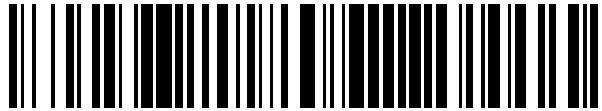


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 877**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 36/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/37</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/97</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2008 PCT/EP2008/002689**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2008 WO08125237**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 08735021 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2150262**

54 Título: **Uso de extracto de Vernonia appendiculata para la mejora del estado de la piel**

30 Prioridad:

**17.04.2007 EP 07290472**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.03.2017**

73 Titular/es:

**BAYER CONSUMER CARE AG (100.0%)  
PETER MERIAN-STRASSE 84  
4052 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**SEGOND, CAROLINE;  
LOISEAU, ALAIN;  
PETIT, VIRGINIE y  
THERON, ERIC**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 603 877 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 extracto de *Vernonia appendiculata* para la mejora del estado de la piel

La presente invención se refiere a un extracto foliar de *Vernonia appendiculata*, a su uso cosmético y a la composición dermatológica o cosmética relacionada.

5 Adicionalmente, se describe en el presente documento el uso de tal extracto de esta planta de *Vernonia* de Madagascar en productos cosméticos, productos farmacéuticos y suplementos alimentarios para mejorar el estado de la piel, más específicamente fortaleciendo la unión dérmica-epidérmica y/o activando la síntesis fibroblástica de la dermis y los compuestos de la matriz extracelular.

10 Las Vernoniáceas pertenecen a la familia de las Asteráceas (o Compuestas) que es la familia más importante de las angiospermas ya que contiene 1600 géneros y 22800 especies. El género *Vernonia*, dedicado a W. Vernon, contiene 500 a 1000 especies ampliamente extendidas en América, África y Asia Sudoriental.

15 La *Vernonia appendiculata* puede recogerse en Madagascar, donde se llama Ambiaty. Esta planta es un arbusto que alcanza hasta 4 metros de altura y es verde la mayor parte del año pero puede volverse plumosa durante la estación seca. Las hojas son alternas con venas pinnadas y se agrupan en el extremo de la rama: el limbo es dentado, piloso y verde en la parte superior y blanco en la parte inferior. La floración da flores violetas o blancas abundantes y es en septiembre y octubre. Los frutos son aquenios con doble vilano. En Madagascar, esta planta puede encontrarse en áreas secas y soleadas, a lo largo de los ríos y alrededor de los pueblos de la región de las Mesetas Altas (800-1500 m de altura, clima tropical). La ambiaty se usa tradicionalmente por ejemplo para curar heridas, antipirético (malaria), dolor de estómago, y las hojas nuevas pueden cocinarse también como comida.

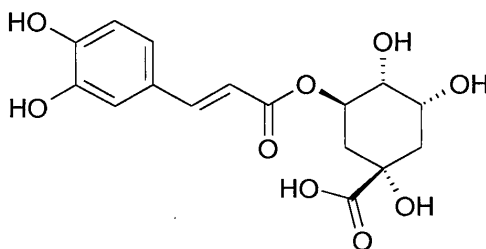
20 Las especies de *Vernonia* también se usan para la obesidad y la pérdida de peso (documento WO 01/15716) y se reivindica un péptido natriurético de *Vernonia cinerea* teniendo una propiedad adelgazante (documento WO 01/54659). La *Vernonia cinerea* se usa por su propiedad antioxidante debida a sus actividades de tipo superóxido dismutasa y de aceptor de radicales libres (documento EP 1 352 640). Las composiciones descritas en el documento EP 1 352 640 pueden mantener la tensión y la elasticidad de la piel. La *Vernonia anthelmintica* se reivindica en uso oral para el tratamiento del vitíligo con la activación de la tirosinasa y la aceleración de la síntesis de melanina (documentos CN1089861, CN1141183). El documento EP 1 854 452 describe extractos de *Vernonia sublutea* para uso antiinflamatorio en el campo dérmico y cosmético. Este extracto se obtiene por extracción con heptano, etanol y agua, seguido de liofilización. El documento WO 2007/113851 describe composiciones que contienen principios activos de especies de *Vernonia* para tratar trastornos del cabello. El documento WO 01/15716 describe una mezcla de extractos de plantas que comprenden *Vernonia*, *Cissus* y *Brillantasia* para controlar la ganancia de peso y la obesidad.

De acuerdo con "Plantes utiles des hautes terres de Madagascar" (Jean-Marie Samyn, 1999), la pulpa de la planta *Vernonia appiculata* puede usarse para la curación de heridas. Se sabe que las hojas de la misma planta tienen un efecto antifebril y muchas veces se usan en los alimentos.

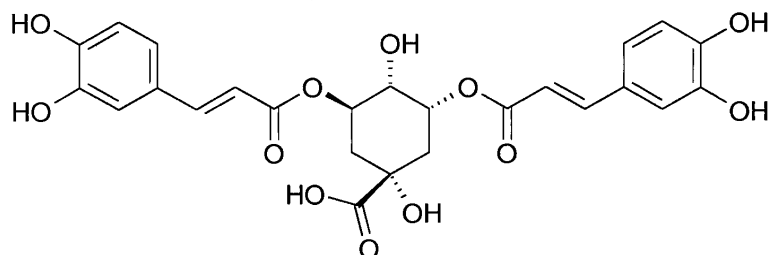
35 En "wound healing activity and systemic effects of Vernonia scorpioides extract in guinea pig" (Leite y col., Filoterapia 73 (2002), 496-500) se extraen hojas frescas de *Vernonia scorpioides* con etanol. Este extracto se usa para el tratamiento de úlceras de piel crónicas. Un extracto acuoso de la misma planta puede ser usable para tratar afecciones dérmicas, como alergias, parásitos de la piel, irritaciones, lesiones dérmicas o picor.

40 "Evaluation of wound-healing potency of Vernonia arborea Hk." (Manjunatha y col., Indian J. Pharmacol., 2005, Vol. 37, artículo 4, 223-226) menciona extractos de las hojas de *Vernonia arborea* obtenidos a través de la extracción con metanol o bien con agua. Para ambos extractos, se describe una promoción de curación de heridas.

El ácido clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico) y el ácido isoclorogénico (ácido 3,5-dicafeoilquínico) son compuestos dihidroxicinámicos que son compuestos fenólicos.



Ácido clorogénico:



Ácido isoclorogénico:

La presente invención se refiere a un extracto foliar de *Vernonia appendiculata* obtenible por las siguientes etapas:

- 5 a) extraer las hojas con un disolvente polar, en el que el disolvente polar es una mezcla de agua y alcohol,  
 b) mezclar y extraer la solución obtenida con un disolvente no polar, y  
 c) separar las fases para retener la fase acuosa,
- o
- 10 a) extraer las hojas con un disolvente no polar,  
 b) mezclar y extraer la solución obtenida con un disolvente polar, en el que el disolvente polar es una mezcla de alcohol y agua, y  
 c) separar las fases para retener la fase acuosa,

en el que el extracto seco contiene ácidos clorogénicos y/o isoclorogénicos en una cantidad total de más del 5 % en peso del extracto total.

- 15 La unión dérmica-epidérmica (UDJ) consiste en dos capas (*lamina lucida* y *densa*) y conexiones múltiples: esta organización original da lugar a las funciones típicas de la UDJ. La UDJ es un primer soporte para la epidermis: los queratinocitos basales se unen a la *Lamina lucida* (parte superior de la UDJ) gracias a sus hemidesmosomas y la proteína Citoqueratina 14 anclando el citoesqueleto de actina de los queratinocitos en la capa de la *Lamina lucida*.  
 La UDJ también estructura la piel ya que el alto contenido de Colágeno IV de la *Lamina densa* participa en la  
 20 resistencia mecánica con el típico patrón de surcos en red aumentando la superficie de intercambio entre la epidermis y la dermis.  
 La UDJ participa en la comunicación de la piel, por ejemplo con el suministro de soluto y la filtración en la *Lamina reticularia* (que también se llama dermis reticular y de hecho es la parte superior de la dermis papilar y se caracteriza por contenidos altos de células y vasos). La UDJ es esencial para la cohesión entre la epidermis y la dermis,  
 25 notablemente con la glucoproteína Laminina V (filamento de cohesión distribuido a través de toda la *L. lucida* y la *L. densa*).

- Los extractos de la presente invención pueden usarse para la mejora del estado de la piel por ejemplo fortaleciendo la unión dérmica-epidérmica y/o activando síntesis fibroblástica de la dermis y de compuestos de la matriz extracelular. Eso se puede lograr por ejemplo mediante activación de la síntesis de laminina V, activación de síntesis del colágeno IV, activación de síntesis de citoqueratina 14 o activación de síntesis de glucosaminoglucanos. Por lo tanto compuestos, mezclas y extractos de la presente invención pueden usarse también para antienvjecimiento de la piel, densificación y afirmación de la piel, resplandor de la piel, mejora de la cohesión de la unión dérmica-epidérmica, mejora de la estructuración de la piel, una interfaz funcional conservada entre epidermis y dermis (comunicación, nutrición...), la circulación de los elementos vitales, el contenido en humedad de la piel, la movilidad de los fibroblastos y/o la distribución de las fibras en la red de la dermis.

Además los extractos de la presente invención pueden usarse para tratar EBDR (epidermólisis bullosa distrófica recesiva), dermatosis bullosa sub-epidérmica, penfigoides (bullosa, etc.), lupus eritematoso así como para curación de heridas, renovación de ECM, tratamiento de fibrolisis y tratamiento de reticulación fibrosa (glicación, etc.).

El uso de extracto de *Vernonia* es un procedimiento apropiado y seguro para el tratamiento de la piel.

- 40 Los extractos de *Vernonia* de acuerdo con la invención son extractos de la planta *Vernonia appendiculata*.

Otras plantas conocidas de la familia de *Vernonia* de Madagascar incluyen *Vernonia chapelierii*, *Vernonia diversifolia*, *Vernonia sublutea*, *Vernonia trinervis*, *Vernonia trichoderma*, *Vernonia pectoralis*, *Vernonia moquinoides* y *Vernonia eryophylla*.

Las hojas de *Vernonia appendiculata* se extraen de acuerdo con la presente invención.

La extracción se lleva a cabo de acuerdo con la reivindicación 1. La extracción se lleva a cabo con un disolvente polar aplicable para extracción. De acuerdo con la primera alternativa de la reivindicación 1, las hojas se extraen primero con un disolvente polar opcionalmente en varias veces. La solución obtenida se mezcla y se extrae después con un disolvente no polar por ejemplo heptano para retirar las ceras, los aceites esenciales, los pigmentos y la mayoría de las moléculas no polares. Después de separación de fases, se añade la glicerina a la solución acuosa con el fin de ajustar el contenido de extracto vegetal a un mínimo del 10 % en peso del extracto seco en una mezcla de glicerina-agua 1:1.

Un extracto de acuerdo con la invención es normalmente un extracto en solución. No obstante el extracto puede usarse también como un extracto secado (por ejemplo después de secar por congelación) o puede usarse adicionalmente en el proceso de encapsulación. El disolvente polar usado para la extracción es preferentemente alcohol o una mezcla de agua y alcohol en la que el alcohol es preferentemente etanol. La relación del volumen entre agua y alcohol puede ser de 50:50 a 90:10, preferentemente 70:30.

El extracto vegetal seco puede contener ácidos clorogénico y/o isoclorogénico en una cantidad total de más del 5 % en peso del extracto total, o una solución del mismo. Más preferentemente el extracto vegetal es un extracto de *Vernonia appendiculata*.

Los extractos de la presente invención pueden administrarse en cualquier forma mediante cualquier vía eficaz, que incluye, por ejemplo, oral, parenteral, enteral, intravenosa, intraperitoneal, tópica, transdérmica (por ejemplo, usando cualquier parche convencional), oftálmica, nasalmente, local, no oral, tal como por aerosol, inhalación, subcutánea, intramuscular, bucal, sublingual, rectal, vaginal, intra-arterial e intratecal, etc. Esto puede administrarse solo, o en combinación con cualquier ingrediente o ingredientes, activos o inactivos. Se da preferencia a una administración tópica.

Los extractos de la presente invención pueden convertirse de una manera conocida en las formulaciones usuales tales como composiciones cosméticas o farmacéuticas o composiciones usadas como suplemento alimentario. Éstas pueden ser formulaciones líquidas o sólidas por ejemplo sin limitación comprimidos normales y con recubrimiento entérico, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, solución, suspensiones, supositorios, jarabes, aerosoles sólidos y líquidos, emulsiones, pastas, cremas, pomadas, leches, geles, ungüentos, sueros, espumas, champús, barras o lociones.

Se da preferencia a una composición cosmética en una forma de solución acuosa, una crema blanca o coloreada, pomada, leche, gel, ungüento, suero, espuma, champú, barra, crema, pasta, o loción.

Se da preferencia a una composición que comprende el extracto secado de la presente invención en una cantidad del 0,01 % al 5 %, preferentemente del 0,1 al 1 % en peso de la composición total.

Se da preferencia también a una composición que contiene una solución, preferentemente una solución basada en agua, del extracto de acuerdo con la presente invención en una cantidad del 0,1 % al 10 %, preferentemente del 1 % al 5 % en peso de la composición total.

La composición de acuerdo con la invención se administra una o más, preferentemente hasta tres, más preferentemente hasta dos veces al día. Se da preferencia a una administración tópica.

No obstante, puede ser ventajoso en algunos casos desviarse de las cantidades especificadas, dependiendo del peso corporal, el comportamiento individual hacia el ingrediente activo, el tipo de preparación y el tiempo o intervalo durante el que se lleva a cabo la administración. Por ejemplo, menos de las cantidades mínimas mencionadas puede ser suficientes en algunos casos, mientras que el límite superior especificado tiene que excederse en otros casos. En el caso de administración de cantidades relativamente grandes, puede ser aconsejable dividir estas en varias dosis individuales durante el día.

Los extractos de la presente invención también pueden combinarse con al menos una sustancia activa adicional o extracto vegetal adicional por ejemplo sustancias o extractos de plantas empleados usualmente para uso dermatológico o cosmético.

Las sustancias activas adicionales incluyen pero no se limitan a agentes desescamadores y/o humectantes, agentes de filtración o bloqueantes de ultravioleta, agentes despigmentantes o propigmentantes, agentes antiglicación, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas, epidérmicas, del cabello o de las uñas y/o evitan la degradación de las mismas, agentes que estimulan la diferenciación de queratinocitos, relajantes musculares, agentes antipolución y/o agentes antirradicales libres, agentes adelgazantes, agentes que actúan en la microcirculación, agentes que actúan en el metabolismo energético de las células, agentes tensores, agentes que evitan la pérdida o estimulan el crecimiento del cabello, agentes que evitan el cabello blanco o gris o una mezcla de los mismos. Preferentemente esa combinación está contenida en una composición dermatológica o cosmética por vía tópica.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: extracto de *Vernonia appendiculata*

5 Se extraen primero hojas secadas de *Vernonia appendiculata* con heptano antes de la percolación con etanol. La retirada de grasas se obtiene después gracias a una extracción líquido-líquido con heptano. Después de concentración en la fase acuosa, se añade glicerina ajustando la solución al 10 % en peso/volumen de extracto vegetal en una mezcla de agua-glicerina. El producto final es entonces una forma líquida.

La composición puede probarse mediante HPLC y una composición típica del extracto vegetal (secado) contiene más del 5 % de ácidos clorogénico e isoclorogénico en peso del extracto total.

### Ejemplo 2: crema anti edad

Nombre INCI	Cantidad
Estearato de glicerilo (y) estearato de PEG-100	2,00
Alcohol cetearílico (y) glucósido de cetearilo	3,00
Miristato de octildodecilo	4,00
Escualano vegetal	3,00
Éter de dicaprililo	3,00
Triglicéridos C8/C10	2,00
Ciclometicona	3,00
Fenoxietanol (y) metilparabeno (y) etilparabeno (y) propilparabeno (e) isobutilparabeno	0,80
Glicerina	1,50
Etoxidiglicol	0,75
Agua (y) glicerina (y) extracto de hoja de <i>Vernonia Appendiculata</i> (Extracto de <i>Vernonia</i> de acuerdo con el ejemplo 1)	1,00
Agua	C.s. 100 %

10

### Ejemplo 3: Evaluación *ex vivo* de activación de Glucosaminoglicanos, Citoqueratina 14 y Laminina V

15 Las biopsias de cirugía plástica abdominal se usan en este experimento *ex vivo*. Se cultivan en un medio de explantes de supervivencia específica: MEB (Medio de Explantes de BIO-EC). Se aplican 2 mg de una formulación que contiene el 7 % del extracto de acuerdo con el ejemplo 1 en las franjas de piel en los siguientes tiempos: día D0, D1, D2, D4, D6 y D8. Los resultados se comparan con las franjas de piel no tratadas.

Los estudios histológicos se llevan a cabo en D6 y D10. Para análisis morfológicos, los explantes se fijan después de la deshidratación y la impregnación de parafina, con solución de Bouin. Se cortan y tiñen después con tinción de tricoma de Masson. La tinción específica y el inmunomarcaje se llevan a cabo en tejidos de cortes de criostato congelados.

#### 20 a- Evaluación de Glucosaminoglucanos (GAG):

La inmunotinción específica de GAG se lleva a cabo mediante el procedimiento de tinción de Mowry (tinción de azul de Alcian) y permite visualizar los de GAG presentes en la dermis papilar y a lo largo de la unión dérmica-epidérmica (UDE) debida a la tinción rosa-violeta.

25 Observaciones de los GAG en D6: Para todas las biopsias, no hay activación de los GAG ácidos presentes en la dermis papilar. En lo referente a las bandas de piel no tratadas, los GAG neutros están presentes a lo largo de la UDE con tinción moderada en una banda irregular y fina. Para los explantes tratados con extracto de *Vernonia appendiculata*, los GAG neutros están claramente marcados a lo largo de la UDE y forman una banda regular y fina (Figura 1).

30 El marcado amplificado indica que el tratamiento con extracto de *Vernonia appendiculata* aumenta el contenido de GAG en la dermis.

#### b-Evaluación de Citoqueratina 14:

35 El inmunomarcaje específico de citoqueratina 14 se lleva a cabo gracias a anticuerpos monoclonales anti-queratina 14 (Progen referencia RCK107) y se revela mediante FITC. Los núcleos celulares se tiñen después con yoduro de propidio. La queratina 14 puede observarse después en el área de unión dérmica-epidérmica debido al marcaje fluorescente.

Observaciones de la Citoqueratina 14 en D10:

5 En lo referente a las tiras de piel no tratadas, el marcaje es claro y más y menos regular en la capa de los queratinocitos basales. Es suave en la segunda capa de células. Para los explantes tratados con extracto de *Vernonia appendiculata*, el marcaje es muy claro y regular sobre la capa de queratinocitos basal y moderado en la segunda capa de células (Figura 2).

El tratamiento con extracto de *Vernonia appendiculata* ayuda a regular al alza la liberación de citoqueratina 14 en la epidermis.

*c- Evaluación de Laminina V:*

10 El inmunomarcaje específico de la Laminina V se lleva a cabo gracias a anticuerpos monoclonales antilaminina V (memoria descriptiva de ref. 13587 de Santa Cruz) y se reveló mediante FITC. Los núcleos celulares se tiñen después con yoduro de propidio. La laminina V se puede observar después en el área de unión dérmica-epidérmica debido al marcaje fluorescente.

Observaciones de la síntesis de la Laminina V:

15 Mientras que el marcado es bastante claro y más y menos regular en la membrana de las células para las biopsias no tratadas, es muy claro y muy regular después de tratamiento con extracto de *Vernonia appendiculata* (Fig.3). El tratamiento con extracto de *Vernonia appendiculata* ayuda regulando positivamente el contenido en Laminina V.

#### **Ejemplo 4: Evaluación *Ex vivo* de activación de Colágeno IV**

Las biopsias de cirugía plástica abdominal se usan en este experimento *ex vivo*. Se cultivan en un medio de explantes de supervivencia específica: MEB (Medio de Explantes de BIO-EC).

20 Se aplican 2 mg de una formulación que contiene un 1 % del extracto de acuerdo con el ejemplo 1 en los discos de piel en los siguientes tiempos: día D0, D1, D2, D4, D6 y D8. Los resultados se comparan con una formulación control (excipiente sin compuestos activos) y con una formulación de referencia (formulación comercial que contiene retinol).

Los estudios histológicos se llevan a cabo en D6 y D10.

25 Para análisis morfológicos, los explantes se fijan después de la deshidratación y la impregnación de parafina, con solución de Bouin. Se cortan y tiñen después mediante tricoma de Masson.

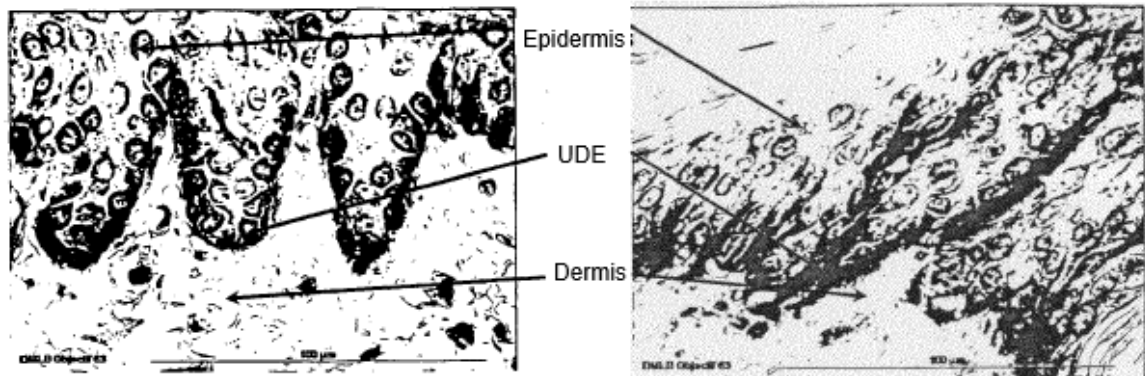
El inmunomarcaje específico de colágeno IV se lleva a cabo en tejidos de corte de criostato congelado gracias a anticuerpos monoclonales anti-colágeno IV (SBA) y se revela mediante FITC. Los núcleos celulares se tiñen después con yoduro de propidio. El colágeno IV se puede observar después en el área de unión dérmica-epidérmica y en la dermis papilar superior debido al marcado fluorescente.

30 *Evaluación con Colágeno IV mediante análisis de imagen*

35 El análisis de imagen se lleva a cabo después de digitalización de imagen y evalúa la superficie ocupada por la tinción. El porcentaje de la superficie ocupada por colágeno IV es mayor para las biopsias tratadas con extracto de *Vernonia appendiculata* que para la piel escindida no tratada o aquella tratada con el excipiente: +23,4 % frente al excipiente, +24,8 % frente a la no tratada. Estos valores son comparables a los resultados obtenidos con una formulación de retinol.

**REIVINDICACIONES**

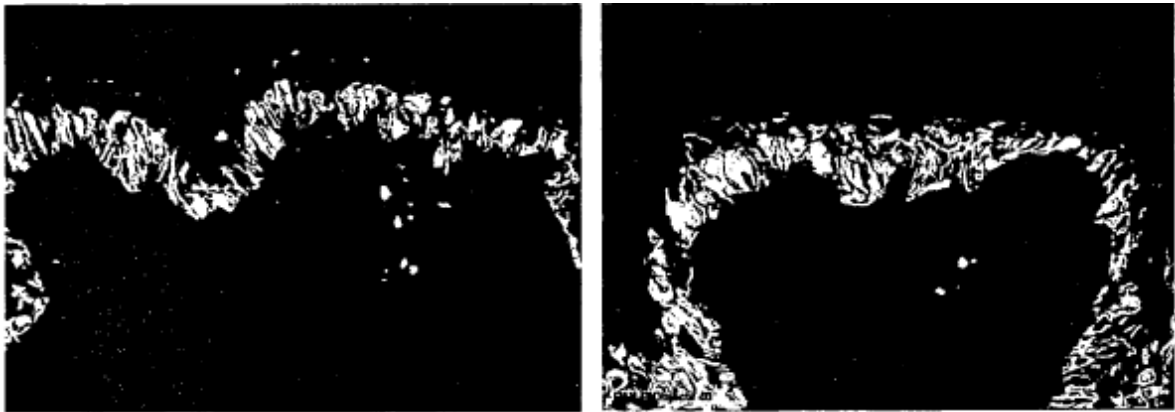
1. Un extracto foliar de *Vernonia appendiculata* obtenible por las siguientes etapas:
- 5 a) extraer las hojas con un disolvente polar, en el que el disolvente polar es una mezcla de agua y alcohol,  
b) mezclar y extraer la solución obtenida con un disolvente no polar, y  
c) separar las fases para retener la fase acuosa,
- o
- 10 a) extraer las hojas con un disolvente no polar,  
b) mezclar y extraer la solución obtenida con un disolvente polar, en el que el disolvente polar es una mezcla de alcohol y agua, y  
c) separar las fases para retener la fase acuosa,
- en el que el extracto seco contiene ácidos clorogénicos y/o isoclorogénicos en una cantidad total de más del 5 % en peso del extracto total.
2. El extracto foliar de la reivindicación 1, en el que la preparación comprende además la etapa
- 15 d) añadir glicerina a la solución acuosa.
3. El extracto foliar de la reivindicación 1 o 2, en el que el disolvente no polar es heptano.
4. Uso cosmético del extracto foliar de *Vernonia appendiculata* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para mejorar el estado de la piel teniendo un efecto antienvjecimiento de la piel, densificando y afirmando la piel y/o fortaleciendo la unión dérmica-epidérmica.
- 20 5. Uso cosmético de la reivindicación 4 para mejorar el estado de la piel mediante regulación positiva del contenido de laminina V, activación de la síntesis de colágeno IV, regulación positiva de la citoqueratina 14 en la epidermis, aumento de la síntesis de glucosaminoglucanos en la dermis y/o reducción/limitación de la glicación de la dermis.
6. Uso cosmético de la reivindicación 4 para la mejora del resplandor de la piel, la mejora de la cohesión de la unión dérmica-epidermis, la mejora de la estructuración de la piel, una interfaz funcional conservada entre la epidermis y la dermis, la circulación de los elementos vitales y/o el contenido en humedad de la piel.
- 25 7. Una composición dermatológica o cosmética que contiene el extracto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que la composición contiene una solución del extracto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una cantidad del 0,1 % al 10 % en peso de la composición total.



Biopsias sin tratar

Biopsias tratadas con  
extracto de *Vernonia appendiculata*

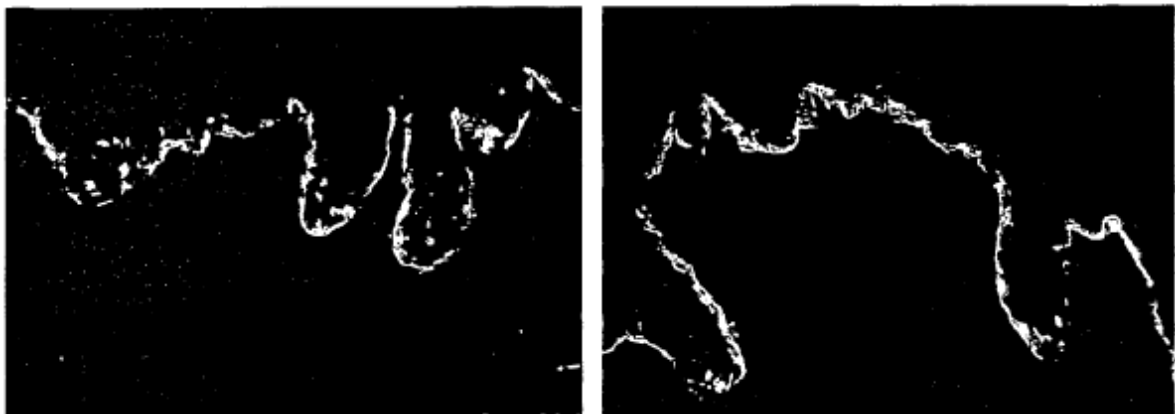
Fig. 1: Estudio *ex vivo*, tinción de GAG en D6



Biopsias sin tratar

Biopsias tratadas con  
extracto de *Vernonia appendiculata*

Fig. 2: Estudio *ex vivo*, inmunomarcaje de Citoqueratina 14 en D10



Biopsias sin tratar

Biopsias tratadas con  
extracto de *Vernonia appendiculata*

Fig. 3: Estudio *ex vivo*, inmunomarcaje de Laminina V en D10