

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 927**

51 Int. Cl.:  
**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2006.01)  
**A61K 8/99** (2006.01)  
**A61K 8/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06778904 .0**  
96 Fecha de presentación: **24.07.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2040803**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Uso de una composición cosmética para luchar contra los efectos de las ondas electromagnéticas en la piel**

30 Prioridad:  
**06.07.2006 FR 0606144**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.08.2012**

73 Titular/es:  
**LABORATOIRES CLARINS  
4, RUE BERTEAUX-DUMAS  
92200 NEUILLY SUR SEINE, FR**

72 Inventor/es:  
**COURTIN, Olivier**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

ES 2 385 927 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de una composición cosmética para luchar contra los efectos de las ondas electromagnéticas en la piel

5 La presente invención se refiere al uso de una composición cosmética para luchar contra los efectos de las ondas electromagnéticas generadas por los teléfonos móviles en la piel y las faneras.

La piel, con una superficie de 2m<sup>2</sup> aproximadamente, es el órgano más grande del organismo. Indispensable para la vida, verdadera interfaz entre el cuerpo y el entorno, una barrera interactiva. Posee gran capacidad de adaptación o  
10 de reacciones frente a las agresiones. También es un sitio privilegiado de absorción de los contaminantes del entorno, con paso de sustancias que pueden tener un efecto tóxico cutáneo directo.

La contaminación puede revestir diferentes aspectos: además de la contaminación de partículas y gases bien documentada se añade asimismo una nueva forma de contaminación por ondas electromagnéticas. La  
15 contaminación no se limita al exterior, se refiere asimismo al interior de los locales: el uso de materiales sintéticos y/o de productos químicos de uso doméstico genera nuevos contaminantes. Los principales agentes son las partículas y el ozono que generan radicales libres.

La piel está en contacto directo con los agentes contaminantes. Los dermatólogos se enfrentan, en las zonas  
20 urbanas, a un recrudescimiento de las pieles irritadas y sensibles y a un agravamiento de ciertas dermatosis.

Numerosos estudios han demostrado el potencial irritante de los agentes contaminantes cuando están en contacto con la piel. Ejercen una acción en la modificación de la composición en lípidos de la piel y acidifican su pH. Estas  
25 diferentes modificaciones conllevan una perturbación de la función de barrera de la piel y una inducción de reacciones de naturaleza oxidativa e inflamatoria, en las capas vivas de la epidermis con expresión de proteínas de estrés, de citocinas proinflamatorias y de metaloproteinasas.

Las ondas electromagnéticas son una forma de energía constituida por vibraciones de campos eléctricos y  
30 magnéticos. No las vemos ni las percibimos, pero están cada vez más presentes en nuestro entorno doméstico.

En nuestras habitaciones, estamos expuestos a los campos magnéticos generados por los aparatos y por las  
instalaciones eléctricas domésticas (hornos de microondas, televisión, radio, móvil).

A partir de un umbral más o menos elevado, de acuerdo con las sensibilidades individuales, estos campos  
35 electromagnéticos pueden influir en nuestro metabolismo.

Las consecuencias de las ondas electromagnéticas en la piel son menos conocidas. Para evaluar sus efectos en el nivel cutáneo, el Solicitante ha puesto a punto un modelo original que permite exponer una epidermis reconstruida *in vitro* a ondas electromagnéticas de una frecuencia dada. Los trabajos del Solicitante han permitido poner de relieve  
40 un aumento de la producción de proteínas de choques térmicos como respuesta al estrés, un descenso de la síntesis de  $\beta$ -defensina II, un descenso de la síntesis de filagrina y de loricrina, y así pues, principalmente un descenso de la diferenciación epidérmica.

La diferenciación terminal de la epidermis es un proceso vectorizado, en el curso del cual el queratinocito -obtenido  
45 de la capa basal germinativa del epitelio- experimenta remodelaciones progresivas metabólicas y estructurales que lo transforman finalmente en corneocito. El apilamiento de estos corneocitos constituye la capa córnea, la parte más externa de la epidermis que asegura -por su gran resistencia- la protección mecánica del organismo y constituye una barrera entre el individuo y su entorno que se opone a las pérdidas hídricas y a la penetración de moléculas exógenas. La capa córnea así formada, resistente e impermeable, permite limitar la pérdida insensible en agua y,  
50 por tanto, conferir a la epidermis una buena hidratación de sus capas superiores que da a la piel la flexibilidad y la elasticidad de las pieles calificadas de 'pieles normales'.

Un descenso de la diferenciación epidérmica conlleva una mala arquitectura del estrato córneo. Esta arquitectura perturbada tiene como consecuencia una cohesión reducida de la barrera cutánea, que se hace menos  
55 impermeable, protege con menos eficacia la piel de los ataques exteriores. En consecuencia se produce un descenso de la hidratación cutánea, un descenso de la flexibilidad y de la elasticidad de la piel.

Los efectos de las ondas en el modelo epidérmico se traducen en un descenso de la filagrina y de la loricrina. El marcador conservado para seguir el efecto del descenso de la diferenciación epidérmica es la loricrina. En efecto,

esta proteína es el constituyente principal del 66 % de la membrana de corneocitos (The journal of biological chemistry, vol. 270, nº 30, pág. 17702 – 17711, 1995). Un descenso de la lorocina en el estrato córneo tiene como consecuencia una desorganización importante de su arquitectura y, con ello, una mala cohesión de la barrera epidérmica.

5

La presente invención se refiere así al uso de al menos un activador de la diferenciación epidérmica para luchar contra los efectos en la piel de las ondas electromagnéticas generadas por los teléfonos móviles, siendo dicho activador un extracto de origen vegetal o marino elegido entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus*, un extracto de *Cedrelopsis grevei*, un extracto de *Salicornia herbacea*, un extracto peptídico de avellana o butirato de caprililo, y aplicándose dicho activador de la diferenciación epidérmica en la piel en la forma de una composición cosmética.

Se entiende por activador de la diferenciación epidérmica un activo que permite aumentar significativamente la diferenciación epidérmica con respecto al testigo de acuerdo con la técnica de inmunomarcado de la citoqueratina y de la filagrina descrita más precisamente en la parte de ejemplo. Se analiza el efecto de un activo en la síntesis de la citoqueratina 10 y de la filagrina, que representan marcadores de diferenciación epidérmica, en cultivos de queratinocitos humanos en monocapa. Los 2 marcadores de la diferenciación son revelados por inmunocitoquímica. La intensidad de la fluorescencia permite localizar la presencia o no de los marcadores.

El activador de la diferenciación epidérmica de acuerdo con la invención es de origen vegetal o marino. Los activadores de la diferenciación epidérmica son elegidos entre un extracto de *Salicornia herbacea*, como, por ejemplo, el comercializado por la compañía Codif con la denominación 'aceite de Salicornia', un extracto peptídico de avellana, como, por ejemplo, el comercializado por la compañía Solabia con la denominación 'Nutelina C', butirato de caprililo. De forma preferente se elige un extracto de *Rhodiola rosea*, como, por ejemplo, el comercializado por la compañía Arch Personal Care con la denominación '*Rhodiola rosea* extract', un extracto de *Thermus thermophilus*, como, por ejemplo, el comercializado por la compañía Sederma con la denominación 'Vénucéane®' y un extracto de *Cedrelopsis grevei*, como, por ejemplo, el comercializado por la compañía Bayer Healthcare con la denominación 'extracto de *Cedrelopsis grevei*'.

*Rhodiola rosea* es una planta vivaz originaria de las altas regiones antárticas del este de Siberia: prospera en un suelo arenoso, rocoso, frío y seco. Tiene una gran capacidad para resistir las tensiones químicas, biológicas o físicas. Esta planta es rica en compuestos fenólicos que tienen un fuerte poder antioxidante pero también en flavonoides, salidroside, rosavina, rosina y rosarina.

De forma ventajosa, el extracto utilizable en el marco de la presente invención se obtiene de las raíces de la planta y, preferentemente, se trata de un extracto hidroglicólico. Después del secado, las raíces de *Rhodiola rosea* se maceran en una mezcla de disolventes de agua y pentilenglicol y se calientan a una temperatura de 50 °C aproximadamente. Una filtración adecuada produce el extracto que se presenta en la forma de un líquido de color ambarino y de olor característico. Presenta las características analíticas siguientes:

40

- pH: 4,0 – 6,0
- porcentaje de materia activa: 0,6 % – 1,2 %

De forma ventajosa, el extracto utilizable en el marco de la presente invención puede ser asimismo un extracto obtenido por microcultivo de un organismo marino: *Thermus thermophilus*. Este microorganismo vive en las profundidades submarinas a 2000 m de profundidad, en la bahía de Guayamas en el golfo de California, a 75 °C, a una presión de 200 bares y en concentraciones importantes de azufre y metales pesados: condiciones extremas de temperatura y un entorno muy prooxidante.

De forma ventajosa, el extracto utilizable en el marco de la presente invención se obtiene por biotecnología. Se cultivan bacterias *Thermus thermophilus* en un medio estándar de fermentación, y el filtrado así obtenido se concentra por ultrafiltración tangencial y finalmente se filtra. El extracto se presenta en la forma de un líquido amarillo oscuro límpido ligeramente opalescente, de olor característico. Presenta las características siguientes:

55

- pH: 7,0 – 8,0
- densidad: 1,010 – 1,030
- índice de refracción: 1,335 – 1,355

Finalmente, de forma ventajosa, el extracto utilizable en el marco de la presente invención puede asimismo ser un

extracto de *Cedrelopsis grevei*. *Cedrelopsis grevei* es un árbol de 5 m a 22 m endémico de Madagascar y de la familia de las pteroxiláceas. Se localiza sobre todo en los bosques densos y secos entre 100 m y 800 m de altitud.

De forma ventajosa el extracto de *Cedrelopsis grevei* usado de acuerdo con la invención es un extracto de corteza del árbol, y preferentemente, se trata de un extracto hidroglicólico o hidroglicerinado. Después de secada, la corteza triturada se macera en una mezcla de alcohol y agua. Después de la evaporación del alcohol y del reajuste con butilenglicol, el extracto se filtra en condiciones estériles. El extracto de *Cedrelopsis grevei* se presenta en la forma de un líquido ambarino de olor característico.

10 La composición de acuerdo con la invención puede contener uno o varios extractos vegetales o marinos activadores de la diferenciación epidérmica. Más en particular, la composición de acuerdo con la invención puede contener uno o varios activadores elegidos entre un extracto de *Salicornia herbacea*, un extracto peptídico de avellana o butirato de caprillo. Y muy preferentemente la composición de acuerdo con la invención puede contener uno o varios extractos elegidos entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus* y un extracto de *Cedrelopsis grevei*.

La composición de acuerdo con la invención contiene:

- del orden del 0,01 % al 10 % en peso, y preferentemente del 0,01 % al 5 % en peso de extracto de *Rhodiola rosea* y/o
- del orden del 0,01 % al 10 % en peso, preferentemente del 0,01 % al 5 % en peso de extracto de *Thermus thermophilus* y/o
- del orden del 0,01 % al 10 % en peso, preferentemente del 0,01 % al 5 % en peso de extracto de *Cedrelopsis grevei*.

25 La composición cosmética de la presente invención de aplicación tópica puede constituir especialmente una composición de protección, de tratamiento o de cuidado cosmético o dermatológico para la cara, para el cuello, para las manos o para el cuerpo, como, por ejemplo, cremas de día, cremas de noche, cremas o aceites solares, leches corporales, una composición capilar (por ejemplo, loción capilar), una composición de maquillaje (por ejemplo, base de maquillaje) o una composición autobronceante. La composición cosmética de la presente invención es, en una forma de implementación preferida, para cuidados de día.

La composición cosmética de acuerdo con la presente invención puede contener uno o varios entre otros componentes conocidos por el experto en la materia, como agentes de formulación o aditivos de uso conocido y clásico en las composiciones cosméticas. A modo de ejemplo y de forma no limitativa, dichos agentes de formulación y aditivos pueden ser gelificantes hidrófilos o lipófilos, suavizantes, colorantes, agentes de solubilización, agentes de textura, perfumes, cargas, absorbentes de olor, activos filmógenos, conservantes, tensioactivos, emulsionantes, aceites, glicoles, vitaminas, filtros solares. Gracias a sus conocimientos en materia de cosméticos, el experto en la materia sabrá qué agentes de formulación añadir a la composición cosmética de acuerdo con la invención y en qué cantidades en función de las propiedades buscadas.

Además, la composición cosmética de acuerdo con la presente invención puede presentarse en cualquier forma conocida por el experto en la materia en el campo de la cosmética sin ninguna otra restricción galénica particular que la de la aplicación en la piel. Así, la composición cosmética de acuerdo con la invención puede tener la forma de una solución o suspensión acuosa, alcohólica o de una suspensión oleosa o de una solución o de una dispersión de tipo loción o suero, de una emulsión de consistencia líquida o semilíquida de tipo leche, obtenidas por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (emulsión aceite en agua: Ac/Ag) o a la inversa (agua en aceite: Ag/Ac), o de una emulsión del tipo crema Ac/Ag o Ag/Ac o de un gel, una loción, una máscara. Asimismo se pueden plantear las formulaciones cosméticas de acuerdo con la invención en la forma de una espuma o incluso en forma de composiciones para aerosol que comprenden asimismo un agente propulsor a presión.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento de tratamiento cosmético para luchar contra los efectos en la piel de las ondas electromagnéticas generadas por los teléfonos móviles, que comprende la aplicación, en la piel o las faneras, de una composición cosmética que comprende al menos un activador de la diferenciación epidérmica, siendo dicho activador un extracto de origen vegetal o marino elegido entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus*, un extracto de *Cedrelopsis grevei*, un extracto de *Salicornia herbacea*, un extracto peptídico de avellana o butirato de caprillo. Dicho activador se elige preferentemente entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus* y un extracto de *Cedrelopsis grevei*.

Los ejemplos mostrados a continuación se refieren, por una parte, a la evaluación de una actividad prodiferenciación epidérmica, y por otra parte a la evaluación del efecto de las ondas electromagnéticas en la piel, así como a la evaluación de la protección aportada por el uso de un extracto de *Rhodiola rosea* y de *Thermus thermophilus*. Se refiere asimismo a composiciones objeto de la presente invención.

5

Los ejemplos hacen referencia a las figuras siguientes, en las cuales:

- La fig. 1 representa una fotografía del testigo no expuesto, control sin antiloricrina.
- La fig. 2 representa una fotografía del testigo no expuesto, con marcado de la loricrina.
- 10 - La fig. 3 representa una fotografía del testigo expuesto a las ondas con marcado de la loricrina 18 horas después de la exposición.
- La fig. 4 representa el testigo 18 horas después de la exposición.
- La fig. 5 representa la epidermis tratada por la mezcla del extracto de *Thermus thermophilus* y del extracto de *Rhodiola rosea* y expuesta a las ondas, con marcado de la loricrina 18 horas después de la exposición.

15

### I. EVALUACIÓN DE UNA ACTIVIDAD PRODIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA

El protocolo permite analizar el efecto de un activo en la síntesis de la citoqueratina 10 y de la filagrina, que representan marcadores de la diferenciación epidérmica, en cultivos de queratinocitos humanos en monocapa.

20

Después de tratamientos en medios nutritivos durante 4 días, los 2 marcadores de la diferenciación se revelan por inmunocitoquímica.

#### A. Material y procedimientos.

25

##### 1. Células usadas

- Tipo: queratinocitos epidérmicos humanos
- Cultivo: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- 30 - Medio: medio DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium) + STF al 10 % (suero de ternera fetal)

##### 2. Protocolo

Las células son aclaradas e incubadas durante 24 horas en un medio DMEM que contiene 2 mM de L-glutamina y el 35 10 % de STF, medio nutritivo usado para el estudio. Las células son aclaradas e incubadas 96 horas con el activo para ensayo en las diferentes concentraciones elegidas.

A continuación se aclara cada capa celular, se fija al metanol (-20 °C) antes de proceder a la obtención de la filagrina y de la citoqueratina 10 por inmunofluorescencia.

40

##### B. Resultados.

Observada en luz ultravioleta, la fluoresceína fijada en los marcadores emite fluorescencia en verde y permite localizarlos.

45

### II. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS DE FRECUENCIA 900 MHZ EN EPIDERMIS RECONSTRUIDAS.

#### A. Material y procedimientos.

50

##### 1. Exposición a las ondas electromagnéticas.

Se ha expuesto un modelo de epidermis reconstruida durante 6 horas a ondas de 900 MHz en una cámara aislada con el fin de no tener ninguna otra onda electromagnética que la de la frecuencia deseada. Las ondas de 900 MHz 55 elegidas para la experimentación corresponden a las ondas más frecuentes de los teléfonos móviles.

Después de la exposición, las epidermis se incuban a 37 °C con el fin de evaluar las perturbaciones engendradas por la exposición. Una epidermis se incubaba durante 18 horas: se compara con una epidermis testigo no expuesta.

Para determinar los efectos de las ondas electromagnéticas de frecuencia 900 MHz en la epidermis reconstruida *in vitro*, se ha usado la técnica del chip de ADN. Esta técnica reciente permite determinar la posible activación o represión de la expresión de los genes. El chip elegido permite seguir la expresión de 600 genes mayores de la epidermis. A continuación se ha realizado una confirmación por la técnica RT-PCR, o PCR por transcripción inversa.

5

2. Muestras usadas.

a) Muestras para chip de ADN y RT-PCR.

- 10 - T1 (6 h) y T2 (6 h): testigos no expuestos, tomados después de 6 h (= testigos 6 h).  
 - EXP1 (6 h) y EXP2 (6 h): expuestos durante 6 h y tomados inmediatamente después (= expuestos 6 h).  
 - T3 (6 h + 18 h) y T4 (6 h + 18 h): testigos no expuestos durante 6 h y tomados después de 18 h de incubación suplementaria (= testigos 6 h + 18 h).  
 - EXP3 (6 h + 18 h) y EXP4 (6 h + 18 h): expuestos durante 6 h y tomados después de 18 h de incubación  
 15 suplementaria (= expuestos 6 h + 18 h).

b) Muestras para inmunohistoquímica

Lotes de epidermis expuestos durante 6 h y tomados después de 18 h de incubación.

20

- lote de epidermis no expuestas (controles)
- lote de epidermis expuestas (testigos expuestos)
- lote de epidermis tratadas con un extracto de *Rhodiola rosea* y un extracto de *Thermus thermophilus* y expuestas

25 3. Efectos en la expresión de los genes - chip de ADN

El análisis de la expresión de los genes por chip de ADN se ha realizado en membranas "Custom ATLAS BA600/1" seleccionadas por su importancia en la fisiología cutánea.

- 30 La metodología usada es la propuesta por Clontech (Palo Alto, EE.UU. protocolo n° PT3140-1 versión n° PR0X591 - <http://www.clontech.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3140-1.pdf>). La extracción/purificación del ARN de cada muestra ha conducido al aislamiento de cantidades de ARN total adecuadas.

- 35 Las soluciones de ARN total, que contienen todas la enzima ARNasa OUT con el fin de inhibir las eventuales ARNasas, han sido tratadas con ADNasa I de acuerdo con el procedimiento propuesto por Ambion (ref. 1906 – versión manual 0503 ([http://www.ambion.com/techlib/prot/bp\\_1906.pdf](http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_1906.pdf)), para eliminar cualquier traza de ADN que contamine el ARN.

- 40 A continuación se ha verificado la calidad del ARN en gel de agarosa para verificación de la calidad, de la cantidad y de la ausencia de ADN.

Los ARN que provienen de muestras que hayan experimentado el mismo tratamiento se han conservado en reserva.

- 45 La etapa siguiente ha sido la purificación de las reservas de ARN mensajeros (ARNm) por hibridación de los extremos poli(A) de los ARNm en cebadores oligo(dT) biotinilados y captura selectiva en bolas de estreptavidina, de acuerdo con el protocolo AtlasPure (Clontech). Las sondas ADN múltiples marcadas con <sup>33</sup>P han sido realizadas por transcripción inversa de los ARNm ligados en bolas de poli(dT), con ayuda de un lote de primarios específicos de las secuencias inmovilizadas en los chips, en presencia de [ $\alpha^{33}$ P]-dATP. Esta etapa ha usado los reactivos y el  
 50 protocolo propuesto por Clontech. Las sondas marcadas han sido purificadas por cromatografía en columnas de exclusión, la calidad y la equivalencia de las sondas marcadas ha sido evaluada por recuento en centelleo líquido.

Se han pretratado dos series de dos membranas "Custom ATLAS BA600/1" y después se han hibridado los ADNc inmovilizados en cada membrana (68C, una noche) con las sondas marcadas correspondientes; a continuación se han lavado los filtros extensamente (68C) y se han colocado en bolsas de plástico individuales para análisis.

55

- Serie n° 1: membrana n° 1 - Testigos no expuestos, tomados después de 6 h = testigos 6 h.
- membrana n° 2 - Expuestos durante 6 h y tomados inmediatamente después = expuestos 6 h.
- Serie n° 2: membrana n° 1 - Testigos no expuestos durante 6 h y tomados después de 18 h de incubación  
 suplementaria = testigos 6 h + 18 h

membrana n° 2 - Expuestos durante 6 h y tomados después de 18 h de incubación suplementaria = expuestos 6 h + 18 h.

El análisis ha tenido lugar por cuantificación directa de la radioactividad de puntos con ayuda de un aparato  
5 PhosphorImager Cyclone (Packard instruments; 3 h, y después 72 h de adquisición) y del software BD AtlasImage™  
2.7 (BD Biosciences Clontech).

#### 4. Efectos en la expresión de la loricrina RT-PCR.

10 La confirmación de la expresión del marcador seleccionado, la loricrina, ha sido evaluada por RT-Q-PCR.

##### a) Transcripción inversa.

Realización de la reacción de transcripción inversa de ARNm, en presencia del cebador oligo(dT) y de la enzima  
15 Superscript II (Gibco). Después cuantificación, por fluorescencia, del ADNc sintetizado y ajuste de las  
concentraciones. Se realiza una nueva cuantificación de cada ADNc, después de dilución final, antes de la reacción  
de PCR.

##### b) PCR cuantitativa.

20 Las reacciones de PCR o ACP (amplificación en cadena por polimerasa) se han realizado mediante PCR cuantitativa  
con el sistema "Light Cycler" (Roche Molecular Systems Inc.) y de acuerdo con los procedimientos recomendados  
por el proveedor.

25 Este sistema de análisis permite realizar reacciones de PCR rápidas y eficientes, mediante una puesta a punto  
previa de las condiciones de análisis de los diferentes primarios. Está formado por dos componentes principales:

- *un termociclador*: optimizado gracias al uso de capilares de vidrio y a transferencias térmicas extremadamente  
rápidas,

30 - *un fluorímetro*: que permite medir de forma continua la intensidad de fluorescencia incorporada en el ADN  
(detección a 521 nm).

La mezcla de reacción (10 µl final) introducida en los capilares para cada muestra es la siguiente:

35 - 2,5 µl de ADNc diluido a la 1/10<sup>a</sup>.

- cebadores de los diferentes marcadores usados

- Mezcla de reacción (Roche) que contiene la enzima taq ADN polimerasa, el marcador SYBR Green I (fluoróforo  
que se intercala en el ADN bicatenario, en el curso de la etapa de elongación) y del MgCl<sub>2</sub>.

40 Las condiciones de PCR son las siguientes:

- Activación: 10 min a 95 °C

- Reacciones de PCR: [10 seg a 95 °C, 5 seg a 64 °C y 35 seg a 72 °C] 40 ciclos.

- Fusión: 5 seg a 95 °C y después 5 seg a 60 °C.

45

##### c) Análisis de Q-PCR.

La incorporación de fluorescencia en el ADN amplificado se mide en continuo en el curso de los ciclos de PCR. Este  
sistema permite obtener curvas de medida de la fluorescencia en función de los ciclos de PCR y evaluar así un valor  
50 de expresión relativa para cada marcador.

El valor de RE (expresión relativa) se expresa en unidades arbitrarias de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$(1/2^{\text{número de ciclos}}) \times 10^6$$

55

#### 5. Efectos en la expresión de la loricrina-inmunohistoquímica

Se han realizado cortes transversales de las epidermis en el micrótopo (grosor 5 µm, 2 láminas por epidermis,

varios cortes por láminas) y después se mantienen a temperatura ambiente hasta la realización de los marcados.

- Los cortes se han desparafinado en acetona glacial durante 10 minutos a -20 °C y después se han aclarado en agua destilada. Los marcados inmunohistoquímicos se han realizado con ayuda del autómata Austostainer (DakoCytomation) y del kit LSAB + (DakoCytomation K067911). Brevemente, las láminas se han tratado con agua oxigenada con el fin de bloquear las peroxidases endógenas, se han aclarado y después se han incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente en la solución de anticuerpos primaria, anti-loricrina. Después de los lavados, se han incubado los cortes durante 15 minutos a temperatura ambiente con la solución de anticuerpos secundarios acoplados a la biotina, de nuevo se ha aclarado y después incubado durante 15 minutos con la solución de peroxidasa acoplada a la estreptavidina. El revelado enzimático se ha realizado con ayuda de la mezcla sustrato/cromógeno del kit LSAB + . A continuación las láminas se han lavado, contracolorado con una solución de hematoxilina (DakoCytomation S3309), aclarado con agua destilada y después montado en medio acuoso Glycergel (DakoCytomation C0563).
- 15 Los cortes se han observado con ayuda de un microscopio invertido NIKON Diaphot 300 (objetivo x40). Las capturas de imágenes se han realizado con ayuda de una cámara COHU controlada por un software Lucía 7.0.

## B. Resultados.

### 20 1. Expresión del gen de la loricrina - chip de ADN

Los resultados se expresan en unidades relativas de expresión (RE). Estos niveles se someten a corrección de ruido de fondo medio presente en cada membrana y de las diferencias de intensidad de marcado de las diferentes sondas usadas (esta corrección se realiza en la base de las diferencias de intensidad de marcado de los genes de referencia).

En esta experiencia, la exposición de las epidermis a las ondas reducía el 38 % el nivel de expresión de la loricrina 2 horas después de la exposición y de 28 % 18 horas después de la exposición. Estas variaciones, de baja intensidad, necesitaban ser verificadas por RT-PCR cuantitativa.

30

### 2. Expresión del gen de la loricrina -RT-PCR

El análisis cuantitativo de la tasa de ARNm correspondiente a la loricrina se ha realizado mediante RT-PCR cuantitativa. La exposición de las epidermis a las ondas reducía el 20 % el nivel de expresión de la loricrina 2 horas después de la exposición y lo aumentaba el 20 % 18 horas después de la exposición.

35

### 3. Expresión del gen de la loricrina-Inmunohistoquímica

#### a) Control de anticuerpo secundario en solitario (fig. 1)

40

De acuerdo con lo que se esperaba, no se ha observado ninguna señal en el seno de la epidermis cuando se ha realizado el marcado en presencia del anticuerpo secundario en solitario (sin anticuerpo primario anti-loricrina).

#### b) Efecto de la exposición a las ondas (fig. 2 y 3)

45

El marcado anti-loricrina estaba localizado principalmente en el nivel de la capa granulosa. El marcado era menos intenso y discontinuo en las epidermis expuesto a las ondas telefónicas.

#### c) Efecto del extracto de *Rhodiola rosea* y del extracto de *Thermus thermophilus* (fig. 4 y 5)

50

En estas condiciones experimentales, el tratamiento de epidermis expuestas a las ondas por el producto "Activo A + B" ha aumentado la intensidad del marcado con respecto al testigo expuesto. El marcado podría ser superior al del testigo no expuesto.

### 55 C. Conclusión.

La técnica del chip de ADN es poderosa para detectar los efectos de los tratamientos en el nivel de expresión de numerosos genes en un único ensayo, nos ha permitido hacer así un primer cribado. Por el contrario, presenta el inconveniente de no ser cuantitativa y de ser fiable sólo para amplitudes de variación de expresión importante.

Inversamente, la técnica RT-PCR cuantitativa presenta la ventaja de medir con precisión la tasa de ARN mensajero de un gen dado. En los ensayos realizados, el análisis mediante el chip de ADN indicaba una disminución de expresión de la loricrina después de la exposición de las epidermis a las ondas, mientras que la RT-PCR ha mostrado una disminución del 20 % del nivel de expresión de la loricrina 2 horas después de la exposición y un aumento del 20 % 18 horas después de la exposición. El análisis por inmunomarcado de cortes de epidermis ha confirmado una disminución de la loricrina 18 horas después de la exposición. Esta aparente contradicción podría explicarse por el hecho de que la disminución de ARNm a 2 horas sólo se traduce en el nivel proteico más tardíamente.

10 Los extractos de *Rhodiola rosea* y de *Thermus thermophilus* han mostrado una clara protección contra este efecto inhibidor de las ondas en la expresión de la loricrina y, por tanto, de la diferenciación epidérmica.

### III. EJEMPLOS

#### 15 A. GEL CREMA ANTI-ONDAS

		%
	AGUA DESMINERALIZADA	q.s.p 100
	PEMULENO TR1	0,5
20	GLICERINA	5,0
	SEPIGEL 305	1,0
	EXTRACTO DE RHODIOLA ROSEA	2,0
	EXTRACTO DE THERMUS THERMOPHILLUS	2,0
	ISONONANOATO DE ISONONILO	7,0
25	BENZOATO DE ALQUILO C12 - C15	3,0
	ACEITE DE SILICONA	2,0
	HIDRÓXIDO DE SODIO	0,2
	AROMATIZANTE	0,3
	COLORANTES AL 1 %	0,12
30	CONSERVANTES	1,0

#### B. CREMA ANTI-ONDAS

		%
35	AGUA DESMINERALIZADA	q.s.p 100
	GLUCÓSIDO DE CETEARILO	5,0
	TRIGLICÉRIDOS C8-C10	10
	ACEITE DE SILICONA	2,0
	SILICONA VOLÁTIL	5,0
40	CARBÓMERO	0,2
	GLICERINA	5,0
	EXTRACTO DE RHODIOLA ROSEA	2,0
	EXTRACTO DE THERMUS THERMOPHILLUS	2,0
	AROMATIZANTE	0,3
45	CONSERVANTES	1,0

#### C. LOCIÓN PARA LA PIEL ANTI-ONDAS

		%
50	AGUA DESMINERALIZADA	q.s.p 100
	EDTA DISÓDICO	0,2
	CLORURO DE SODIO	1,0
	EXTRACTO DE RHODIOLA ROSEA	2,0
	EXTRACTO DE THERMUS THERMOPHILLUS	2,0
55	EXTRACTO DE CEDRELOPSIS GREVEI	2,0
	AGUA DE ROMERO	4,0
	GLICOL	1,0
	CONSERVANTES	1,0

D. LOCIÓN CAPILAR ANTI-ONDAS

	%
DIMETICONA	8,00
5 SOLUCIÓN DE COLORANTE	0,60
ACEITES ESENCIALES	0,40
ALCOHOL 96,2° NO DESNATURALIZADO	25,00
EXTRACTO DE CEDRELOPSIS GREVEI	2,00
EXTRACTO DE RHODIOLA ROSEA	2,00
10 EXTRACTO DE THERMUS THERMOPHILLUS	2,00
AROMATIZANTE	1,00
AGUA DESMINERALIZADA	Q.s.P 100

E. BASE DE MAQUILLAJE ANTI-ONDAS

	%
15	
EXTRACTO DE CEDRELOPSIS GREVEI	2,00
EXTRACTO DE RHODIOLA ROSEA	2,00
EXTRACTO DE THERMUS THERMOPHILLUS	2,00
20 EMULSIONANTE DE SILICONA	5,00
CO-EMULSIONANTE	0,50
ÁCIDO SÓRBICO	0,05
METOXICINAMATO DE OCTILO	5,00
CERA DE SILICONA	3,00
25 SILICONA VOLÁTIL	10,50
GEL DE BENTONA	2,00
ÓXIDOS DE HIERRO	13,40
ELASTÓMERO DE SILICONA	2,00
SILICONA EN POLVO	0,90
30 AROMATIZANTE	0,50
CLORURO DE SODIO PURO	2,00
EDTA	0,10
CONSERVANTE	1,00
SERICITA	0,20
35 MICA / TITANIO	0,20
PROPILENGLICOL	4,10
AGUA DESMINERALIZADA	Q.s.P 100

**REIVINDICACIONES**

1.            Uso de al menos un activador de la diferenciación epidérmica para luchar contra los efectos en la piel de las ondas electromagnéticas generadas por los teléfonos móviles, siendo dicho activador un extracto de origen  
5 vegetal o marino elegido entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus*, un extracto de *Cedrelopsis grevei*, un extracto de *Salicornia herbacea*, un extracto peptídico de avellana o butirato de caprililo, y aplicándose dicho activador de la diferenciación epidérmica en la piel en la forma de una composición cosmética.
2.            Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho activador es elegido entre un  
10 extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus* y un extracto de *Cedrelopsis grevei*.
3.            Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** el extracto de *Rhodiola rosea* es un extracto obtenido de las raíces de la planta.
- 15 4.            Uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** el extracto de raíces de *Rhodiola rosea* es un extracto hidroglicólico.
5.            Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** el extracto de *Thermus thermophilus* es un extracto de bacterias *Thermus thermophilus* obtenido por biotecnología.  
20
6.            Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** el extracto de *Cedrelopsis grevei* es un extracto obtenido de la corteza del árbol.
7.            Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** el extracto de corteza de *Cedrelopsis grevei* es un extracto hidroglicólico o hidroglicerinado.  
25
8.            Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la composición contiene:
- 30 - del orden del 0,01 % al 10 % en peso, y preferentemente del 0,01 % al 5 % en peso de extracto de *Rhodiola rosea* y/o  
- del orden del 0,01 % al 10 % en peso, preferentemente del 0,01 % al 5 % en peso de extracto de *Thermus thermophilus* y/o  
- del orden del 0,01 % al 10 % en peso, preferentemente del 0,01 % al 5 % en peso de extracto de *Cedrelopsis grevei*.  
35
9.            Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para luchar contra los efectos de las ondas de frecuencia 900 MHz.
- 40 10.           Procedimiento de tratamiento cosmético para luchar contra los efectos en la piel de las ondas electromagnéticas generadas por los teléfonos móviles, que comprende la aplicación, en la piel o las faneras, de una composición cosmética que comprende al menos un activador de la diferenciación epidérmica, siendo dicho activador un extracto de origen vegetal o marino elegido entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus*, un extracto de *Cedrelopsis grevei*, un extracto de *Salicornia herbacea*, un extracto peptídico de avellana o butirato de caprililo.  
45
11.           Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** dicho activador es elegido entre un extracto de *Rhodiola rosea*, un extracto de *Thermus thermophilus* y un extracto de *Cedrelopsis grevei*.

Figura 1:

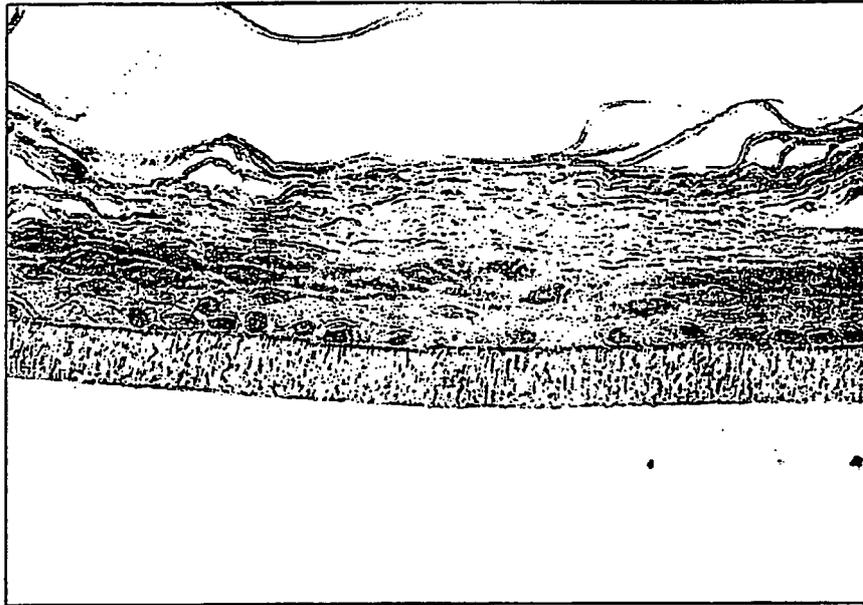


Figura 2:



Figura 3:

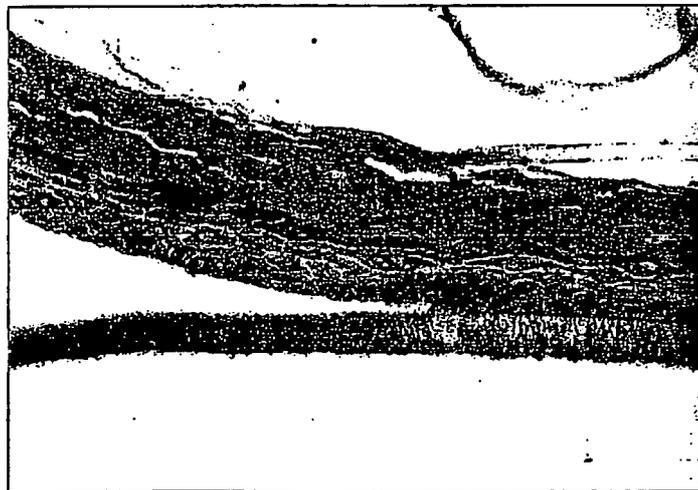


Figura 4:

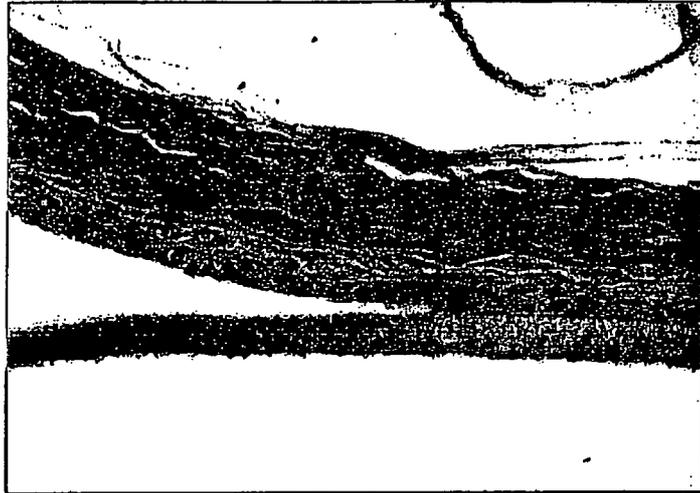


Figura 5:

