

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 714**

51 Int. Cl.:

A61Q 17/00 (2006.01)

A61K 36/899 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

A61P 17/16 (2006.01)

A61K 8/9794 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2017 PCT/EP2017/065062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017 WO17220563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2017 E 17730814 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3471835**

54 Título: **Uso de extractos de Deschampsia Antarctica para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales**

30 Prioridad:

20.06.2016 EP 16382285

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

21.12.2020

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL FARMACEUTICA CANTABRIA, S.A.
(100.0%)
Ctra Cazoña-Adarzo s/n
39011 Santander (Cantabria), ES**

72 Inventor/es:

**MATJI TUDURI, JOSÉ ANTONIO;
BRIEVA DELGADO, AURORA;
DOMÍNGUEZ VALDÉS-HEVIA, MARTA;
GUERRERO GÓMEZ-PAMO, ANTONIO;
RAMÍREZ DIÉGUEZ, ALAIN;
BERETTI, COSTANZO;
GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, SALVADOR y
PIVEL RANIERI, JUAN PABLO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 799 714 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 extractos de *Deschampsia Antarctica* para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los cosméticos o la dermatología. Más particularmente, la invención se refiere al uso, o bien terapéutico o bien cosmético, de extractos de *Deschampsia antarctica* (EDA) para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales y para prevenir y/o mejorar trastornos relacionados.

10

Antecedentes

La contaminación del aire constituye una preocupación creciente en todo el mundo. El aumento de los niveles de contaminación del aire a lo largo de los años, especialmente en las zonas urbanas, tiene efectos importantes sobre la piel. También se sabe que los desequilibrios climáticos tienen un efecto negativo sobre la piel.

15

La piel está compuesta por tres capas superpuestas que son, desde la superficie hacia zonas más profundas del cuerpo, epidermis, dermis e hipodermis.

20

La epidermis es un epitelio, que puede dividirse convencionalmente, según criterios morfológicos e histológicos, en cuatro capas, desde la más profunda a la más exterior: la lámina basal y la capa espinosa (que forman la epidermis profunda), y la capa granular (epidermis superficial) y la capa córnea (o estrato córneo). La epidermis está en contacto con el entorno externo.

25

La piel, y principalmente la capa superior de la epidermis, constituye una barrera contra ataques externos, en particular ataques químicos, mecánicos o infecciosos y, por tanto, se producen en ella varias reacciones de defensa contra factores ambientales (clima, rayos ultravioleta, contaminantes, y similares) y/o xenobióticos, tales como, por ejemplo, microorganismos. Esta propiedad, denominada función de barrera, la proporciona principalmente la capa más superficial de la epidermis, concretamente el estrato córneo (también conocido como capa córnea).

30

Por tanto, puede producirse un cambio perjudicial en la barrera cutánea en presencia de ataques externos, tales como agentes irritantes (detergentes, ácidos, bases, agentes oxidantes, agentes reductores, disolventes concentrados, humo o gases tóxicos), tensiones mecánicas (frotamiento, impactos, abrasión, desgarro de la superficie, emisión de polvo u otras partículas, afeitado o depilación), desequilibrios climáticos (frío, calor, viento, sequedad, radiación) o agentes xenobióticos (microorganismos indeseables, alérgenos), o de ataques internos, tales como tensión psicológica. Por ejemplo, se ha descrito el impacto de la contaminación urbana sobre la función de la barrera cutánea (Pan TL, Wang PW, Aljuffali IA, Huang CT, Lee CW, Fang JY. The impact of urban particulate pollution on skin barrier function and the subsequent drug absorption. J Dermatol Sci. Abril de 2015; 78(1):51-60) o, en general, sobre la salud de la piel (Mancebo SE, Wang SQ. Recognizing the impact of ambient air pollution on skin health. J Eur Acad Dermatol Venereol. Diciembre de 2015; 29(12):2326-32). En el caso particular de la dermatitis atópica (DA), Ahn revisó cómo una variedad de contaminantes del aire, tales como el humo de tabaco ambiental, materia particulada, etc., actúan como factores de riesgo para el desarrollo o agravamiento de la DA debido a su capacidad para inducir estrés oxidativo en la piel, lo que conduce a desregulación inmunitaria o disfunción de la barrera cutánea (Ahn K. The role of air pollutants in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. Noviembre de 2014; 134(5):993-9; discusión 1000).

35

40

45

Este cambio perjudicial en la barrera cutánea puede reflejarse en particular por incomodidad cutánea, fenómenos sensoriales y en particular fenómenos desagradables, o también sequedad cutánea, que puede medirse en particular por la pérdida de agua imperceptible. Una persona puede experimentar entonces una sensación de incomodidad cutánea con, por ejemplo, algunos de los síntomas siguientes: escozor, rigidez, una sensación de tirantez, inflamación y/o picor. Estas sensaciones de incomodidad cutánea son más frecuentes en las zonas más expuestas del cuerpo, concretamente las manos, los pies, la cara y el cuero cabelludo.

50

Una de las funciones del estrato córneo es captar y retener el agua contenida en la epidermis, y cualquier afectación de su estructura y/o su función puede dar como resultado cambios en la hidratación de la piel, lo que conduce a un aumento en la pérdida de agua transepidérmica. Una piel seca en exceso puede conducir a su vez a una afectación de la función de la barrera cutánea y a la activación de trastornos de la barrera cutánea tales como dermatitis atópica, dando como resultado un círculo vicioso de calidad de barrera reducida y daño aumentado a partir del estrés ambiental.

55

Aunque se sabe que las deficiencias de la barrera cutánea son condiciones complejas en las que pueden estar implicadas diferentes causas, los agentes hidratantes o emolientes se encuentran entre los tratamientos más comunes, puesto que pueden alterar en cierto modo el ciclo de piel seca y mantener la suavidad de la piel.

60

Sin embargo, el mercado cosmético y farmacéutico está demandando todavía nuevas soluciones para potenciar la función de la barrera cutánea y para ayudar a proteger contra las agresiones ambientales y la sequedad.

65

5 *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) es la única gramínea nativa encontrada en la Antártida. Principalmente, se ubica en la Península Antártica y sus islas. Esta planta sobrevive en un clima muy riguroso, por tanto ha atraído a científicos para investigar los genes de tolerancia a la congelación de esta planta. Además, *Deschampsia antarctica* tiene la capacidad especial de no presentar fotoinhibición en circunstancias de sobreexposición a la luz del sol, debido a la protección de sus sistemas enzimáticos, ejercida por diversos agentes (tales como antioxidantes, reguladores del "replegamiento", deshidrinas, etc.) (Pérez-Torres E, García A, Dinamarca J, Alberdi M, Gutiérrez A, Gidekel M, Ivanov AG, Hüner NPA, Corcuera LJ, Bravo L. The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of *Deschampsia antarctica*. *Funct Plant Biol* 2004, 31: 731-741).

10 El documento WO2009064480A1 da a conocer la actividad antineoplásica de los extractos de *Deschampsia antarctica* (EDA), que pueden formularse en composiciones de comprimidos y gránulos para tratar pacientes con cáncer.

15 El documento WO2010086464A1 informa del uso de EDA como nuevo agente para la fotoprotección de la piel contra radicación UVA y UVB. El documento WO2011009977A2 propone su uso para la prevención de lesiones cutáneas, particularmente cáncer de piel distinto de melanoma, producido por exposición a radiación ultravioleta. Más recientemente, el documento WO2013084193A2 se refiere a los efectos terapéuticos del extracto en la prevención del fotoenvejecimiento y el cáncer inducidos por radiación ultravioleta.

20 Se ha postulado en los documentos anteriores del estado de la técnica que los efectos beneficiosos para la piel atribuidos al EDA se deben principalmente a su actividad antioxidante, antiinflamatoria y fotoprotectora. Sin embargo, que los inventores sepan, ningún documento del estado de la técnica da a conocer la capacidad de EDA como agente protector de la piel contra agresiones ambientales no relacionadas con la radiación UV que pueden producir o agravar trastornos relacionados con una función de barrera afectada.

25 Existe la necesidad de nuevas soluciones para contrarrestar los daños a la piel producidos por agresiones ambientales así como para prevenir y/o mejorar los trastornos de la barrera cutánea relacionados.

30 El objeto de la presente invención es satisfacer estas necesidades.

Breve descripción de la invención

35 La presente invención resuelve las necesidades mencionadas anteriormente puesto que se refiere al nuevo uso de extractos de *Deschampsia antarctica* (EDA) para contrarrestar los daños a la barrera cutánea humana que pueden producirse debido al efecto de agresiones ambientales. En particular, los inventores de la presente invención han encontrado, entre otras cosas, que el EDA muestra un efecto protector prominente sobre células cutáneas humanas contra la sequedad cutánea, el estrés osmótico y térmico, y varios contaminantes comunes del aire.

40 En el contexto de esta invención, puede usarse EDA para su aplicación a piel sana sometida a o que puede someterse a la influencia de agresiones ambientales tales como desequilibrios climáticos o contaminantes y, por este motivo, susceptible de presentar incomodidad cutánea o sequedad cutánea. En otros casos específicos, puede aplicarse EDA a la piel cuando ya muestra signos clínicos de una deficiencia patológica en la barrera cutánea.

45 Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere al uso no terapéutico o cosmético de EDA para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a EDA para su uso en la mejora y/o la prevención de trastornos de la barrera cutánea humana y signos asociados.

50 Según otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de EDA para la preparación de una composición destinada a contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales y/o para prevenir y/o mejorar trastornos de la barrera cutánea y signos asociados.

55 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de EDA.

60 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la mejora y/o la prevención de trastornos de la barrera cutánea humana y signos asociados, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de EDA.

65 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición destinada a contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales y/o para su uso en el tratamiento y/o la mejora de trastornos de la barrera cutánea y signos asociados, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de EDA en un medio fisiológicamente aceptable.

Estos aspectos y descripciones concretas de los mismos también se definen adicionalmente en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

- 5 **La figura 1** muestra resultados obtenidos en el ejemplo 1 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la muerte celular en fibroblastos dérmicos producida por deshidratación.
- 10 **La figura 2** muestra resultados obtenidos en el ejemplo 1 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la muerte celular en fibroblastos dérmicos producida por choque hiperosmótico (sacarosa 0,3 M).
- La figura 3** muestra resultados obtenidos en el ejemplo 3 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la viabilidad celular de fibroblastos dérmicos que se exponen posteriormente a humo de tabaco.
- 15 **La figura 4** muestra una placa de 6 pocillos usada en el ejemplo 3 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la viabilidad celular de fibroblastos dérmicos que se exponen posteriormente a humo de tabaco.
- La figura 5** muestra resultados obtenidos en el ejemplo 3 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la morfología celular de fibroblastos dérmicos que se exponen posteriormente a humo de tabaco (A: células expuestas a humo de tabaco, B: células pretratadas con EDA y expuestas a humo de tabaco).
- 20 **La figura 6** muestra resultados obtenidos en el ejemplo 3 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la viabilidad celular de queratinocitos (línea celular HaCaT) que se exponen posteriormente a humo de tabaco.
- 25 **La figura 7** muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 4 con respecto al efecto de la exposición a Cd(II) sobre la muerte celular en fibroblastos dérmicos.
- La figura 8** muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 4 con respecto al efecto del pretratamiento con EDA sobre la muerte celular en fibroblastos dérmicos producida por exposición a Cd(III).
- 30 **La figura 9** muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 4 con respecto al efecto de la exposición a Cr(III) y Cr(VI) sobre la muerte celular en fibroblastos dérmicos.

Descripción detallada de la invención

- 35 La piel interacciona con el entorno y es la primera línea de defensa del entorno externo, a menudo hostil, y la barrera epidérmica semipermeable impide tanto el escape de la humedad como la entrada de sustancias infecciosas o tóxicas.
- Muchos individuos tienen una predisposición genética a presentar deficiencias en la barrera cutánea. Asimismo, factores externos tales como condiciones climáticas y exposición a la contaminación del aire pueden conducir a una función afectada de la barrera cutánea y por tanto producir o agravar trastornos de la barrera cutánea. De hecho, no se conoce exactamente la causa real de esos trastornos que están relacionados con daños en la barrera cutánea pero están producidos probablemente tanto por factores genéticos (que vienen de familia) como ambientales. En particular, las agresiones ambientales (contaminación, tabaquismo pasivo, etc.) pueden explicar el aumento significativo de casos de deficiencias de la barrera cutánea (piel seca, piel atópica, etc.) con respecto a los últimos años y que parece que es más probable que las personas que viven en ciudades desarrollen esta enfermedad.
- 40 Tanto los médicos como los consumidores están cada vez más preocupados por los efectos dañinos que pueden tener sobre la piel los desequilibrios climáticos (por ejemplo calor, frío, viento) y los contaminantes químicos del aire (por ejemplo humo, metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), compuestos orgánicos volátiles (COV), óxidos, materia particulada (MP) y ozono (O₃)) y, por tanto, son necesarias soluciones de protección cutánea eficaces para proteger la piel contra estos agentes agresores.
- 50 La afectación de la función de la barrera cutánea va acompañada a menudo por una integridad alterada del estrato córneo y un aumento consecuente en la pérdida de agua transepidérmica. Por tanto, la función de barrera afectada y la sequedad cutánea están íntimamente interrelacionadas.
- 55 Un trastorno de la barrera cutánea puede definirse en general como un estado en el que la piel, o más particularmente la epidermis y, especialmente la capa córnea, no muestran una función de barrera normal. Este deterioro de la piel puede ser simplemente una alteración estética minoritaria y/o una sensación de incomodidad cutánea o sequedad cutánea en una piel considerada como sana, pero también puede ser un estado patológico. Ejemplos específicos de trastornos de la barrera cutánea son piel seca, dermatitis atópica, dermatitis de contacto y similares.
- 60 La piel seca, también denominada xerosis, es una anomalía cutánea muy común. Una piel seca tiene un tacto rugoso, aparece cubierta con escamas y se manifiesta por sí misma esencialmente a través de una sensación de tirantez y/o tensión.
- 65

La piel seca va acompañada de hecho por un trastorno de descamación y presenta diversos estadios en función de la gravedad de esta descamación. Cuando la piel está ligeramente seca, estas escamas son abundantes pero escasamente visibles a simple vista, la eliminación se realiza corneocito por corneocito. Cuando este trastorno empeora, son cada vez más infrecuentes pero cada vez más visibles a simple vista, y los parches pueden comprender varios cientos de corneocitos, representando por tanto parches más o menos grandes, conocidos como escamas.

Una piel que padece sequedad cutánea generalmente presenta los siguientes signos, concretamente un tacto rugoso y escamoso, y también disminución de la flexibilidad y la elasticidad. También hay estudios que han demostrado una incidencia de la sequedad sobre el origen y la formación de arrugas y líneas finas y, de hecho, en términos visuales, una piel seca hace que dichas arrugas y líneas finas sean más evidentes.

Además, desde un punto de vista sensorial, la sequedad cutánea se caracteriza por una sensación de tirantez y/o picor. Por motivos obvios, estas manifestaciones no son sólo fuentes de incomodidad, o incluso de dolor, sino también de un aspecto antiestético.

El origen de esta sequedad puede ser de tipo constitucional o adquirido. En el caso de piel seca adquirida, la implicación de parámetros externos tales como exposición a agentes químicos, a condiciones climáticas rigurosas, a la luz del sol o también a determinados tratamientos terapéuticos (por ejemplo, retinoides) es un factor determinante. Bajo estas influencias externas, la epidermis puede entonces llegar a secarse de manera momentánea o local. Esto puede afectar a cualquier tipo de epidermis.

De hecho, se sabe que la piel tiene tendencia a secarse debido a factores ambientales, psicológicos y hormonales. En particular, la contaminación es una preocupación creciente en todo el mundo debido a la industrialización y a la liberación de una alta cantidad de compuestos químicos en el aire. Estos componentes tóxicos se adhieren a la superficie de la piel y alteran la integridad de la capa córnea. Esto conduce a muchos daños tales como la pérdida de hidratación. También se sabe que condiciones climáticas tales como el frío o el viento promueven la sequedad cutánea.

En vista de los factores ambientales peligrosos crecientes, es importante actualmente que la piel se hidrate bien y no sufra pérdida de agua que podría conducir a marchitamiento y sequedad de la piel. Por tanto, tratar y prevenir la sequedad cutánea se han vuelto esenciales, no sólo desde un punto de vista terapéutico, sino también desde un punto de vista estético.

La dermatitis atópica (DA), también denominada eccema atópico, es una enfermedad crónica de la piel en la que la piel se seca, se irrita fácilmente, está predispuesta a alérgenos, normalmente escamosa, a menudo engrosada, comúnmente roja, en ocasiones exudativa, frecuentemente infectada y sobre todo con picor. En países industrializados, las tasas de prevalencia en la infancia oscilan entre el 15 y el 30 por ciento y en adultos entre el 2 y el 10 por ciento de la población general. La atopia parece mostrar un fuerte componente hereditario, pero al igual que otros trastornos de la barrera cutánea, también se cree que las agresiones ambientales desempeñan un papel importante en el desarrollo de atopia.

Los inventores de la presente invención han encontrado que pueden usarse extractos de *Deschampsia antarctica* (EDA) de manera favorable para potenciar la función de la barrera cutánea humana y más particularmente, como agente protector de la piel contra agresiones ambientales no derivadas de radiación UV y sequedad cutánea.

Ventajosamente, el EDA proporciona protección hacia agresiones ambientales no asociadas con radiación UV, ya sea procedente del sol o de fuentes artificiales (incluyendo radiación UVA y UVB), que pueden afectar a la función de la barrera cutánea humana y pueden producir sequedad cutánea. Estos factores incluyen exposición a contaminación del aire, especialmente a contaminantes químicos del aire [por ejemplo humo (tal como humo de tabaco), metales pesados (tal como arsénico, cadmio, cromo), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), compuestos orgánicos volátiles (COV), óxidos, materia particulada (MP) y ozono (O₃)] y condiciones climáticas distintas de radiación UV tales como choques osmóticos, baja humedad del aire, estrés térmico ambiental, etc.

El EDA según esta invención puede extraerse de la planta obtenida de su entorno nativo o de plantas cultivadas en un entorno controlado. Principalmente, la planta crece de manera natural en el continente antártico, que es un territorio sometido a estrictas regulaciones para su protección, lo que hace imposible su explotación y, por tanto, la recolección allí de *Deschampsia antarctica* para fines comerciales. Por tanto, se hace necesario obtenerla mediante cultivo fuera de su hábitat natural.

Se conocen en el estado de la técnica diferentes métodos para obtener extractos de *Deschampsia antarctica*. Por ejemplo, el extracto de *Deschampsia antarctica* puede obtenerse mediante un procedimiento establecido previamente por los autores, que hace uso de un método acuoso. Esto evita el uso de disolventes orgánicos, que presentan problemas de contaminación y residuos que son difíciles de eliminar del extracto. Por tanto, según la realización preferida, el extracto es un extracto acuoso de *Deschampsia antarctica*. Por tanto, EDA representa la materia extraída de *Deschampsia antarctica*.

En una realización particular, las hojas verdes secas (HVS, por su acrónimo en español) obtenidas de la planta se introducen en un percolador en el que está circulando agua o un disolvente acuoso en condiciones controladas de temperatura y tiempo de extracción. Estos extractos, que son esencialmente acuosos, se estabilizan entonces y se secan a vacío. El polvo resultante se muele y se tamiza.

5

En una realización más particular, las HVS se introducen en un percolador en el que está circulando agua o un disolvente acuoso a una temperatura de aproximadamente 30 a 100°C, con una razón de disolvente/HVS de aproximadamente 11/1 a 60/1, durante un período de aproximadamente 2 a 7 h. El líquido se recoge y preferiblemente se filtra con un filtro de aproximadamente 10 a 0,45 μm , y entonces se concentra desde 0 hasta 6 veces. A continuación, el líquido resultante puede liofilizarse o secarse mediante la adición de excipientes tales como maltodextrina o almidón, y secarse a vacío (aproximadamente de 50 a 300 mbar) a una temperatura de aproximadamente 30 a 90°C. El polvo resultante se muele y se tamiza.

10

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado detallado a continuación.

15

Para el fin de la presente invención, se pretende que la expresión “cantidad eficaz” indique la cantidad mínima requerida para la observación del efecto esperado, es decir, un efecto cosmético o un efecto terapéutico, entendiéndose que las cantidades eficaces requeridas para obtener un efecto cosmético o un efecto terapéutico pueden ser, según sea apropiado, idénticas o diferentes.

20

El término “sujeto”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ser humano que esté padeciendo daño de la barrera cutánea o trastorno de la barrera cutánea. Por tanto, la piel que va a tratarse con EDA o una composición del mismo es una piel humana.

25

Para el fin de la invención, se pretende que el término “cosmético” indique un uso, composición o similar destinado principalmente a proporcionar un efecto estético y/o comodidad.

Para el fin de la invención, se pretende que el término “terapéutico” indique un uso, composición o similar destinado a proporcionar un efecto profiláctico o curativo con respecto a la piel y, en particular, a trastornos epidérmicos que se reconoce que reflejan un estado patológico.

30

Los usos, métodos y composiciones proporcionados por la presente invención pueden ser terapéuticos y/o cosméticos. Además, dependiendo del marco regulador, el EDA según la invención puede estar destinado a la preparación de una composición en la categoría de “productos cosmeceúticos”, es decir, una combinación de productos cosméticos y farmacéuticos, o más particularmente, un producto cosmético con al menos un principio biológicamente activo que se reconoce que tiene beneficios médicos o de tipo fármaco.

35

El EDA o una composición del mismo según la invención puede en general ser destinada para la mejora del estado general de la piel y/o el cuero cabelludo humanos y, en particular, para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales y para prevenir y/o mejorar trastornos de la barrera cutánea humana y signos asociados.

40

En una realización particular, el EDA o una composición del mismo está destinado a prevenir y/o reducir la incomodidad, los fenómenos desagradables o la sequedad cutánea de piel humana sometida a la influencia de agresiones ambientales no derivadas de radiación UV.

45

En otra realización particular, el EDA o una composición del mismo está destinado a prevenir y/o mejorar un trastorno de la barrera cutánea humana y signos asociados, seleccionándose el trastorno de la barrera cutánea de piel seca, dermatitis atópica, dermatitis de contacto y similares.

50

Se pretende que los signos asociados con los trastornos de la barrera cutánea humana se refieran no sólo a todas las modificaciones del aspecto exterior de la piel debido en particular a la acción de agresiones ambientales distintas de radiación UV y la deshidratación de la piel (en particular, epidermis), tal como el aspecto rugoso y escamoso, y la disminución de la flexibilidad, sino también a las sensaciones o incomodidad cutánea producidas, tales como picor y/o tirantez. De hecho, puede ocurrir que estas sensaciones las sienta un individuo sin que sea perceptible necesariamente ningún síntoma visual.

55

El EDA o una composición del mismo según la invención puede estar destinado en particular a prevenir y/o mejorar la sequedad cutánea y/o los trastornos cutáneos asociados con un estado de sequedad cutánea, particularmente sequedad de una epidermis, y más particularmente un defecto de hidratación del estrato córneo.

60

El EDA o una composición del mismo según la invención puede estar destinado en particular a mejorar la tonicidad y/o firmeza y/o elasticidad y/o suavidad de la piel.

El EDA o una composición del mismo según la invención puede estar destinado en particular a restablecer y/o potenciar el equilibrio osmótico en las células de la piel y/o el cuero cabelludo y/o a proteger las células de la piel y/o el cuero cabelludo de choques osmóticos.

5 El EDA o una composición del mismo según la invención puede estar destinado en particular a tratar pieles sensibles.

La composición de la invención puede aplicarse localmente a la cara, el cuello, el escote, las manos, los pies, el cuero cabelludo o cualquier otra zona topográfica. Por tanto, la presente invención proporciona ventajosamente la posibilidad de dirigirse siempre que sea necesario o deseable, a tratamientos “suaves” muy localizados y selectivos gracias al método de aplicación tópica.

Según la invención, “medio fisiológicamente aceptable” significa, sin limitación, una disolución acuosa o hidroalcohólica, una emulsión de agua en aceite, una emulsión de aceite en agua, una microemulsión, un gel acuoso, un gel anhidro, un suero o una dispersión de vesículas. “Fisiológicamente aceptable” significa que las composiciones o compuestos descritos son adecuadas para su uso en contacto con cuero cabelludo, pelo, vello y piel humanos, sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares, excesivas.

Las composiciones según la invención pueden estar en cualquier forma galénica tales como cremas, lociones, pomadas en crema o leche, geles, emulsiones, dispersiones, disoluciones, suspensiones, limpiadores, bases, preparaciones anhidras (barras, en particular bálsamo labial, aceites corporales y de baño), geles de ducha y baño, champús y lociones de tratamiento del cuero cabelludo, crema o loción para el cuidado de la piel o el cabello, lociones o cremas desmaquilladoras, lociones, leches o cremas de protección solar, lociones, cremas o leches de bronceado artificial, espumas, geles o lociones, maquillaje, “esencias” para la piel, sueros, materiales adhesivos o absorbentes, parches transdérmicos, o polvos, loción, leche o crema emoliente, aerosoles, aceites para el cuerpo y el baño, bases de tinte, pomada, emulsión, coloide, suspensión compacta o sólida, formulación que puede aplicarse con aerosol o brocha, polvo facial o corporal, *mousse*, acondicionadores de piel, hidratantes, aerosol para el cabello, jabones, exfoliantes corporales, astringentes, etc. Las composiciones según la invención incluyen cosméticos, productos para el cuidado personal, preparaciones cosmeceúticas y farmacéuticas (medicamentos). También puede considerarse una composición en forma de espuma o en forma de composiciones para aerosol que también incluye un agente propelente bajo presión.

Es posible integrar en la composición de la invención productos que ya se sabe que tienen una actividad que ayuda, que mejora o que restablece la función de barrera de la piel, y en particular, que potencia la hidratación cutánea. Por tanto, según una realización particular, la composición de la presente invención puede comprender además al menos un principio activo adicional seleccionado del grupo que consiste en agentes hidratantes, agentes humectantes, agentes oclusivos, agentes frente a la descamación, agentes que actúan sobre la función de la barrera cutánea, filtros UV, agentes que regulan la homeostasia celular, formadores de película, agentes que regulan la expresión de acuaporina, agentes antienvjecimiento, agentes antiarrugas, agentes antioxidantes, agentes antiinflamatorios, agentes despigmentantes o propigmentantes, agentes de autobronceado, agentes antiglicación, inhibidores de la NO-sintasa, agentes que estimulan la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o que previenen su degradación, agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos y/o queratinocitos o que estimulan la diferenciación de queratinocitos, agentes anticontaminación y/o antirradicales libres, agentes que actúan sobre la microcirculación, agentes antiestrías, agentes que actúan sobre el metabolismo energético de las células, agentes antiacné, y mezclas de los mismos.

Ejemplos no limitativos de estos agentes son: betaína, glicerol, Actimoist Bio 2™ (Active Organics), AquaCacteen™ (Mibelle AG Cosmetics), Aquaphyline™ (Silab), AquaregulK™ (Solabia), Carciline™ (Greentech), Codiavelane™ (Biotech Marine), Dermaflux™ (Arch Chemicals Inc.), HydraFlow™ (Sochibo), Hydromoiist L™ (Symrise), RenovHyal™ (Soliance), Seamoss™ (Biotech Marine), Essenskin™ (Sederma) y Moist 24™ (Sederma).

Los siguientes ejemplos demuestran cómo el pretratamiento con EDA protege de diferentes agresiones ambientales a los fibroblastos y queratinocitos (dos tipos de células esenciales para la creación y el mantenimiento de la función de la barrera (Varkey M, Ding J, Tredget EE. Superficial dermal fibroblasts enhance basement membrane and epidermal barrier formation in tissue-engineered skin: implications for treatment of skin basement membrane disorders. Tissue Eng Part A. Febrero de 2014; 20(3-4):540-52. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. Yonsei Medical Journal 2006. 47: 293 – 306). Estos ejemplos son meramente ilustrativos de determinadas realizaciones de la invención y no puede considerarse que la restrinjan en modo alguno.

Ejemplos

60 Ejemplo 1 - Efecto protector del pretratamiento con EDA contra la deshidratación y el choque hiperosmótico

El objeto de este experimento es evaluar el posible efecto protector del pretratamiento con extracto de *Deschampsia antarctica* en fibroblastos humanos contra la deshidratación que se produce debido o bien a la ausencia de humedad del aire o bien a choque hiperosmótico, midiendo variaciones en la supervivencia celular.

Materiales y métodos:

- Productos que van a someterse a prueba:

5 Extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA): En experimentos con fibroblastos, se usó EDA secado con maltodextrina, lote 160215. Se disolvió el producto en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a una concentración de 10 mg/ml (equivalente a 2,1 mg de EDA/ml), se agitó en un agitador magnético durante 30 minutos y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 μ m (Minisart, Sartorius).

- Medios de cultivo y reactivos:

10 Medio DMEM libre de rojo fenol (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Sigma). Medio DMEM (Sigma). Penicilina-estreptomicina (Sigma). Glutamina (Sigma). Suero bovino fetal (Sigma). Etilendiaminatetraacetato (EDTA) de tripsina 0,25% (Sigma). Solución salina tamponada con fosfato (PBS). Solución salina equilibrada de Hank (a continuación en el presente documento, medio de Hank) (Sigma). Sacarosa (Sigma). Glutaraldehído (Sigma). Cristal violeta (Sigma).
15 Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Sigma).

- Cultivo celular de fibroblastos:

20 Las células usadas fueron fibroblastos dérmicos humanos aislados de la zona exterior del colgajo retroauricular obtenido de diferentes donantes voluntarios sanos, y conservados en N₂ líquido. Los experimentos usaron células crecidas en frascos de cultivo que contenían DMEM complementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 μ g/ml, estreptomicina 50 U/ml, suero bovino fetal al 10%, en un horno Heraeus con una atmósfera de 7% de CO₂ y 93% de aire humidificado a 37°C, hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 90%, tras lo que se realizó un nuevo pase por medio de tripsinización. Para los experimentos, se usaron células entre los pases 9 y 11 que se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Nunc) a una densidad inicial de 10⁵ células/ml, respectivamente, y se dejaron crecer en un incubador hasta alcanzar la confluencia.

- Tratamiento con productos:

30 Pretratamiento con EDA: se añadieron 100 μ l por pocillo de la disolución de EDA preparada tal como se indicó anteriormente (o las disoluciones relevantes en DMEM completo) a la mitad de cada placa y se incubó la placa durante aproximadamente 24 horas en un incubador.

35 Deshidratación: Tras el pretratamiento, se lavaron las placas dos veces con medio de Hank y se retiró el medio o se añadieron 100 μ l por pocillo de disolución de DMEM libre de rojo fenol (controles) y se incubaron las placas sin humedad durante 90 minutos en un incubador a 37°C.

40 Choque hiperosmótico: Tras el pretratamiento, se lavaron las placas dos veces con medio de Hank y se añadieron 100 μ l por pocillo de disolución de sacarosa 0,3 M en DMEM (osmolaridad: 600 mosM) o 100 μ l por pocillo de disolución de DMEM libre de rojo fenol (controles. Osmolaridad: 300 mosM) y se incubaron durante 6 horas en un incubador a 37°C, 7% de CO₂, 93% de aire humidificado.

- Medición de la viabilidad celular:

45 Se lavaron las placas dos veces con medio de Hank. Se fijaron con 100 μ l de una disolución de glutaraldehído al 0,25% en medio de Hank durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron una vez con agua. Se tiñeron con una disolución de cristal violeta al 0,2% en una disolución de etanol al 2% durante 15 minutos a 37°C. Se lavó la placa con agua y se solubilizaron las células con 100 μ l de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. Se agitó la placa cuidadosamente en un agitador de placas y se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Fluostar Optima de BMG.

- Análisis estadístico:

55 Se realizó el análisis estadístico para cada experimento, considerando el valor de cada pocillo como un valor independiente, determinando la significación por medio de la prueba de la t de Student usando Excel o Graph Pad Prism.

Resultados:

- Efecto de pretratamiento con EDA sobre la muerte celular producida por deshidratación:

60 La siguiente tabla muestra el resultado de dos experimentos diferentes realizados con fibroblastos de diferentes donantes y la figura 1 muestra el promedio de supervivencia de ambos experimentos.

ES 2 799 714 T3

	n	\bar{x}	DE	CV	% de superv.	P
Células control no deshidratadas	59	0,363	0,021	5,7	100,0	
Células deshidratadas 90 min	59	0,296	0,014	4,8	81,6	2,4E-40 frente a células control no deshidratadas (CC)
Células deshidratadas pretratadas con EDA 0,21 mg/ml	30	0,301	0,028	9,4	82,9	0,4106 frente a células deshidratadas.
Células deshidratadas pretratadas con EDA 0,42 mg/ml	29	0,317	0,030	9,3	87,4	8,7E-04 frente a células deshidratadas.
Células deshidratadas pretratadas con EDA 1,05 mg/ml	30	0,341	0,019	5,6	94,0	4,3E-15 frente a células deshidratadas.
Células deshidratadas pretratadas con EDA 2,1 mg/ml	29	0,349	0,022	6,3	96,3	1,0E-14 frente a células deshidratadas.

	n	\bar{x}	DE	CV	% de superv.	P
Células no deshidratadas	54	0,37	0,02	6,3	100,0	
Células deshidratadas 90 min	59	0,28	0,02	5,8	77,0	5,7E-43 frente a células control (CC)
Células deshidratadas pretratadas con EDA 0,21 mg/ml	30	0,3	0,020	6,7	82,1	1,5E-05 frente a células deshidratadas
Células deshidratadas pretratadas con EDA 0,42 mg/ml	29	0,33	0,02	6,4	90,2	1,7E-19 frente a células deshidratadas
Células deshidratadas pretratadas con EDA 1,05 mg/ml	30	0,32	0,02	7,0	87,6	1,6E-14 frente a células deshidratadas
Células deshidratadas pretratadas con EDA 2,1 mg/ml	29	0,34	0,02	5,1	92,0	1,3E-24 frente a células deshidratadas

- 5 Tal como puede observarse, el pretratamiento con EDA tiene un efecto protector significativo contra la muerte celular inducida por deshidratación.
- Efecto de pretratamiento con EDA sobre la muerte celular producida por choque hiperosmótico:
- 10 La siguiente tabla muestra el resultado de dos experimentos diferentes realizados con fibroblastos de diferentes donantes y la figura 2 muestra el promedio de supervivencia de ambos experimentos.

	n	\bar{x}	DE	CV	% de superv.	P
Células control libres de sacarosa	59	0,482	0,042	8,7	100,0	
Células con sacarosa 0,3 M	59	0,334	0,020	6,0	69,4	2,5E-47 frente a células control libres de sacarosa (CC)
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 0,21	30	0,336	0,022	6,4	69,7	0,740 frente a células con sacarosa
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 0,42	29	0,380	0,024	6,3	78,9	6,0E-15 frente a células con sacarosa
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 1,05	30	0,375	0,017	4,4	77,8	3,1E-15 frente a células con sacarosa
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 2,1	29	0,384	0,023	6,0	79,7	8,6E-17 frente a células con sacarosa

	n	\bar{x}	DE	CV	% de superv.	P
Células libres de sacarosa	59	0,657	0,032	4,9	100,0	
Células con sacarosa 0,3 M	59	0,463	0,040	8,6	70,5	7E-55 frente a células control libres de sacarosa (CC)
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 0,21	30	0,440	0,039	8,8	67,0	0,011 frente a células con sacarosa
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 0,42	29	0,474	0,044	9,3	72,3	0,216 frente a células con sacarosa
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 1,05	30	0,488	0,035	7,1	74,3	0,004 frente a células con sacarosa
Células con sacarosa 0,3 M pretratadas con EDA 2,1	29	0,513	0,031	6,1	78,1	6E-08 frente a células con sacarosa

Tal como puede observarse, el pretratamiento con EDA puede proteger significativamente contra la muerte celular inducida por choque hiperosmótico.

5

Conclusiones:

Los resultados mostrados demuestran que el pretratamiento con EDA puede proteger contra la deshidratación y el choque hiperosmótico.

10

Ejemplo 2 - Efecto protector del pretratamiento con EDA contra estrés térmico ambiental

El objeto de este experimento es evaluar el posible efecto protector del pretratamiento con extracto de *Deschampsia antarctica* en la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT contra el estrés térmico (o bien con frío o bien con calor), evaluando dicho efecto en primer lugar con respecto a la supervivencia y en segundo lugar con respecto a la acción del mismo sobre el potencial mitocondrial.

15

Materiales y métodos:

20 – Productos que van a someterse a prueba:

Extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA) liofilizado, lote 13E04. Se disolvió directamente el producto en un tampón convencional (véase a continuación) a una concentración de 1 mg/ml y se aplicaron 100 μ l de esta disolución.

25 Se secó el extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA) con almidón, lote 200314, contenido en EDA 0,25 g de EDA/g de producto. Se suspendió el producto en un tampón convencional a una concentración de 10 mg/ml (equivalente a 2,5 mg de EDA/ml), se agitó en un agitador magnético durante 30 minutos y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 μ m (Minisart, Sartorius). Se aplicaron 100 μ l de esta disolución.

30 – Medios de cultivo y reactivos:

Medio RPMI1640 (Sigma). Penicilina-estreptomocina (Sigma). Glutamina (Sigma). Suero bovino fetal (Sigma). EDTA-tripsina al 0,25% (Sigma). Solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tampón convencional para pruebas (NaCl 80 mM, KCl 75 mM, D-glucosa 25 mM, ácido (4-(3-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico (Hepes) 25 mM, pH 7,4). Perclorato de éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) (Sigma). Carbonilcuanuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma). Glutaraldehído (Sigma). Cristal violeta (Sigma). Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Sigma).

35

– Cultivo celular:

40 Las células usadas fueron la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT. Se cultivaron las células en RPMI complementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 μ g/ml, estreptomocina 50 U/ml, suero bovino fetal al 10% en placas de 96 pocillos de plástico con fondo redondo especiales para fluorescencia (Nunc), en un horno Heraeus con una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire humidificado a 37°C. Se hicieron crecer las células hasta una confluencia del 100% antes del tratamiento. Las filas A y H se dejan habitualmente sin células.

45

– Tratamiento con producto:

Experimentos de estrés térmico: Se retiró el medio y se lavaron las placas una vez con 100 μ l de tampón convencional. Se añadieron 100 μ l de disolución de EDA y se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C en un horno en las

condiciones indicadas para el cultivo celular. Se usaron tres placas por experimento, una para control sin ataque térmico, otra para ataque térmico con frío y la última para ataque térmico con calor; la mitad de cada placa se dedicó a control y la otra mitad a pretratamiento con EDA.

5 Ataque térmico: Se retiró el medio (+/- producto), se lavó la placa dos veces con 100 µl de tampón convencional y se añadieron 100 µl de tampón convencional por pocillo a toda la placa. La placa control no se incubó (es decir, se mantuvo en el horno en condiciones normales), la placa "fría" se almacenó en un congelador a -20°C o a -35°C durante 40 minutos y la placa "caliente" se incubó en un horno a 45°C durante 2 horas o a 42°C durante 45 ó 60 minutos. Se retiró el tampón convencional, se lavó la placa con tampón convencional templado 2 x 100 µl por pocillo, se aplicaron 100 µl de tampón convencional templado por pocillo y se dejó que la placa se aclimatara durante 15 minutos a 37°C, y se midieron el potencial mitocondrial y luego la viabilidad celular.

– Medición del potencial mitocondrial:

15 Esto se realizó según el protocolo descrito por Huang (Huang SG. Development of a High Throughput Screening Assay for Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. J Biomol Screen 2002, 7: 383-9): Se lavó la placa dos veces con tampón convencional y se añadieron 100 µl de tampón convencional por pocillo a toda la placa y se añadieron 10 µl de TMRM por pocillo (a partir de una disolución 1,65 µM en tampón convencional, preparada de manera extemporánea a partir de una disolución 0,8 mM en DMSO) a toda la placa y se añadieron 10 µl de CCCP por pocillo (a partir de una disolución 0,12 mM en tampón convencional, preparada de manera extemporánea a partir de una disolución 10 mM en DMSO) a los pocillos correspondientes (habitualmente la mitad de la placa). Se incubó la placa durante 15 minutos en las condiciones indicadas anteriormente. Una vez finalizada la incubación, se lavó la placa 4 veces con 160 µl de PBS por pocillo. Se añadieron 100 µl de PBS por pocillo y se leyó la placa en un lector de fluorescencia Fluostar Optima de BMG con lectura de fondo, usando un filtro de excitación de 530 nm y un filtro de emisión de 590 nm.

– Medición de la viabilidad celular:

30 Se lavaron las placas dos veces con PBS. Se fijaron con 100 µl de una disolución de glutaraldehído al 0,25% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se tiñeron con una disolución de cristal violeta al 0,2% en una disolución de etanol al 2% durante 10 minutos a 37°C. Se lavó la placa con agua y se solubilizaron las células con dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. Se agitó la placa cuidadosamente en un agitador de placas y se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Fluostar Optima de BMG.

– Análisis estadístico:

35 Se realizó el análisis estadístico para cada experimento, considerando el valor de cada pocillo como un valor independiente, determinando la significación por medio de la prueba de la t de Student usando Excel o Graph Pad Prism.

40 Resultados

– Tensión térmica con frío:

a) Supervivencia celular:

45 Los resultados de dos experimentos se muestran en las siguientes tablas:

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	1,012	0,078	36			100	
EDA 1 mg/ml	1,243	0,081	36	<0,0001	CC frente a EDA	123	1,23
CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	1,036	0,107	36	0,282	CC frente a CC+F	102	
EDA 1 mg/ml + F	1,177	0,038	33	<0,0001	CC+F frente a EDA+F	116	1,14

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	0,734	0,102	36			100	

ES 2 799 714 T3

EDA 1 mg/ml	1,054	0,098	36	<0,001	CC frente a EDA	144	1,44
CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	0,799	0,086	36	ns	CC frente a CC+F	109	
EDA 1 mg/ml + F	1,038	0,168	33	<0,001	CC+F frente a EDA+F	141	1,30

Tal como puede observarse, el estrés térmico con frío no produce una reducción en la viabilidad celular en las condiciones indicadas y de hecho se observa un claro efecto proliferativo de EDA.

- 5 En condiciones más estrictas (en las que se ha producido congelación), el efecto sobre la viabilidad celular es mucho más significativo y se observa claramente el efecto protector del EDA:

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC
Células control CC	2,142	0,294	34			100,0	
EDA 1 mg/ml	1,937	0,537	30	0,060	CC frente a EDA	90,5	0,90
CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	0,489	0,700	36	<0,0001	CC+F frente a CC	22,8	
EDA 1 mg/ml + F	0,826	0,521	36	0,023	CC+F frente a EDA+F	38,6	1,69

b) Potencial mitocondrial y potencial mitocondrial corregido:

10

En vista del resultado anterior, se tomó la decisión de calcular no sólo el potencial mitocondrial, sino también el potencial mitocondrial corregido para células viables, considerando que este último puede ser más representativo del fenómeno biológico. Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en los experimentos a -20°C:

Potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	15053	2024	18			100	
EDA 1 mg/ml	19080	4503	18	0,001	CC frente a EDA	127	1,27
CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	5153	2964	17	<0,0001	CC+F frente a CC	34	
EDA 1 mg/ml + F	11023	2140	16	<0,0001	CC+F frente a EDA+F	73	2,14
$\Delta\psi_m$ corregido (= $\Delta\psi_m$ /células viables)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA frente a CC del mismo
CC	14869	3150	18			100	
EDA 1 mg/ml	15355	4624	18	0,715	CC frente a EDA	103	1,03
CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	4972	3373	17	<0,0001	CC frente a CC+F	33	
EDA 1 mg/ml + F	9364	2121	16	0,0001	CC+F frente a EDA+F	63	1,88

15

Potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
CC	12991	6596	17			100	
EDA 1 mg/ml	11401	3439	18	0,407	CC frente a EDA	88	0,88

ES 2 799 714 T3

CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	4503	4116	18	<0,001	CC+F frente a CC	35	
EDA 1 mg/ml + F	8003	2728	18	0,005	CC+F frente a EDA+F	62	1,78
$\Delta\psi_m$ corregido (= $\Delta\psi_m$/células viables)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
CC	17704	11447	17			100	
EDA 1 mg/ml	10818	4266	18	0,023	CC frente a EDA	61	0,61
CC + frío (-20°C, 40 min) (F)	5639	5761	18	0,0004	CC frente a CC+F	32	
EDA 1 mg/ml + F	7713	3881	18	0,214	CC+F frente a EDA+F	44	1,37

Tal como puede observarse, el frío produce una clara reducción en el potencial de la membrana mitocondrial, reducción que se invierte mediante EDA; en el caso del potencial mitocondrial corregido, el frío también produce una reducción significativa y EDA muestra una clara tendencia protectora.

5

No es posible medir el potencial mitocondrial en condiciones más agresivas

– Estrés térmico con calor

10 a) Supervivencia celular:

Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA frente a CC del mismo
Células control (CC)	1,012	0,078	36			100	
EDA 1 mg/ml	1,243	0,081	36	<0,0001	CC frente a EDA	123	1,23
CC + calor (45°C, 2 horas) (Q)	0,108	0,033	36	<0,0001	CC frente a CC+Q	11	
EDA 1 mg/ml + Q	0,453	0,116	35	<0,0001	CC+Q frente a EDA+Q	45	4,20

15

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	0,734	0,102	36			100	
EDA 1 mg/ml	1,054	0,098	36	<0,0001	CC frente a EDA	144	1,44
CC + calor (45°C, 2 horas) (Q)	0,332	0,071	35	<0,0001	CC frente a CC+Q	45	
EDA 1 mg/ml + Q	0,735	0,142	36	<0,0001	CC+Q frente a EDA+Q	100	2,21

Tal como puede observarse, el calor (45°C, 2 horas) produce una disminución significativa en la viabilidad celular, disminución que se invierte mediante el pretratamiento con EDA.

20 Se observa una disminución más pequeña en la viabilidad celular en condiciones más suaves (42°C, 45 minutos), disminución que, al igual que en el caso anterior, se invierte mediante pretratamiento con EDA.

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	1,727	0,091	33			100,0	
EDA 1 mg/ml	1,963	0,081	34	<0,0001	CC frente a EDA	113,7	1,14
CC + calor (42°C, 45 min) (Q)	1,556	0,350	35	0,008	CC+Q frente a CC	90,1	
EDA 1 mg/ml + Q	1,738	0,155	35	0,006	CC+Q frente a EDA+Q	100,7	1,12

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	1,352	0,119	48			100	
EDA 2,5 mg/ml	1,698	0,166	48	<0,0001	CC frente a EDA	126	1,26
CC + calor (42°C, 45 min) (Q)	0,932	0,098	48	<0,0001	CC frente a CC+Q	69	
EDA 2,5 mg/ml + Q	1,151	0,084	48	<0,0001	CC+Q frente a EDA+Q	85	1,24

5

El efecto de EDA es el mismo en condiciones ligeramente más rigurosas (42°C, 60 min):

Viabilidad (cristal violeta)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
CC	0,694	0,133	48			100	
EDA 2,5 mg/ml	1,356	0,260	48	<0,0001	CC frente a EDA	195	1,95
CC + calor (42°C, 60 min) (Q)	0,336	0,051	32	<0,0001	CC frente a Calor	48	
EDA 2,5 mg/ml + Q	1,205	0,362	45	<0,0001	Calor 60 min frente a calor 60 min + EDA	174	3,59

10

b) Potencial mitocondrial y potencial mitocondrial corregido:

En las primeras condiciones sometidas a prueba (45°C, 2 horas) no es posible detectar de manera fiable el potencial mitocondrial en grupos control ni en grupos tratados.

15

En condiciones más suaves (42°C, 45 minutos), se observa que el EDA tiene una clara tendencia a proteger el potencial mitocondrial del estrés térmico producido por calor:

Potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	12787	2617	16			100,0	
EDA 1 mg/ml	14388	5503	18	0,297	CC frente a EDA	112,5	1,13
CC + calor (42°C, 45 min) (Q)	7010	4141	15	<0,0001	CC+Q frente a CC	54,8	
EDA 1 mg/ml + Q	11188	4816	16	0,015	CC+Q frente a EDA+Q	87,5	1,60

$\Delta\psi_m$ corregido (= $\Delta\psi_m$ /células viables)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo

ES 2 799 714 T3

Células control (CC)	7406	1907	16			100,0	
EDA 1 mg/ml	7331	3108	18	ns	CC frente a EDA	99,0	0,99
CC + calor (42°C, 45 min) (Q)	4506	3677	15	0,009	CC frente a CC+Q	60,8	
EDA 1 mg/ml + Q	6437	3344	16	0,137	CC+Q frente a EDA+Q	86,9	1,43

Potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	11983	5099	24			100	
EDA 2,5 mg/ml	11363	3870	24	0,660	CC frente a EDA	95	0,95
CC + calor (42°C, 45 min) (Q)	7299	2841	24	0,0003	CC frente a CC+Q	61	
EDA 2,5 mg/ml + Q	8497	1695	24	0,083	CC+Q frente a EDA+Q	71	1,16

$\Delta\psi_m$ corregido (= $\Delta\psi_m$ /células viables)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	8862	4553	24			100	
EDA 2,5 mg/ml	6692	2934	24	0,056	CC frente a EDA	76	0,76
CC + calor (42°C, 45 min) (Q)	7834	3875	24	0,404	Q frente a EDA+Q	88	
EDA 2,5 mg/ml + Q	7381	2008	24	0,614	EDA frente a EDA+Q	83	0,94

5 El efecto es el mismo, aunque más claro en condiciones ligeramente más rigurosas (42°C, 60 min):

Potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	10630	4967	24			100	
EDA 2,5 mg/ml	8639	2549	24	0,086	CC frente a EDA	81	0,81
CC + calor (42°C, 60 min) (Q)	4672	3526	12	0,001	CC frente a Q	44	
EDA 2,5 mg/ml + Q	9711	3531	22	0,0003	Q frente a EDA + Q	91	2,08

$\Delta\psi_m$ corregido (= $\Delta\psi_m$ /células viables)	\bar{x}	DE	n	p		% frente a CC	EDA / CC del mismo
Células control (CC)	15314	10086	24			100	
EDA 2,5 mg/ml	6372	3103	24	0,0001	CC frente a EDA	42	0,42
CC + calor (42°C, 60 min) (Q)	13916	12621	12	0,7208	CC+Q frente a CC	91	
EDA 2,5 + Q mg/ml	8061	5354	22	0,0662	Q frente a EDA + Q	53	0,58

Conclusiones:

10 Los resultados mostrados demuestran que el pretratamiento con EDA puede proteger contra los efectos del estrés térmico con frío y con calor.

Ejemplo 3 - Efecto protector del pretratamiento con EDA contra la contaminación ambiental (humos de tabaco)

5 El objeto de este experimento es evaluar el posible efecto protector del pretratamiento con extracto de *Deschampsia antarctica* en fibroblastos humanos o queratinocitos transformados contra la contaminación ambiental tal como la producida por humos de tabaco, evaluando dicho efecto sobre la supervivencia celular.

Materiales y métodos:

10 – Productos que van a someterse a prueba:

15 Extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA): En experimentos con fibroblastos, se usó EDA secado con almidón, lote 150414. Contenido en EDA 0,25 g de EDA/g de producto. Se suspendió el producto en un medio DMEM completo a una concentración de 10 mg/ml (equivalente a 2,5 mg de EDA/ml), se agitó en un agitador magnético durante 30 minutos y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm (Minisart, Sartorius). En experimentos con queratinocitos, se usó EDA adsorbido sobre maltodextrina, lote 160215 (hoja verde seca, lote 241114). Se disolvió el producto en un medio DMEM a una concentración de 10 mg/ml (equivalente a 2,1 mg de EDA/ml), se agitó en un agitador magnético durante 30 minutos y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm (Minisart, Sartorius).

20 Extracto de tabaco (CSC) preparado de manera extemporánea según Lamb *et al* 2012 (Lamb DJ, Parker N, Ulrich K, Walsh R, Yeadon M, Evans SM. Characterization of a Mouse Model of Cigarette Smoke Extract-Induced Lung Inflammation. J Pulmon Resp Med 2012, 2:125) con ligeras modificaciones: se conectó un cigarrillo con filtro (marca Ducados) al extremo de una bomba peristáltica, se puso la bomba en funcionamiento, se encendió el cigarrillo y se extrajo el humo por medio de la bomba peristáltica, haciéndolo burbujear en un tubo de ensayo que contenía 20 ml de medio DMEM libre de rojo fenol (CSC al 5%) o 7,5 cigarrillos en 15 ml (CSC al 50%). Cada cigarrillo durante un tiempo promedio de 7 minutos.

30 – Medios de cultivo y reactivos:

35 Medio DMEM libre de rojo fenol (Sigma). Medio DMEM (Sigma). Penicilina-estreptomicina (Sigma). Glutamina (Sigma). Suero bovino fetal (Sigma). EDTA-tripsina al 0,25% (Sigma). Solución salina tamponada con fosfato (PBS). Solución salina equilibrada de Hank (a continuación en el presente documento medio de Hank) (Sigma). Glutaraldehído (Sigma). Cristal violeta (Sigma). Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Sigma).

– Cultivo celular de fibroblastos:

40 Las células usadas fueron fibroblastos dérmicos humanos aislados de la zona exterior del colgajo retroauricular obtenido de diferentes donantes voluntarios sanos, y conservados en N₂ líquido. Los experimentos usaron células crecidas en frascos de cultivo que contenían DMEM complementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 µg/ml, estreptomina 50 U/ml, suero bovino fetal al 10%, en un horno Heraeus con una atmósfera de 7% de CO₂ y 93% de aire humidificado a 37°C, hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 90%, tras lo que se realizó un nuevo pase por medio de tripsinización. Para los experimentos, se usaron células entre los pases 3 y 6 que se habían sembrado placas de 6 ó 96 pocillos con fondo redondo (Nunc) a una densidad inicial de 10⁵ células/ml, respectivamente, y se dejaron crecer en un incubador hasta alcanzar la confluencia.

– Cultivo celular de queratinocitos:

50 Las células usadas fueron la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT. Se cultivaron las células en DMEM complementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 µg/ml, estreptomina 50 U/ml, suero bovino fetal al 10% en placas de 96 pocillos de plástico con fondo redondo (Nunc), en un horno Heraeus con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire humidificado a 37°C. Para los experimentos, se usaron células que se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Nunc) a una densidad inicial de 10⁵ células/ml, respectivamente, y se dejaron crecer en un incubador hasta alcanzar la confluencia.

– Tratamiento con productos:

60 Pretratamiento con EDA: Tanto en los experimentos con fibroblastos como en aquellos con queratinocitos, se añadieron 100 µl por pocillo de la disolución de EDA preparada tal como se indicó anteriormente a la mitad de cada placa y se incubó la placa durante aproximadamente 20 horas en un incubador.

65 Tratamiento con CSC: En los experimentos con fibroblastos, tras el pretratamiento, se lavaron las placas dos veces con medio de Hank y se añadieron 100 µl por pocillo de disolución al 5% de CSC preparada tal como se indicó anteriormente o 100 µl por pocillo de disolución de DMEM libre de rojo fenol y se incubaron las placas durante 3,5 horas en un incubador.

En los experimentos con queratinocitos, tras el pretratamiento, se lavaron las placas dos veces con medio de Hank y se añadieron 100 µl por pocillo de la disolución al 50% de CSC preparada tal como se indicó anteriormente o 100 µl por pocillo de disolución de DMEM libre de rojo fenol y se incubaron las placas durante 20 horas en un incubador.

Las cantidades indicadas son para placas de 96 pocillos. Para placas de 6 pocillos (sólo en el caso de fibroblastos), se usa el mismo método, multiplicando la cantidad x30.

– Medición de la viabilidad celular:

Se lavaron las placas de 96 pocillos dos veces con medio de Hank. Se fijaron con 100 µl de una disolución de glutaraldehído al 0,25% en medio de Hank durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron una vez con agua. Se tiñeron con una disolución de cristal violeta al 0,2% en una disolución de etanol al 2% durante 15 minutos a 37°C. Se lavó la placa con agua y se solubilizaron las células con 100 µl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. Se agitó cuidadosamente en un agitador de placas y se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Fluostar Optima de BMG.

Se usó el método similar para las placas de 6 pocillos, multiplicando los volúmenes por 30. En este caso, las células fijadas y teñidas no se solubilizaron y se tomaron fotografías de dichas células. También se tomaron microfotografías con una cámara Olympus OM-2 acoplada a un microscopio invertido Olympus IMT-311 por medio de un adaptador ocular FK y un adaptador para microfotografía L. Se usó un rollo de película en color Kodak 400 ASA.

– Análisis estadístico:

Se realizó el análisis estadístico para cada experimento, considerando el valor de cada pocillo como un valor independiente, determinando la significación por medio de la prueba de la t de Student usando Excel o Graph Pad Prism.

Resultados:

a) Experimentos con fibroblastos:

La siguiente tabla muestra el resultado de tres experimentos diferentes.

	\bar{x}	DE	n	p		% viabilidad frente a CC
Células control (CC)	0,686	0,037	48			100,0
EDA	0,649	0,029	48	<0,0001	CC frente a EDA	94,5
CC + CSC al 5%	0,360	0,040	48	<0,0001	CC frente a CC+CSC	52,5
EDA + CSC al 5%	0,521	0,034	48	<0,0001	CC+CSC frente a EDA+CSC	75,9
				<0,0001	EDA frente a EDA+CSC	

	\bar{x}	DE	n	p		% viabilidad frente a CC
CC	0,524	0,025	48			100,0
EDA	0,538	0,018	48	0,002	CC frente a EDA	102,7
CC + CSC al 5%	0,466	0,029	48	<0,0001	CC frente a CC+CSC	89,0
EDA + CSC al 5%	0,552	0,026	48	<0,0001	CC+CSC frente a EDA+CSC	105,3
				0,696	EDA frente a EDA+CSC	

ES 2 799 714 T3

	\bar{x}	DE	n	p		% viabilidad frente a CC
CC	0,417	0,046	48			100,0
EDA	0,386	0,019	48	<0,0001	CC frente a EDA	92,6
CC + CSC al 5%	0,262	0,016	48	<0,0001	CC frente a CC+CSC	62,7
EDA + CSC al 5%	0,325	0,018	48	<0,0001	CC+CSC frente a EDA+CSC	77,8
				<0,0001	EDA frente a EDA+CSC	

5 Tal como puede observarse, el tratamiento con humo de tabaco (CSC al 5%) produce una reducción en la viabilidad promedio de los fibroblastos del 32% y esta reducción disminuye hasta el 18% cuando se pretratan con EDA; es decir, hay una reducción del 44% en la mortalidad inducida por humo de tabaco.

La figura 3 muestra como ejemplo los resultados de uno de los experimentos (las diferencias entre los diferentes grupos son significativas ($p < 0,01$)).

10 Puede observarse el mismo efecto en placas de 6 pocillos (figura 4).

15 La figura 5 muestra las diferencias en la morfología celular donde, además de una reducción en el número de células (densidad inferior), se muestra que el tratamiento con humo de tabaco (A) produce una disposición altamente desordenada de células así como células con formas anómalas, no fusiformes, algunas con bordes irregulares, mientras que las células pretratadas con EDA y después con humo de tabaco (B) muestran la forma fusiforme característica de los fibroblastos y una gran organización que también es característica de los fibroblastos.

b) Experimentos con queratinocitos:

20 La siguiente tabla muestra el resultado de dos experimentos diferentes.

	\bar{x}	DE	n	p		% viabilidad frente a CC
Células control (CC)	1,380	0,143	30			100
EDA	1,481	0,138	30	0,007	EDA frente a CC	107
CSC al 50%	1,015	0,085	30	<0,0001	CSC frente a CC	74
CSC al 50% + EDA	1,313	0,076	30	<0,0001	EDA + CSC frente a CSC	95
				<0,0001	EDA + CSC frente a EDA	
				<0,0001	CSC + EDA frente a CC	

	\bar{x}	DE	n	p		% viabilidad frente a CC
Células control (CC)	1,271	0,103	30			100
EDA	1,283	0,128	30	0,688	EDA frente a CC	101
CSC al 50%	0,876	0,074	30	<0,0001	CSC frente a CC	69
CSC al 50% + EDA	1,166	0,157	30	<0,0001	EDA + CSC frente a CSC	92
				0,003	EDA + CSC frente a EDA	
				0,003	CSC + EDA frente a CC	

25 Tal como puede observarse, el tratamiento con humo de tabaco (CSC al 50%) produce una reducción en la viabilidad promedio de los queratinocitos del 28%, y esta reducción disminuye hasta el 6% cuando se pretratan con EDA; es decir, hay una reducción del 79% en la mortalidad inducida por humo de tabaco.

30 La figura 6 muestra como ejemplo los resultados de uno de los experimentos (las diferencias entre los diferentes grupos son significativas ($p < 0,01$)).

Conclusiones:

5 Los resultados mostrados demuestran que el pretratamiento con EDA puede proteger contra los efectos de contaminación por humo de tabaco.

Ejemplo 4 - Efecto protector del pretratamiento con EDA contra la contaminación ambiental (arsénico, cadmio, cromo)

10 El objeto de este experimento es evaluar el posible efecto protector del pretratamiento con extracto de *Deschampsia antarctica* en fibroblastos humanos contra la contaminación ambiental tal como la producida por arsénico, cadmio o cromo, evaluando dicho efecto sobre la supervivencia celular.

Materiales y métodos:

15 – Productos que van a someterse a prueba:

Extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA): En experimentos con fibroblastos, se usó EDA liofilizado, lote 051214. El producto se disolvió en un medio DMEM completo a una concentración de 5 mg/ml, se agitó en un agitador magnético durante 30 minutos y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm (Minisart, Sartorius).

20 Cd(II): Se disolvió cloruro de cadmio (CdCl₂) a una concentración final de 0,3 mM en medio DMEM libre de rojo fenol y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm (Minisart, Sartorius). Se prepararon las diluciones indicadas en la sección de resultados sección a partir de esta disolución con medio DMEM libre de rojo fenol.

25 Cr(VI) y Cr(III): Se disolvieron por separado trióxido de cromo (CrO₃) y cloruro de cromo (CrCl₃) a una concentración final 0,5 mM en medio DMEM libre de rojo fenol; se combinaron volúmenes iguales de ambas disoluciones y se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm (Minisart, Sartorius). Se prepararon las diluciones indicadas en la sección de resultados a partir de esta disolución con medio DMEM libre de rojo fenol.

30 As(III): Se disolvió arsenito de sodio (NaAsO₂) a una concentración final de 9 mM en medio DMEM libre de rojo fenol y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm (Minisart, Sartorius).

– Medios de cultivo y reactivos:

35 Medio DMEM libre de rojo fenol (Sigma). Medio DMEM (Sigma). Penicilina-estreptomina (Sigma). Glutamina (Sigma). Suero bovino fetal (Sigma). EDTA-tripsina al 0,25% (Sigma). Solución salina tamponada con fosfato (PBS). Solución salina equilibrada de Hank (a continuación en el presente documento medio de Hank) (Sigma). Glutaraldehído (Sigma). Cristal violeta (Sigma). Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Sigma).

40 – Cultivo celular de fibroblastos:

Las células usadas fueron fibroblastos dérmicos humanos aislados de la zona exterior del colgajo retroauricular obtenido de diferentes donantes voluntarios sanos, y conservados en N₂ líquido. Los experimentos usaron células crecidas en frascos de cultivo que contenían DMEM complementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 µg/ml, estreptomina 50 U/ml, suero bovino fetal al 10%, en un horno Heraeus con una atmosfera de 7% de CO₂ y 93% de aire humidificado a 45 37°C, hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 90%, tras lo que se realizó un nuevo pase por medio de tripsinización. Para los experimentos, se usaron células entre los pases 9 y 11 que se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Nunc) a una densidad inicial de 10⁵ células/ml, respectivamente, y se dejaron crecer en un incubador hasta alcanzar la confluencia.

50 – Tratamiento con productos:

Pretratamiento con EDA: Se añadieron 100 µl por pocillo de la disolución de EDA preparada tal como se indicó anteriormente (o las disoluciones relevantes en DMEM completo) a la mitad de cada placa y se incubó la placa durante 55 aproximadamente 24 horas en un incubador.

Tratamiento con metales: Tras el pretratamiento, se lavaron las placas dos veces con medio de Hank y se añadieron 100 µl por pocillo de la disolución que contenía metal a la concentración indicada en la sección de resultados preparada tal como se indicó anteriormente o 100 µl por pocillo de disolución de DMEM libre de rojo fenol y se incubaron las placas 60 durante 24 horas en un incubador.

– Medición de la viabilidad celular:

65 Se lavaron las placas dos veces con medio de Hank. Se fijaron con 100 µl de una disolución de glutaraldehído al 0,25% en medio de Hank durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron una vez con agua. Se tiñeron con una

ES 2 799 714 T3

disolución de cristal violeta al 0,2% en una disolución de etanol al 2% durante 15 minutos a 37°C. Se lavó la placa con agua y se solubilizaron las células con 100 µl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. Se agitó cuidadosamente en un agitador de placas y se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Fluostar Optima de BMG.

5 – Análisis estadístico:

Se realizó el análisis estadístico para cada experimento, considerando el valor de cada pocillo como un valor independiente, determinando la significación por medio de la prueba de la t de Student usando Excel o Graph Pad Prism.

10

Resultados:

– Efecto de pretratamiento con EDA con respecto a exposición a Cd(II):

15 Se determinó en primer lugar la concentración de trabajo de Cd(II) que produjo la mortalidad de aproximadamente el 50%. Los resultados se muestran en Figura 7:

Tal como puede observarse, Cd(II) a una concentración de 3 µM produce la mortalidad de aproximadamente el 50%.

20 La siguiente tabla y la figura 8 muestran el efecto de pretratamiento con diferentes concentraciones de EDA y la exposición posterior a CD (II) 3 µM.

Supervivencia (u de abs)	n	\bar{x}	DE	CV	%	p	
CC	30	0,342	0,051	14,8	100,0		
EDA 5 mg/ml + Cd 3 µM	12	0,330	0,044	13,4	96,6	<0,0001	EDA 5 mg/ml frente a Cd 3 µM
EDA 1 mg/ml + Cd 3 µM	18	0,325	0,048	14,7	95,0	<0,0001	EDA 1 mg/ml frente a Cd 3 µM
EDA 0,5 mg/ml + Cd 3 µM	18	0,246	0,038	15,3	71,9	<0,0001	EDA 0,5 mg/ml frente a Cd 3 µM
EDA 0,1 mg/ml + Cd 3 µM	11	0,237	0,046	19,4	69,3	0,008	EDA 0,1 mg/ml frente a Cd 3 µM
3 Cd 3 µM	29	0,188	0,050	26,3	54,9	<0,0001	CC frente a Cd 3 µM

25 Tal como puede observarse, el pretratamiento con EDA protege significativamente a todas las concentraciones sometidas a prueba contra la exposición posterior a cloruro de cadmio.

– Efecto de pretratamiento con EDA contra exposición a Cr(III) y Cr(VI):

30 En primer lugar se determinó la concentración de trabajo de Cr(III) y Cr(VI) estudiando la supervivencia de fibroblastos con respecto a diferentes concentraciones de estos metales. Los resultados se muestran en la figura 9:

Tal como puede observarse, se logra la supervivencia de aproximadamente el 50% a una concentración de 6 µM, por lo que esta concentración se seleccionó para los experimentos de protección.

35 La siguiente tabla muestra los resultados de un experimento que consiste en pretratamiento con EDA (5 mg/ml) y la exposición posterior a Cr(III)+Cr(VI):

	n	\bar{x}	DE	CV	%	%	p	
CC	24	0,195	0,057	29,4	100,0			
CC + Cr 6 µM	17	0,103	0,034	33,0	52,8	100,0	<0,0001	CC frente a CC + Cr 6 µM
EDA + Cr 6 µM	18	0,131	0,025	19,2	67,1	127,2	0,0099	CC + Cr 6 µM frente a EDA + Cr 6 µM

40 Tal como puede observarse, el pretratamiento con EDA tiene un efecto protector significativo contra el ataque producido por la exposición conjunta a trióxido de cromo y cloruro de cromo.

– Efecto de pretratamiento con EDA con respecto a exposición a As(III):

La siguiente tabla muestra el resultado de tres experimentos que estudiaron el efecto de pretratamiento con EDA (5 mg/ml) contra el ataque producido por la exposición posterior a arsenito de sodio 9 mM (NaAsO₂ 9 mM)

Supervivencia (u de abs)	n	\bar{x}	DE	CV	%	%	p	
CC	24	0,719	0,040	5,5	100,0			
Arsenito de sodio 9 mM	18	0,334	0,062	18,5	46,4	100	p<0,0001	CC frente a AsO ₂ 9 mM
EDA + arsenito de sodio 9 mM	18	0,455	0,047	10,2	63,2	136,3	p<0,0001	AsO ₂ 9 mM frente a AsO ₂ 9 mM + EDA
							p<0,0001	CC frente a AsO ₂ 9 mM + EDA

5

	n	\bar{x}	DE	CV	%	%	p	
CC	24	0,498	0,045	9,1	100,0			
arsenito de sodio 9 mM	18	0,209	0,019	9,0	42,0	100	p<0,0001	CC frente a AsO ₂ 9 mM
EDA + arsenito de sodio 9 mM	18	0,282	0,021	7,5	56,6	134,6	p<0,0001	AsO ₂ 9 mM frente a AsO ₂ 9 mM + EDA
							p<0,0001	CC frente a AsO ₂ 9 mM + EDA

	n	\bar{x}	DE	CV	%	%	p	
CC	24	0,378	0,040	10,6	100,0			
arsenito de sodio 9 mM	17	0,206	0,024	11,6	54,6	100	p<0,0001	CC frente a AsO ₂ 9 mM
EDA + arsenito de sodio 9 mM	18	0,275	0,024	8,5	72,9	133,4	p<0,0001	AsO ₂ 9 M frente a AsO ₂ 9 mM + EDA
							p<0,0001	CC frente a AsO ₂ 9 mM

- 10 Tal como puede observarse, el pretratamiento con EDA tiene un efecto protector significativo contra el ataque producido por exposición a arsenito de sodio.

Conclusiones:

- 15 Los resultados mostrados demuestran que el pretratamiento con EDA puede proteger contra los efectos de contaminación por arsénico, cadmio o cromo.

REIVINDICACIONES

1. Uso cosmético de un extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA) para contrarrestar el daño a la barrera cutánea humana producido por agresiones ambientales no derivadas de radiación UV.
5
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho extracto previene y/o reduce la incomodidad cutánea y el daño cutáneo inducido por contaminantes químicos del aire y condiciones climáticas distintas de radiación UV.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que los contaminantes químicos del aire se seleccionan del grupo que consiste en humo y metales pesados.
10
4. Uso según la reivindicación 2, en el que las condiciones climáticas se seleccionan del grupo que consiste en choques osmóticos, baja humedad del aire y estrés térmico ambiental.
- 15 5. Extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA) para su uso en la mejora y/o la prevención de trastornos de la barrera cutánea humana y signos asociados, siendo seleccionados de piel seca, dermatitis atópica y dermatitis de contacto.
- 20 6. Composición para su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos de la barrera cutánea humana y signos asociados, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz de extracto de *Deschampsia antarctica* (EDA) en un medio fisiológicamente aceptable y siendo seleccionados dichos trastornos de piel seca, dermatitis atópica y dermatitis de contacto.

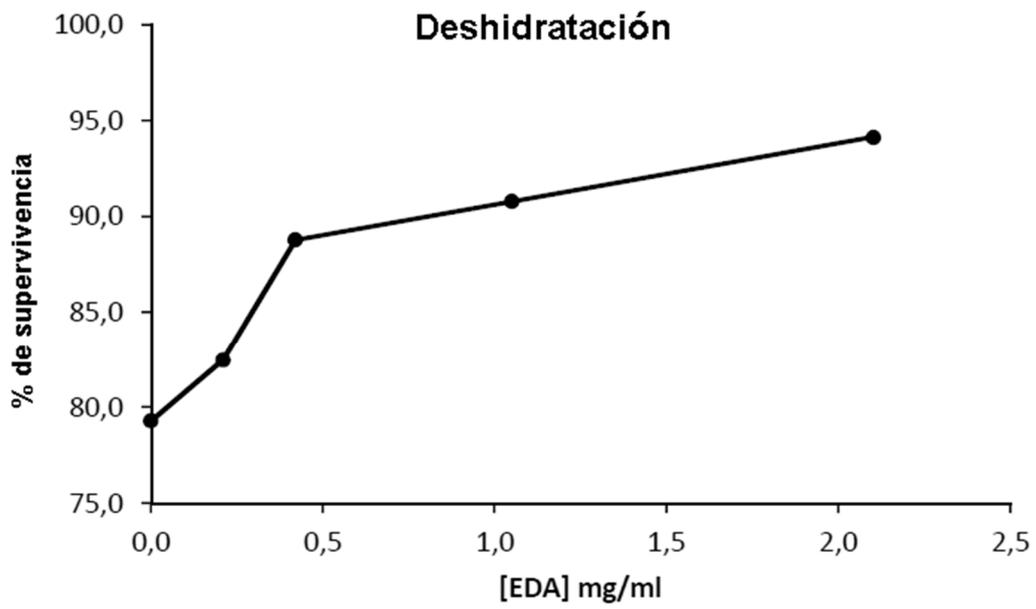


Fig. 1

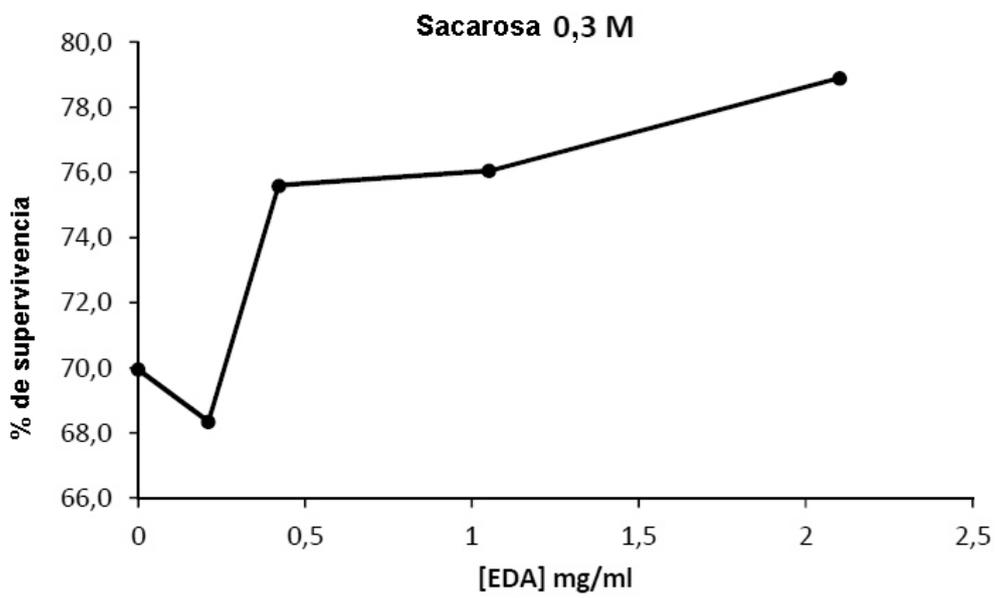


Fig. 2

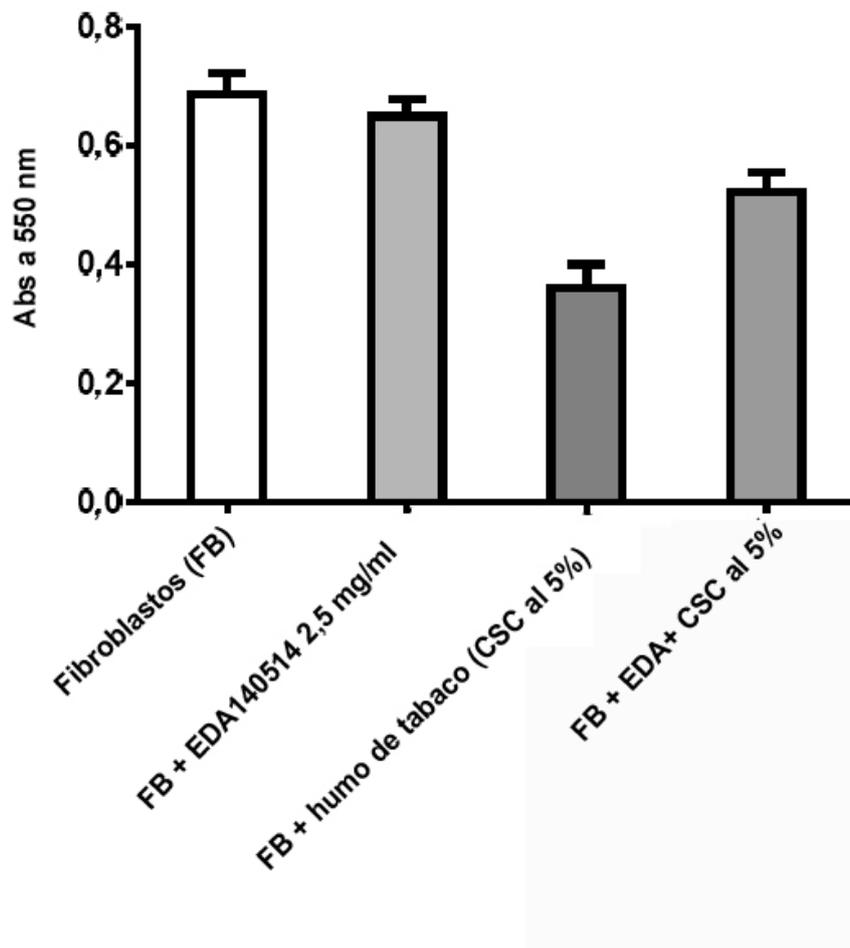


Fig. 3

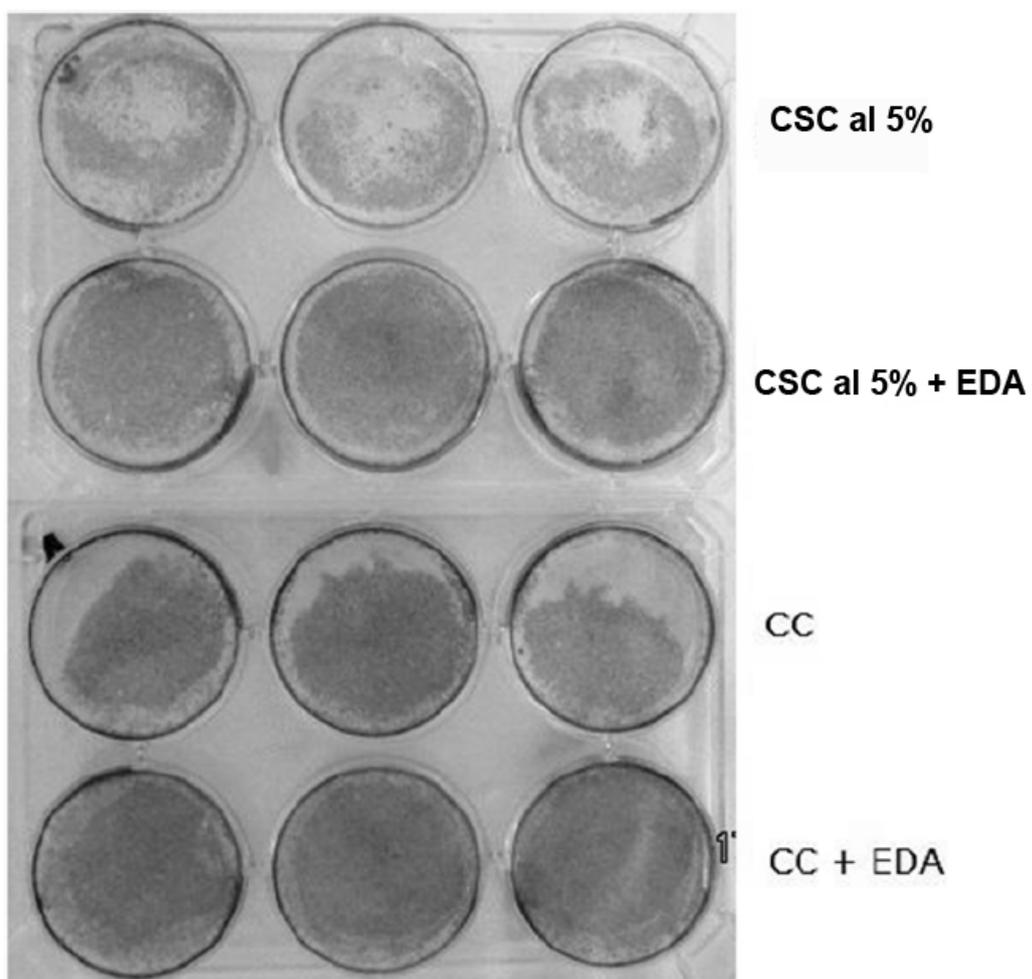


Fig. 4

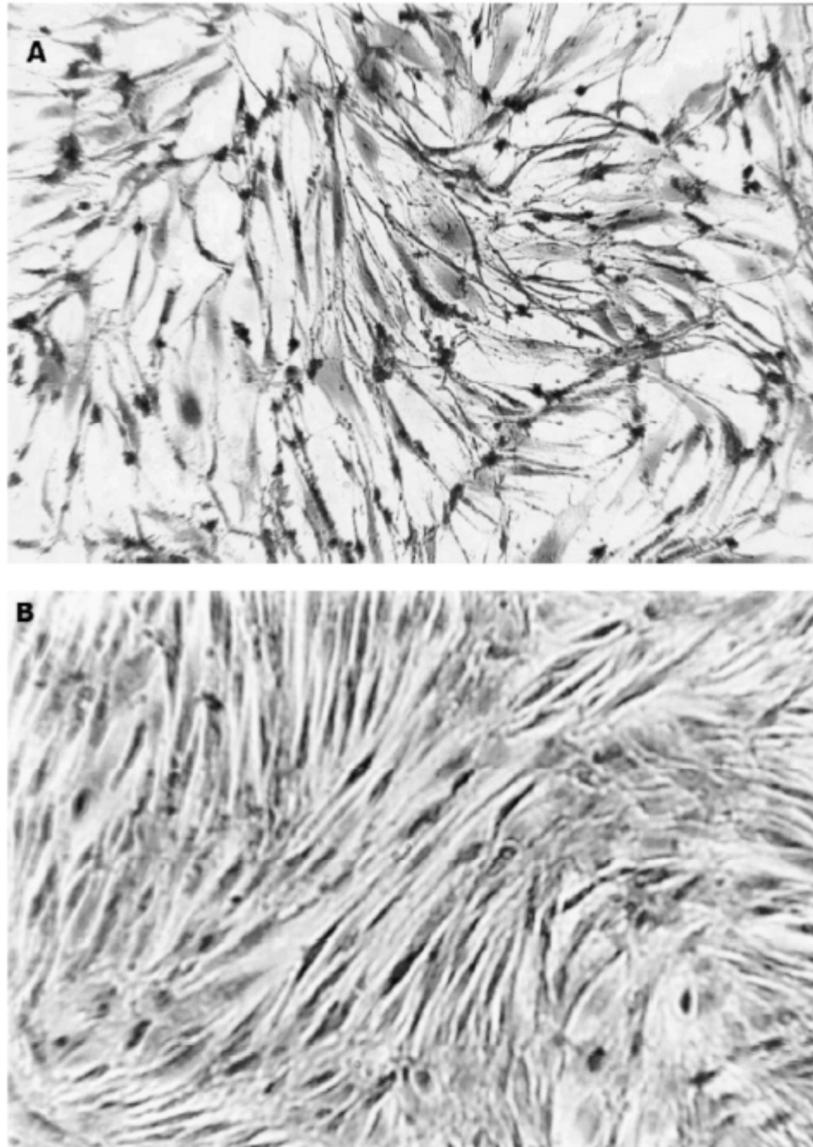


Fig. 5

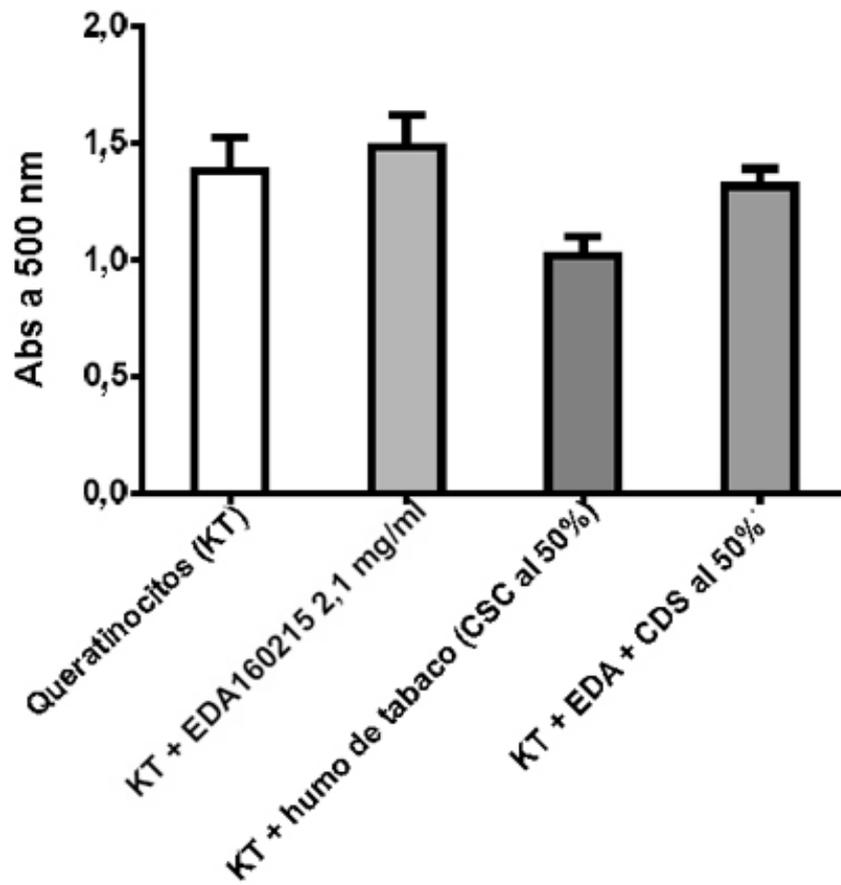


Fig. 6

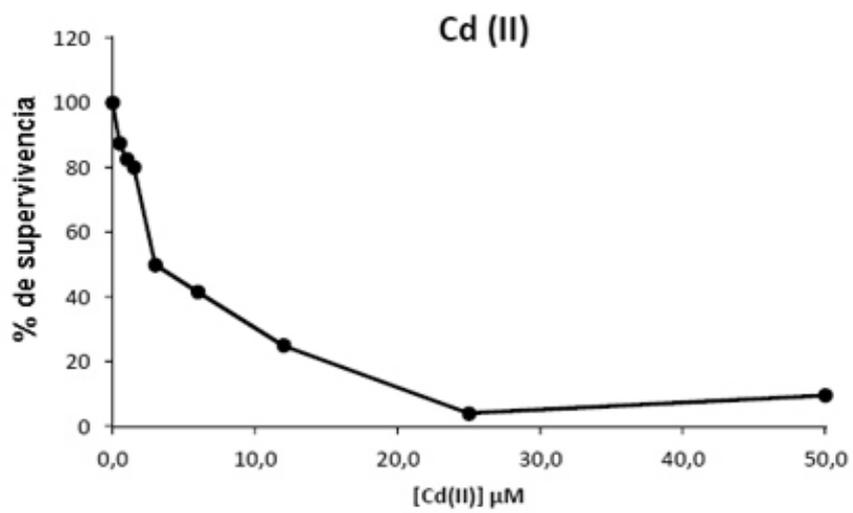


Fig. 7

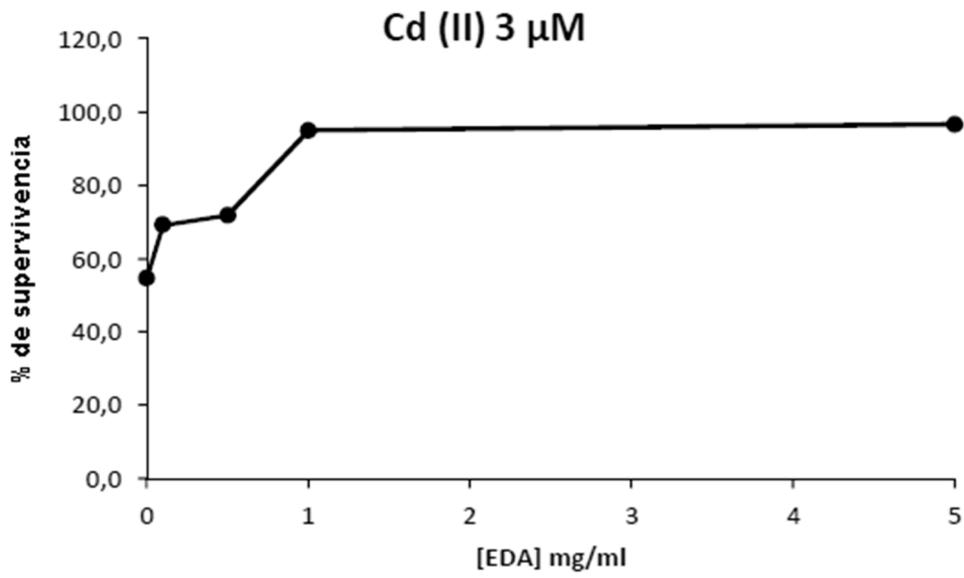


Fig. 8

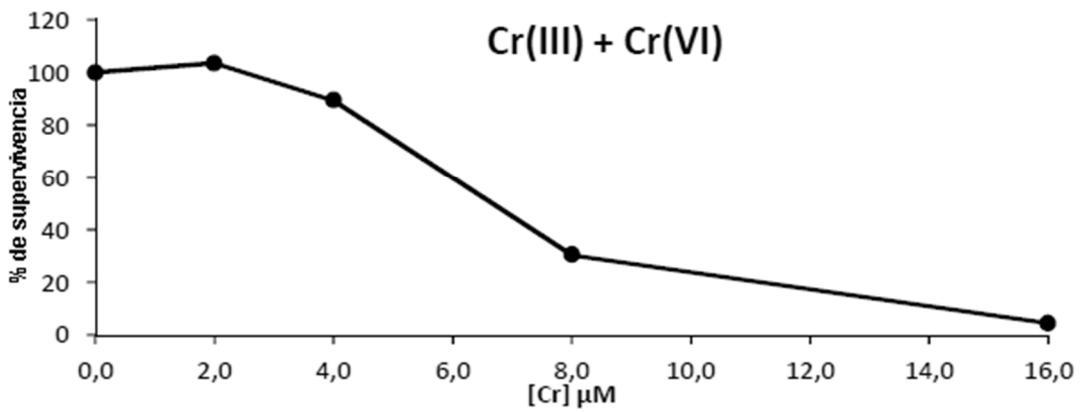


Fig. 9