une al núcleo de cada célula, que es directamente proporcional a la cantidad de dímeros presentes.

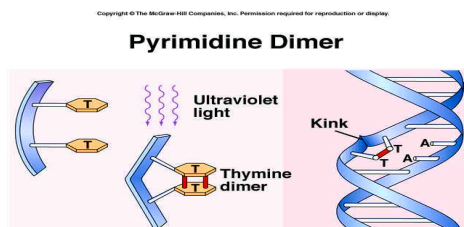


*Figura 1.- Formación de Dímeros de timina*

En este procedimiento induciremos la formación de dímeros de Timina mediante irradiación con luz UV en *eleuthero* *embryos* de peces en distintas condiciones con tratamiento con crema o sin él. Posteriormente cuantificaremos la cantidad de dímeros de timina presentes en cada muestra para determinar la capacidad de las cremas de reducir la formación de dímeros de timina. En este procedimiento se utilizarán dos cremas proporcionadas por Sesderma e identificadas como "Competencia" y "Sesderma".

## **1 Título estudio**

Determinación de la capacidad de dos compuestos para reparar el ADN dañado tras la exposición a radiación UV

## **2 Producto de ensayo**

- Repaskin Sunscreen Gel Cream SPF 50 L-30736 (Sesderma)
- Fotoprotector SPF 50+ con enzimas reparadoras (Producto competencia)

## **3 Nombre del investigador que ha llevado a cabo el estudio**

Beatriz Salesa Landete

## **4 Registro de fechas**

**Fecha inicio estudio:** 26/06/2013

**Fecha fin estudio:** 26/07/2013

**Fecha inicio fase experimental:** 26/06/2013

**Fecha fin fase experimental:** 18/07/2013

## **5 Plataforma utilizada**

*Eleuthero* *embryos* de peces medaka de la especie *Oryzias latipes* (ver notas).

## **6 Determinación del método y los materiales utilizados**

### **6.1 Equipamiento analítico**

Microscopio estereoscópico de luz transmitida, incubador refrigerado, lámpara de luz UV, centrífuga refrigerada, termobloque, citómetro de flujo, software de análisis estadístico, micropipetas, puntas, pipetas, propipeta, pipetas pasteur, gradilla, tubos de microcentrífuga, balanza de precisión, y material fungible.

### **6.2 Reactivos**

Yamamoto 1x (NaCl,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaHCO}_3$  de Sigma-Aldrich, KCl de USB) Tripsina/EDTA (Gibco), Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich), PBS 1x (Nalgene), PFA 4% (Aname), Monoclonal Anti-Thymine Dimer antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich), Goat pAb to Ms IgG1 (Abcam), y agua destilada.

### **6.3 Procedimiento**

- Número de ensayos: **2**
- Número de grupos por ensayo: **5**
- Número de réplicas por ensayo: **3**
- Número de embriones por réplica: **7 embriones**

| Ensayos | Réplicas | Grupos    |                                                                 | Embriones |
|---------|----------|-----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| x3      | x3       | Controles | <u>Anticuerpo Secundario</u>                                    |           |
|         |          |           | Empleado para calibrar el equipo y eliminar el ruido de fondo   | 7         |
|         |          |           | <u>Embrión sin irradiar</u>                                     |           |
|         |          |           | Restar nivel basal de dímeros de timina                         | 7         |
|         |          |           | <u>Embrión Irradiado t=15 minutos</u>                           |           |
|         |          |           | Comprobación de que se ha inducido el daño tras las irradiación | 7         |
|         |          | Tratados  | <u>Competencia</u>                                              | 7         |
|         |          |           | <u>Sesderma</u>                                                 | 7         |

Para cada uno de los experimentos llevado a cabo se usaron embriones de medaka procedentes de un mismo lote recolectados 4 días antes de la realización del ensayo.

Como control negativo se usaron embriones sin tratar, para evaluar el nivel basal de dímeros de timina presentes en los individuos. Como control positivo se usaron embriones irradiados durante 15 minutos y y procesados 15 minutos después (t=15).

Los embriones de los grupos tratados, se les aplicó el producto durante 1 hora, y después se les sometió a la radiación UV. Se procesaron 15 minutos después de la radiación, y se realizó la tinción correspondiente para poder cuantificar la formación de dímeros de timina.

## 7 Resumen de los resultados

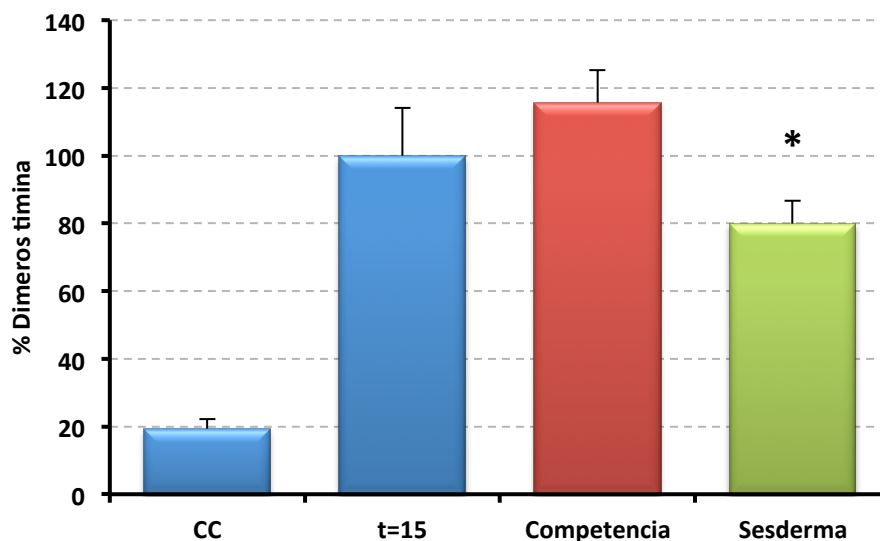


*Tabla 1.- Análisis estadístico de la t d Student entre el producto competencia y el de Sesderma.*

|                | CC   | t=15 min | Competencia | Sesderma |
|----------------|------|----------|-------------|----------|
| Mean           | 19.3 | 100      | 115.7       | 79.96    |
| Std. Deviation | 7.0  | 34.0     | 21.2        | 16.64    |
| Std. Error     | 2.86 | 14.03    | 9.494       | 6.792    |

*Tabla 2.- Medias, desviaciones estándar, y errores estándar de los resultados del Ensayo 1 y 2.*

|                                         |                               |
|-----------------------------------------|-------------------------------|
| Column D<br>vs<br>Column E              | Competencia<br>vs<br>Sesderma |
| Unpaired t test                         |                               |
| P value                                 | 0,0060                        |
| P value summary                         | **                            |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes                           |
| One- or two-tailed P value?             | One-tailed                    |
| t, df                                   | t=3.138 df=9                  |
| How big is the difference?              |                               |
| Mean ± SEM of column D                  | 1.157 ± 0.09494 N=5           |
| Mean ± SEM of column E                  | 0.7996 ± 0.06792 N=6          |
| Difference between means                | 0.3575 ± 0.1139               |
| 95% confidence interval                 | 0.09975 to 0.6152             |
| R squared                               | 0,5224                        |
| F test to compare variances             |                               |
| F,DFn, Dfd                              | 1.628, 4, 5                   |
| P value                                 | 0,6002                        |
| P value summary                         | ns                            |
| Are variances significantly different?  | No                            |

Tabla 3.- Análisis estadístico de la t d Student entre el producto competencia y el de Sesderma.

## 8 Conclusiones

El producto "Sesderma" disminuye la cantidad de dímeros de timina en un **36 ± 11 % (25 - 47 %)** respecto al producto "Competencia" de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) y un intervalo de confianza al 95 % entre el 10% y el 62%.

## 9 Referencias y notas

\* Ensayo *in vitro*, realizado con *eleuterho embryos* de peces, en cumplimiento de las prescripciones legales relativas a la prohibición de experimentación con animales y a la demostración de los efectos reivindicativos de los productos cosméticos, de conformidad con lo establecido en los artículos 18, 20 y 11.2c), del Reglamento (CE) nº 1223/2009, del Parlamento y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos.

