

Kloepper *et al.* han demostrado que los efectos de crecimiento mediados por integrina son inducidos por proteínas ECM generadas localmente como fibronectina y tenascina-C [6]. En consecuencia, examinamos la expresión de fibronectina, la cual es una glicoproteína ubicada en la membrana basal de la ORS y en el CTS del HF (Fig. 6 A-C). El CCE y la referencia de Minoxidil presentan un nivel de expresión similar de esta proteína de anclaje que el control del HF analizado inmediatamente después de la micro-dissección (Figura 6 D). Este resultado puede explicar el aumento de los queratinocitos proliferativos observados en la ORS (Fig. 4 C).

A	B	C	D
[Imagen]	[Imagen]	[Imagen]	[Gráfica]

Figura 6: Efecto del CCE en la expresión de fibronectina después de 2 días de tratamiento. Se aplicó Minoxidil a $1\mu\text{M}$. Teñido de fibronectina (verde) del HF inmediatamente después de la micro-dissección (A), HF tratado con el vehículo (B) y HF tratado con el CCE 1% (C). El contra-teñido se realizó con DAPI (núcleos azules). (D) Análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de la fibronectina.

El aumento de ambos receptores (integrina $\beta 1$) y su ligando fibronectina por el CCE sugiere fuertemente que el extracto estimuló la vía de señalización de la integrina $\beta 1$. Entonces, la estimulación de la señalización mediada por integrina $\beta 1$ promueve el crecimiento del cabello, probablemente al prolongar la duración del anágeno [6]. Los efectos del CCE están en línea con estos resultados. Además, el mantenimiento de la expresión de fibronectina en el tejido conectivo más externo (CTS) puede favorecer el anclaje del HF en la dermis.

3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE EXTRACTO DE CHONDRUS CRISPUS RESPONSABLES DEL CRECIMIENTO DEL CABELLO

La acumulación de metabolitos fue inducida por la exposición prolongada del alga a baja temperatura, y baja iluminación. En estas condiciones, el alga acumuló altas cantidades de aminoácidos ricos en nitrógeno como la arginina, citrulina o gigartinina, en forma libre o combinados en dipéptidos. El dipéptido Citrulinil-arginina fue identificado como la forma principal de almacenamiento de nitrógeno en el alga [7]. También encontramos que el alga estaba acumulando altas cantidades de osmolitos, como polioles y taurina [8].

Teniendo en cuenta que la arginina y la citrulina son precursoras de las poliaminas, que son indispensables para la proliferación celular [9], y que la taurina citoprotectora aminoácido se reportó como mejorador el crecimiento del HF [10], evaluamos el efecto de la taurina y una citrulinil-arginina sintética en nuestro modelo. Las concentraciones fueron comparables a los ensayos anteriores con el CCE (Fig. 2). En estas concentraciones tanto la taurina como la citrulinil-arginina podrían aumentar el alargamiento del HF (Fig. 7), confirmando que estos dos metabolitos son importantes contribuyentes al efecto del extracto de alga en el crecimiento del HF. Está pendiente el análisis inmuno-histológico de los efectos de estos metabolitos.

[Gráfica]

Figura 7: Monitoreo del alargamiento del tallo del cabello de los folículos aislados del cabello humano : Efecto de Minoxidil ($1\mu\text{M}$), Taurina (1 mM) y Citrulinil-arginina ($1,2\text{ mM}$) en la tasa de crecimiento.

CONCLUSIÓN

1. Hemos demostrado que el CCE mejora y prolonga el crecimiento del folículo piloso humano *ex vivo*.

2. Hemos demostrado que esta mejora se basa en la prolongación de la fase de anágeno, que disminuye durante el envejecimiento, por lo tanto, el extracto de alga puede limitar las alteraciones asociadas a la edad del cabello.
3. El mantenimiento de las células proliferativas en la matriz capilar estimulando la vía de señalización de las integrinas $\beta 1$ está participando en la mejora de la duración del anágeno.
4. El extracto de alga también favorece el anclaje de las células epiteliales a la mesénquima adyacente limitando la disminución del ligando de integrina $\beta 1$ (fibronectina).
5. Se proporciona la primera evidencia para explicar la eficiencia de este extracto específico de alga para promover el crecimiento del cabello o luchar contra la pérdida de cabello, ya que este extracto es rico en aminoácidos que contienen nitrógeno y osmolitos descritos como beneficiosos para la homeostasis del cabello.

REFERENCIAS

- [1]. Botchkarev V.A. y Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling (2003) J. Invest. Dermatol. Symp. Proceed. 8 (1), 46-55
- [2]. Kwack M.H., Kang B.M., Kim M.K., Kim J.C., Sung Y.K. Minoxidil activates β -catenin pathway in human dermal papilla cells: a possible explanation for its anagen prolongation effect. (2011) J. Dermatol. Sci. 62, 154-159
- [3]. Philpott M.P., Sanders D., Westgate D., Kealey T. Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle. (1994) J. Derm. Sci. 7, S55-S72
- [4]. Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., Fassler R. Integrins in invasive growth (2002) J Clin Invest, 109, 999-1006.
- [5]. Kreis T., Vale R. Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins, Oxford University Press, 1999
- [6]. Kloepper J.E., Hendrix S., Bodo E., Tiede S., Humphries M.J., Philpott M.P., Fässler R., Paus R. Functional role of $\beta 1$ integrin-mediated signalling in the human hair follicle (2008) Exp. Cell Res. 314, 498-508
- [7]. Laycock, M.V., Craigie, J.S. The occurrence and seasonal variation of gigartinine and L-citrullinyl-L-arginine in Chondrus crispus stackh (1976), Can. J. Biochem. 55, 27-30
- [8]. J.-F. Nicolay, M. Fréchet "Red alga extract improves barrier recovery" (2013) Personal Care, November, 37-40
- [9]. Ramot Y., Pietilä M., Giuliani G., Rinaldi F., Alhonen L. and Paus R. Polyamines and hair: a couple in search of perfection (2010) Exp. Dermatol. 19, 784-790
- [10]. Collin C., Gautier B., Gaillard O., Hallegot P., Chabane S., Bastien P., Peyron M., Bouleau, M., Thibaut S., Pruche F., Duranton A., and Bernard B.A. Protective effects of taurine on human hair follicle growth in vitro (2006) Int. J. Cosmet. Sci., 28, 289-298

Notaria
30 Treinta

Notaria Treinta de Bogotá

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO

Ante la Notaria Treinta del Circulo de Bogotá D.C.

Compareció:

MARIN HERNANDEZ CLAUDIA MARITZA

quien exhibió: C.C. 52339204

y declaró que la firma que aparece en el presente documento es la suya y que el contenido del mismo es cierto.



Verifique estos datos en www.notariaentrelinea.com

KIMHXFUT4WZP6NYN7

CESAR AUGUSTO ROJAS
(E) BOGOTA D.C.

NOTARIO 30

FIRMA

Bujounm7uun

Bogotá D.C. 30/12/2020

a las 9:02:23 a.m.

REPUBLICA DE COLOMBIA

NOTARIA TREINTA BOGOTÁ D.C.

NOTARIO (E)

CESAR AUGUSTO ROJAS

CM

Claudia M. Marín

Traductor e Intérprete Oficial

Inglés - Español / Español - Inglés

Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

COLOMBIA

BOGOTÁ D.C.

(E)

USTO ROJAS

STIMULATION AND PROTECTION OF HUMAN HAIR FOLLICLE GROWTH WITH AN ALGA EXTRACT RICH IN POLYAMINE PRECURSORS AND TAURINE

M. Fréchet¹, P.-G. Markioli², L. Valent², J.-P. Bliaux², J.-F. Nicolay¹

¹ Exsymol S.A.M., 4 Avenue Albert II, Monaco, Principality of Monaco

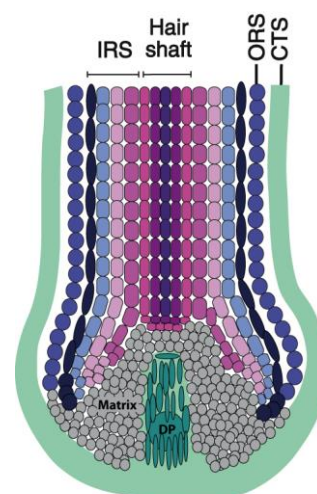
² Sedifa Laboratoire, 4 Avenue Albert II, Monaco, Principality of Monaco

INTRODUCTION

The hair follicle (HF) is a mini-organ that cyclically switches between growth (anagen), regression (catagen) and relative quiescence (telogen). In each cycle, a new hair shaft is formed and the old hair is eventually shed. The key prerequisite for hair follicle development is the molecular communication between the epithelium and the underlying mesenchyme. The dermal compartment of the HF containing fibroblasts consists of the dermal papilla and dermal sheath separated from the epithelial compartment where resides the keratinocytes (hair matrix and the outer root sheath) by a basement membrane (Scheme of HF). They are believed to regulate hair growth and regression cooperatively by a distinct set of molecular signals that are unique for each phase of the hair cycle [1].

Massive hair loss resulting in alopecia is mainly related to androgenetic pathways, but hair loss is also associated with aging, stress or hormonal unbalance. Both present a common decline in anagen duration resulting in follicular regression. It was reported that anagen phase prolongation, e.g. delaying anagen to catagen transition, might limit changes such as hair thinning or male baldness development. For instance, Minoxidil that is the most widely used drug for the treatment of androgenetic alopecia, promotes elongation of the hair shaft by extending the anagen phase. Its action relies on the activation of signalling pathways in dermal papilla cells that consequently stimulates surrounding epithelial cells [2]. In addition, detachment of the dermal papilla from the hair follicle epithelium disrupts the essential interaction between hair follicle proliferative cells (stem cells) and the inductive HF mesenchyme. Hair shaft anchorage to the dermal skin compartment is also an important parameter to warrant a correct dynamic cycling and of course follicle survival.

HF cycling is a rather autonomous phenomenon that is able to continue even in isolated hair follicles. We have thus used organ cultures of human HF, one of the best currently available test system for hair metabolism study, to evaluate the effects of a specific alga extract on hair growth (elongation rate, histology) and anagen – catagen transition (histology). This specific extract was obtained from an alga (*Chondrus crispus*) exposed to particular cultivation conditions inducing accumulation of metabolites with both HF growth stimulating properties (polyamines precursors), and cytoprotective properties (antioxidants, osmolytes). Some of these metabolites were isolated and tested.



Scheme of HF.

IRS: inner root sheath,
ORS: outer root sheath,
CTS: connective tissue sheath,
DP: dermal papilla

MATERIALS AND METHODS

Anagen hair follicle isolation: temporal scalp HF from females undergoing face-lift surgery were micro-dissected from surrounding tissue according to the Philpott procedure [3]. Anagen HF were selected by morphological analysis, and transferred into culture plates containing William's E media supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 0.1% insulin, 0.02% hydrocortisone and 1% L-Glutamine at 37°C.

Hair shaft elongation assay: HF were cultivated in William's E media over a period of 10 days. Hair shaft elongation was measured every two days. Test products were added in HF medium at the start of the culture and changed every two days. The positive controls for hair growth were Minoxidil, Taurine and Citrullinyl-arginine. Human hair follicles with growth rate below 20% were not included in the study. Growth curves present the mean elongation from three to six different HF. Photographs were taken to measure and to illustrate hair elongation.

Immunohistochemistry and immunofluorescence: for morphological studies, HF were grown in William's E medium over a period of 2 days, HF longitudinal cryocuts were stained with haematoxylin-eosin (H&E) or Fontana-Masson (assessment of melanin content). Ki67 (anti-Ki67, clone MIB-1, Dako), Fibronectin (anti human fibronectin antibody, Abcam), β 1 integrin (anti human β 1 integrin antibody, Santa-Cruz) and DAPI (RotiMount, Roth) immunostaining were carried out and analysed.

RESULTS

1. MORPHOMETRIC MONITORING OF HF GROWTH

One convenient parameter is hair fibre elongation rate, which can be monitored over a relatively long period of time (Figure 1A). Several pharmacological agents provide good references, positive (anagen promoters) or negative (catagen promoters), to evaluate the interest of test compounds. We have used Minoxidil as a positive reference for hair growth stimulation. A representative growth curve is reported in Figure 1B.

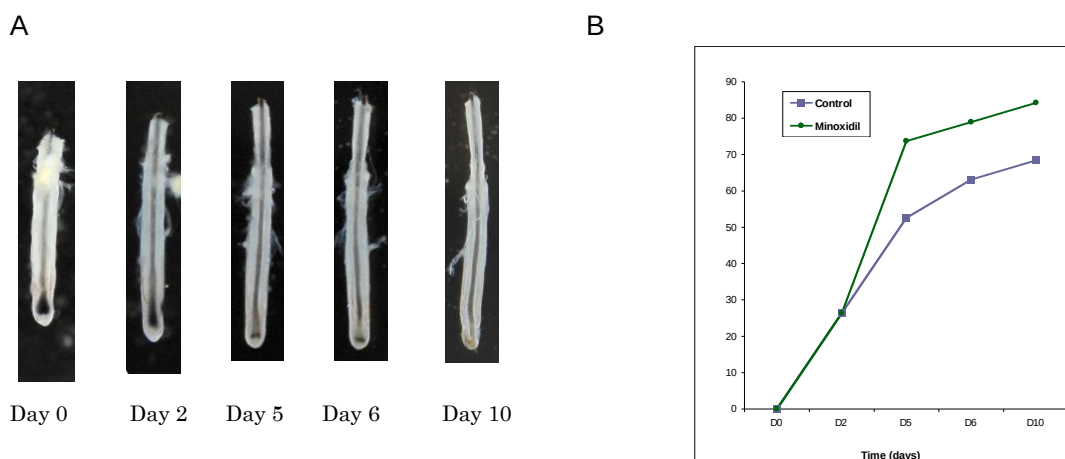


Figure 1: Monitoring of hair shaft elongation of isolated human hair follicles **A)** Morphometric monitoring over a 10 days cultivation period of time **B)** Effect of the positive reference Minoxidil (1 µM) on growth rate.

Chondrus Crispus extract increases hair shaft elongation in the model of isolated human scalp HF in culture

Addition of the Chondrus Crispus alga extract (CCE) to the organ culture of human scalp HFs over a period of 10 days, dose-dependently increased hair shaft elongation (Fig. 2). In the representative assay describe below, CCE highest concentration (3%) was as effective as Minoxidil.

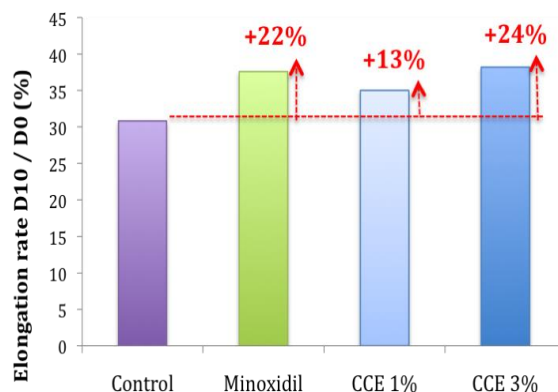


Figure 2: Effect of CCE extract on hair shaft elongation after 10 days of treatment. Minoxidil was applied at 1 μ M. Mean values obtained from 6 bulbs.

Chondrus Crispus extract inhibits spontaneous HF regression (catagen)

HF regression (entrance in catagen) *ex vivo* is accelerated by the absence of physiological microenvironment and vascularisation. Qualitative morphological analysis of histological staining and DAPI staining of HF after 2 days of culture shows that they present some catagen characteristics: thinner hair matrix, oval dermal papilla, reduced melanin content ... These parameters were scored in order to assess the ability of CCE to protect and maintain the HF in anagen phase (Fig. 3).

All HFs treated with CCE 1% and the reference Minoxidil were still in anagen phase while a majority of control HFs presented some early catagen criteria. Indeed, CCE-treated HFs had an onion-shaped dermal papilla with still a large volume and lots of dermal papilla cells while a part of vehicle-treated HFs had an oval-shaped dermal papilla with a thinner volume and less dermal papilla cells (see Fig. 4, 5 and 6 A-B-C).

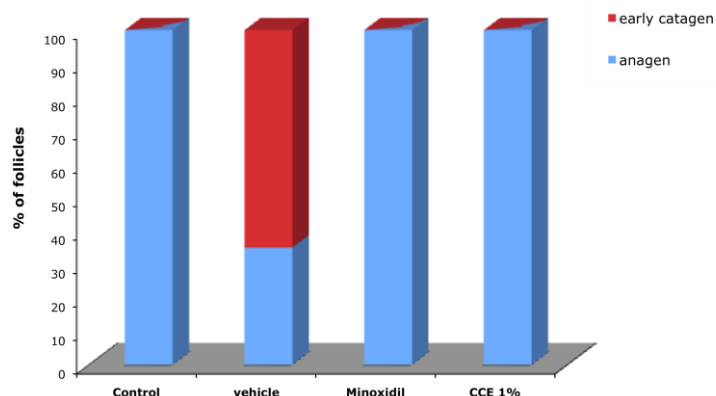


Figure 3: Effect of CCE on the percentage of HFs presenting criteria of anagen or early catagen after 2 days of culture.

2. HISTO-IMMUNOLOGICAL STUDY

Chondrus Crispus extract maintains human hair matrix proliferation

As shown above, CCE increases *ex vivo* hair shaft elongation thus prolonging the growing phase of the anagen phase (Fig. 2, Fig. 3). Therefore, proliferation of hair matrix keratinocytes involved in HF regeneration has been studied by analyzing the Ki67 positive nuclei located below the Auber's line. The number of proliferative cells was decreased in HF after 2 days of growth in culture conditions (Fig. 4 A-B). We observed that the reference molecule Minoxidil presents more Ki67 positive cells compared to control (day 2). In addition, both concentrations of CCE also limited the decrease of proliferation in the hair matrix area. We can notice that the lowest concentration of CCE was more efficient than Minoxidil (Fig. 4D).

Besides, we noticed an increase of Ki67 positive cells in the outer root sheath (ORS) by the algal extract, suggesting that the extract acted not only on HF matrix keratinocytes but also on HF sheath keratinocytes.

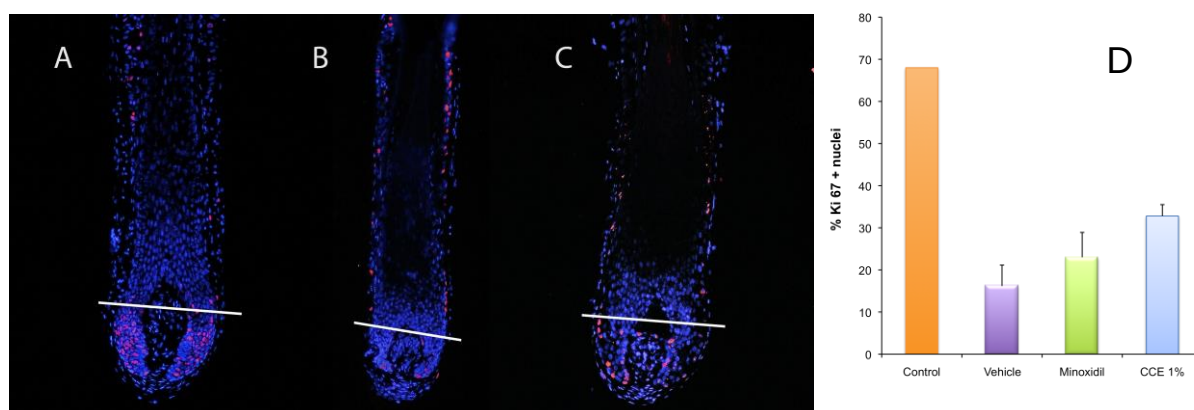


Figure 4: Effect of CCE on hair matrix keratinocytes proliferation after 2 days of treatment. Minoxidil was applied at 1 μ M. Ki67 staining (red nuclei) of HF immediately after micro-dissection (control) (A), HF treated with the vehicle (B) and HF treated with CCE 1% (C). Counterstaining was performed with DAPI (blue nuclei). White line assigns the Auber's line. (D) Quantitative analysis of Ki67 immunoreactivity.

Ki67 staining and some morphological evidences suggest that CCE could delay anagen to catagen transition.

Chondrus Crispus Extract stimulates β 1 integrin signalling pathway

β 1 integrins are transmembrane adhesion proteins that convey critical topobiological information and exert crucial signalling function. The interaction of β 1 integrins receptors with specific ligands activates intracellular signalling pathways associated with cell growth and survival [4,5]. As described in the literature, β 1 integrin is expressed by keratinocytes of the hair matrix and by the basal layer keratinocytes of the ORS insuring the link with the basement membrane that separates from the CTS (Fig. 5). In addition, β 1 integrins is also present in fibroblasts of the surrounding connective sheaths as observed by a staining of the CTS and DP (Fig. 5).

β 1 integrins expression (green staining) was maintained by the different treatments after 2 days of culture compared to vehicle condition. β 1 integrins expression in Minoxidil-treated HF was similar to

control HF and CCE treatments were also very efficient to limit $\beta 1$ integrin decrease in the different epithelial and mesenchymal layers.

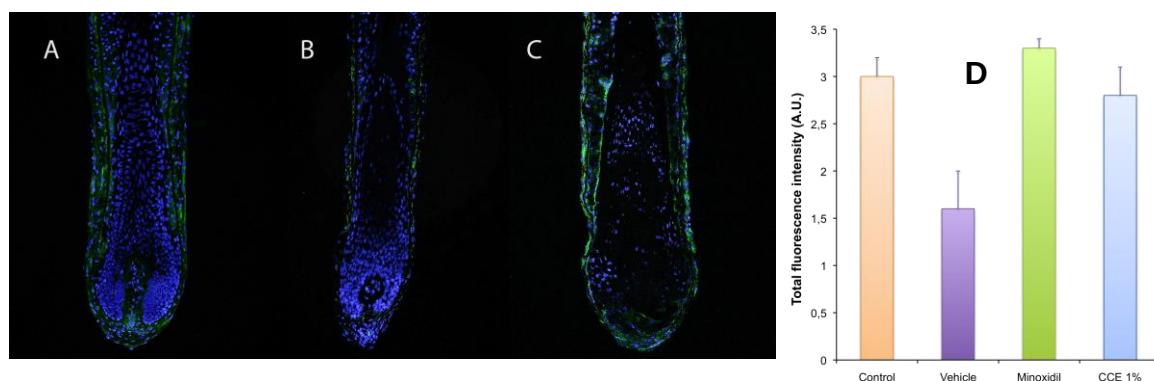


Figure 5: Effect of CCE on the expression of $\beta 1$ integrins after 2 days of treatment. Minoxidil was applied at $1\mu\text{M}$. $\beta 1$ integrins staining (green) of HF immediately after micro-dissection (control) (A), HF treated with the vehicle (B) and HF treated with CCE 1% (C). Counterstaining was performed with DAPI (blue nuclei). (D) Quantitative analysis of $\beta 1$ integrins immunoreactivity.

Kloepper *et al.* have shown that integrin-mediated growth effects are induced by locally generated ECM proteins as fibronectin and tenascin-C [6]. Accordingly, we examined the expression of fibronectin, which is a glycoprotein located in the basement membrane of the ORS and in the CTS of the HF (Fig. 6 A-C). CCE and the reference Minoxidil present similar level of expression of this anchoring protein than control HF analysed immediately after micro-dissection (Figure 6 D). This result may explain the increase of proliferative keratinocytes observed in the ORS (Fig. 4 C).

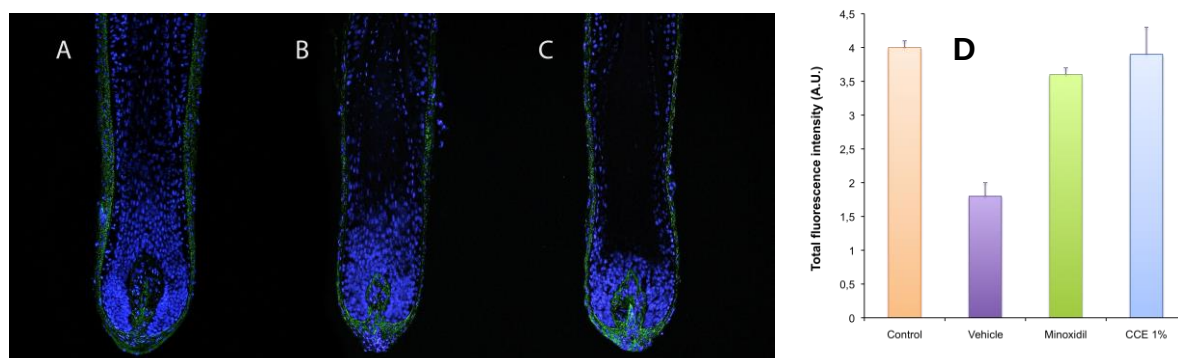


Figure 6: Effect of CCE on the expression of fibronectin after 2 days of treatment. Minoxidil was applied at $1\mu\text{M}$. Fibronectin staining (green) of HF immediately after micro-dissection (A), HF treated with the vehicle (B) and HF treated with CCE 1% (C). Counterstaining was performed with DAPI (blue nuclei). (D) Quantitative analysis of fibronectin immunoreactivity.

Increase of both receptor ($\beta 1$ integrin) and its ligand fibronectin by CCE strongly suggests that the extract stimulated $\beta 1$ integrins signaling pathway. Then, stimulation of $\beta 1$ integrin-mediated signaling promotes hair growth, likely by prolonging the duration of anagen [6]. CCE's effects are in line with these results. In addition, fibronectin expression maintenance in the outermost connective tissue (CTS) may favour HF anchoring in the dermis.

3. IDENTIFICATION OF CHONDRUS CRISPUS EXTRACT METABOLITES RESPONSIBLE FOR HAIR GROWTH

Metabolites accumulation was induced by prolonged exposure of the alga to low temperature, and low illumination. In these conditions, the alga accumulated high amounts of nitrogen-rich aminoacids such as arginine, citrulline or gigartinine, in the free form or combined into dipeptides. The dipeptide Citrullinyl-arginine was identified as the major nitrogen storage form in the alga [7]. We also found that the alga was accumulating high amounts of osmolytes, such as polyols and taurine [8].

Considering that arginine and citrulline are precursor of polyamines, which are indispensable for cellular proliferation [9], and that the cytoprotective aminoacid taurine was reported to improve HF growth [10], we evaluated the effect of taurine and a synthetic citrullinyl-arginine in our model. Concentrations were comparable to previous assays with CCE (Fig. 2). At these concentrations both taurine and Citrullinyl-arginine could increase HF elongation (Fig. 7), confirming that these two metabolites are important contributors to the alga extract effect on HF growth. Immuno-histological analysis of the effects of these metabolites is pending.

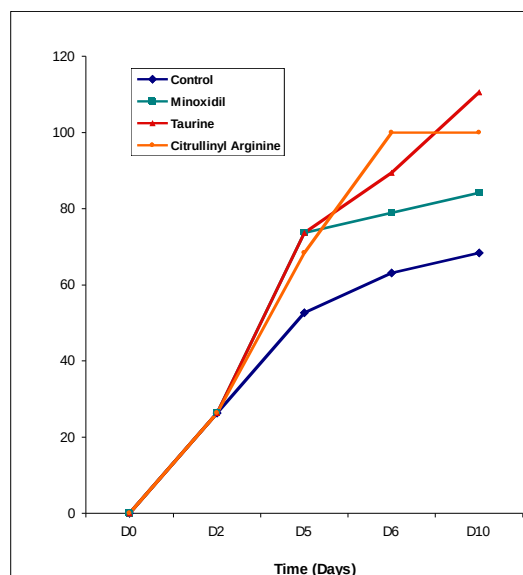


Figure 7: Monitoring of hair shaft elongation of isolated human hair follicles : Effect of Minoxidil (1 μ M), Taurine (1 mM) and Citrullinyl arginine (1.2 mM) on growth rate.

CONCLUSION

1. We have shown that CCE improves and prolongs the growth of human hair follicle *ex vivo*.
2. We have shown that this improvement relies on the prolongation of anagen phase, which decreases during aging, hence the alga extract may limit aged-associated alterations of hair.
3. Maintenance of proliferative cells in the hair matrix by stimulating the β 1 integrins signalling pathway is participating to the improvement of anagen duration.
4. The alga extract also favours the anchoring of epithelial cells to the adjacent mesenchyme by limiting β 1 integrin ligand (fibronectin) decrease.
5. First evidence is provided to explain the efficiency of this specific alga extract to promote hair growth or fight against hair loss as this extract is rich in nitrogen-containing aminoacids and osmolytes described as beneficial for hair homeostasis.

REFERENCES

- [1]. Botchkarev V.A. and Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling (2003) J. Invest. Dermatol. Symp. Proceed. 8 (1), 46-55
- [2]. Kwack M.H., Kang B.M., Kim M.K., Kim J.C., Sung Y.K. Minoxidil activates β -catenin pathway in human dermal papilla cells: a possible explanation for its anagen prolongation effect. (2011) J. Dermatol. Sci. 62, 154-159
- [3]. Philpott M.P., Sanders D., Westgate D., Kealey T. Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle. (1994) J. Derm. Sci. 7, S55-S72
- [4]. Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., Fassler R. Integrins in invasive growth (2002) J Clin Invest, 109, 999-1006.
- [5]. Kreis T., Vale R. Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins, Oxford University Press, 1999
- [6]. Kloepper J.E., Hendrix S., Bodo E., Tiede S., Humphries M.J., Philpott M.P., Fässler R., Paus R. Functional role of β 1 integrin-mediated signalling in the human hair follicle (2008) Exp. Cell Res. 314, 498-508
- [7]. Laycock, M.V., Craigie, J.S. The occurrence and seasonal variation of gigartinine and L-citrullinyl-L-arginine in *Chondrus crispus* stackh (1976), Can. J. Biochem. 55, 27-30
- [8]. J.-F. Nicolaÿ, M. Fréchet "Red alga extract improves barrier recovery" (2013) *Personal Care*, November, 37-40
- [9]. Ramot Y., Pietilä M., Giuliani G., Rinaldi F., Alhonen L. and Paus R. Polyamines and hair: a couple in search of perfection (2010) Exp. Dermatol. 19, 784-790
- [10]. Collin C., Gautier B., Gaillard O., Hallegot P., Chabane S., Bastien P., Peyron M., Bouleau, M., Thibaut S., Pruche F., Duranton A., and Bernard B.A. Protective effects of taurine on human hair follicle growth in vitro (2006) Int. J. Cosmet. Sci., 28, 289-298

[Logotipo]

Girona 34, 5 - 6
08402 Granollers (Barcelona) España
Tel. +34 93 860 45 00 - Fax +34 93 870 74 62
e-mail: textron@plimon.com - www.plimon.com

ACEITE DE GERMEN DE TRIGO

HOJA DE INFORMACIÓN DE PRODUCTO

[Fotografía]

EL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO se extrae del germen del grano de trigo, el cual representa únicamente de 2 a 3% del peso del grano. Se trata de un Aceite Vegetal Refinado que contiene un alto nivel de vitamina E natural la cual es un antioxidante natural, y altos niveles de fracción insaponificable. Su composición de ácido graso provee un alto contenido de ácido graso esencial el cual promueve la regeneración de células. El aceite de germen de trigo es particularmente alto en octaonasol, un alcohol primario saturado de cadena lineal que se encuentra en diferentes ceras vegetales. El Octaonasol se ha estudiado como un agente mejorador de desempeño de ejercicio físico.

EL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO ofrece facilidad para su esparcimiento, gran penetración y retención de humedad considerable, combinado con sus altas propiedades de nutrición.

INFORMACIÓN TÉCNICA

Apariencia:	Líquido aceitoso amarillo pálido, con olor mínimo tipo grano.
Índice de Acidez:	≤ 1.00
Valor Peróxido:	≤ 10.00
Gravedad Específica:	0.90 - 0.93 g/ml
Tocoferol Natural:	A solicitud

Ácido Graso	Composición
Ácido palmítico	9 - 18 %
Ácido Oleico	14 - 28 %
Ácido Linoleico	50 - 62 %
Ácido Linolénico	2 - 10 %

APLICACIÓN

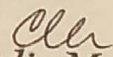
EL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO es un ingrediente ideal que se incorpora fácilmente a todo tipo de cosméticos desde productos de jugar hasta productos de dejar. Siendo una gran alternativa para pieles secas y maduras, mantiene la piel suave durante el embarazo. Ideal para el cuidado general del cuerpo y especialmente benéfico para humectar, rejuvenecer y proteger las pieles secas y maduras.

EL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO puede ser aplicado directamente en la piel y el pelo. También puede ser fácilmente incorporado como un ingrediente activo o un transportador ideal en productos de cuidado para la piel y el pelo. La dosis recomendada está entre 3 y 10 %.

EL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO también puede ser utilizado directamente como aceite para masajes.

Actualizado 1/2007
Aprobado: Dra. Blanca Martínez

ACEITE DE GERMEN DE TRIGO


Claudia M. Marin
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



[Logotipo]

Girona 34, 5 – 6
08402 Granollers (Barcelona) España
Tel. +34 93 860 45 00 – Fax +34 93 870 74 62
e-mail: textron@plimon.com – www.plimon.com

ÍNDICE DE ESTABILIDAD DEL ACEITE (OSI *por sus siglas en inglés*)

El Índice de Estabilidad del Aceite (OSI *por sus siglas en inglés*) fue determinado usando un instrumento de Enranciamiento. La rapidez en la oxidación de un aceite depende en el grado de instauración, la presencia de antioxidantes y condiciones de almacenamiento previas. En el análisis de OSI, la tasa de oxidación es lenta hasta que se supera la resistencia a la oxidación. Este tiempo se conoce como el periodo de inducción de oxidación y es una herramienta para determinar la vida útil del aceite.

OSI DEL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO: 15.1 horas (100 °C)

ISO 6886 (1996) Determinación de estabilidad de oxidación en grasas y aceites animales y vegetales Condiciones Cantidad de prueba 2.5 ± 0.01 g Temperatura $100 \text{ °C} \pm 0.2 \text{ °C}$ Flujo de gas 20 L/h Vehículo: 50 mL de agua destilada Tiempo de inducción de Evaluación de Conductividad (método tangente) Azul: determinación a 100 °C Rojo: determinación a 110 °C	[Gráfica]
--	------------------

Nombre INCI (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos – INCI *por sus siglas en inglés*): Triticum Vulgare
Aceite de Germen (Trigo)

NOTARIA 30

Notaría Treinta de Bogotá

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO

Ante la Notaría Treinta del Circulo de Bogotá D.C.
Compareció:

MARIN HERNANDEZ CLAUDIA MARITZA
quien exhibió: C.C. 52339204
y declaró que la firma que aparece en el presente documento es la suya y que el contenido del mismo es cierto.



Verifique estos datos en www.notariaonline.com

WAT22C2M0104U05Y

CESAR AUGUSTO ROJAS NOTARIO 30
(E) BOGOTÁ D.C.

FIRMA
hb66jbtv6tgbtbt

Bogotá D.C. 30/12/2020
a las 9:02:17 a. m.

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA TREINTA
BOGOTÁ D.C.
NOTARIO (E)
CESAR AUGUSTO ROJAS

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



WHEAT GERM OIL

PRODUCT DATA SHEET



WHEAT GERM OIL is extracted from the germ of the Wheat kernel, which makes up only 2-3% by weight of the kernel. It is a Refined Vegetable Oil that contains a high level of natural vitamin E which is a natural antioxidant, and high levels of unsaponifiable fraction. Its fatty acid composition supplies a high content of essential fatty acid that promotes the

regeneration of cells. Wheat germ oil is particularly high in octacosanol - a long-chain saturated primary alcohol found in a number of different vegetable waxes. Octacosanol has been studied as an exercise and physical performance enhancing agent

WHEAT GERM OIL offers ease of spreading, great penetration and significant moisture retention combined with its high nourishing properties.

TECHNICAL DATA

Appearance:	Pale yellow oily liquid, with minimum grain-like odour
Acidity index:	≤ 1.00
Peroxide value:	≤ 10.0
Specific gravity:	0.90 – 0.93 g/ml
Natural Tocopherol:	upon request

Fatty Acid	Composition
Palmitic acid	9-18 %
Oleic acid	14-28 %
Linoleic acid	50-62 %
Linolenic acid	2-10 %

APPLICATION

WHEAT GERM OIL is an ideal ingredient that is easily incorporated in all kinds of cosmetics from rinse-off to leave-on products. A great choice for dry, mature skin, keeps skin supple during pregnancy. Ideal for overall body care, and especially beneficial for moisturizing, rejuvenating and protecting dry and mature skin.

WHEAT GERM OIL may be applied directly to the skin and hair. It may also be easily incorporated as an active ingredient or an ideal carrier in skin and hair care products. Recommended dosage is between 3 to 10 %.

WHEAT GERM OIL can also be used directly as massage oil.

OIL STABILITY INDEX (OSI)

The Oil Stability Index (OSI) was determined using a Rancimat instrument. The rapidity of oxidation of an oil depends on the degree of unsaturation, the presence of antioxidants, and prior storage conditions. In the OSI analysis, the rate of oxidation is slow until resistance to oxidation is overcome. This time is known as the oxidation induction period and it is a tool to determine the useful life of the oil.

WHEAT GERM OIL OSI: 15.1 hours (100 °C)

ISO 6886 (1996)

Animal and vegetable fats and oils
 Determination of oxidation stability

Conditions

Sample amount 2.5 ± 0.01 g

Temperature $100^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$

Gas flow 20 L/h

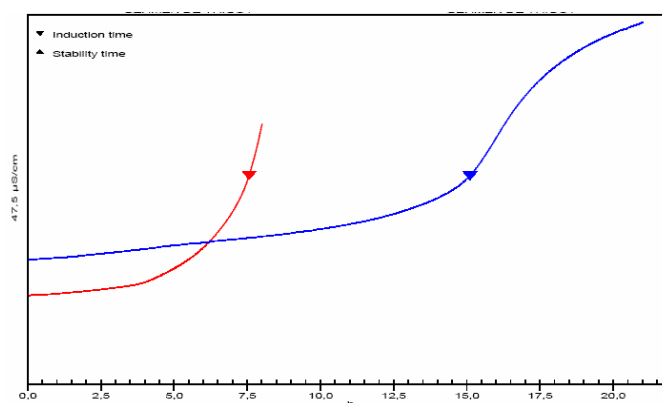
Vessel: 50 mL distilled water

Evaluation Conductivity

Induction time (tangent method)

Blue: determination at 100 °C

Red: determination at 110 °C



INCI Name: Triticum Vulgare (Wheat) Germ Oil

Test item

M.DUBIA,T.LEPIDOTA AND P.BOGOTENSIS BLEND

Activity study of a test item on healing of human fibroblast culture mono-layer

FINAL REPORT

❖ Study Director	: Frédéric NUNZI
❖ Study #	: 6.38-22864-ID-14/03867
❖ Date	: 30/06/2014

Sponsor

**NATURAL EXTRACTS &
BIODIVERSITY ENVIRONMENTAL
RESPONSABILITY**
Carrera 67 No
67A-62 BOGOTA
Colombie

Test facility

IDEA Lab
Technopôle Montesquieu
5, rue Jacques Monod
CS 60077
33652 MARTILLAC CEDEX
France

CONTENTS

1. Study objective	3
2. Test item.....	3
3. Study principle	3
4. Study course	3
5. Results	4
6. Conclusion	5
7. Archive.....	6
Annex 1	7

1. Study objective

At the sponsor's request, we have evaluated, by an in vitro test, the effect of a test item on healing of human fibroblast culture mono-layer.

2. Test item

Name	: M.DUBIA,T.LEPIDOTA AND P.BOGOTENSIS BLEND
IDEA code	: ID-14/03867
Batch number	: 240114
Aspect	: liquid
Color	: Brown
Storage conditions	: Keep away from light + room temperature
Test item nature	: Cosmetic ingredient
Expiry date*	: 29/10/2015

* If the expiry date was not precisely provided by the Sponsor (> X months), this one will be arbitrarily defined by us as the day corresponding to X months as from the date of manufacture.

Information linked to the identification, purity and stability of the test item are under the responsibility of the sponsor of the study. The technical data sheet of the test item was provided by the sponsor of the study.

3. Study principle

The aim of this study is to assess the test item effect on the cells migration in a wound made by scraping a fibroblasts mono-layer. The cells migration is considered as a marker of a cicatrisation effect of the studied test item.

4. Study course

Schedule of study

The experimentation was carried out from 10/06/2014 to 27/06/2014.

Test system

Cells used are fibroblasts from human skin tissue (child male, Caucasian), at passage 6.

Reference items

The following controls are included in each analyze:

- Negative control: complete medium with FCS 1 %
- Positive control: complete medium with FCS 20 %

Series definition

Three non-cytotoxic concentrations of the test item are tested on three culture wells.

In the study the concentrations tested, chosen according to the preliminary cytotoxicity study (cf annex 1) were 2 %, 1 % and 0.5%.

The reference items are also tested in triplicate.

Protocol

Contact of the studied test item with cells and cellular migration study

Cells are inoculated at 40 000 cells/cm². After 48 hours of culture (37°C, 5 % CO₂), a 1 mm wide scratch is made with a sterile pipette tip and the 3 concentrations of the test item, as well as the positive and negative control, are placed in contact with the cells. Cultures plates are incubated (37°C, 5 % CO₂) 24 hours.

After 24 hours at 37°C, % CO₂, the wounds are observed with inverted microscope.

Cells having migrated into the wounds are counted on 1 cm length.

Results calculation and interpretation

The test item healing activity is expressed as a percentage as follow:

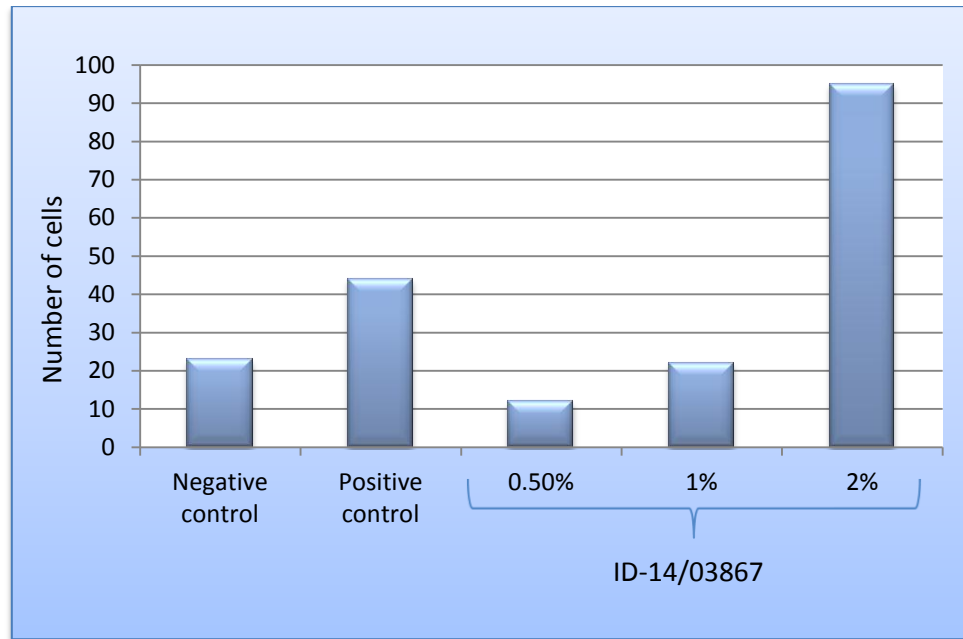
$$\text{Activity \%} = \frac{\text{N Cells}_{\text{test item}} - \text{N Cells}_{\text{negative control}}}{\text{N Cells}_{\text{negative control}}} \times 100$$

5. Results

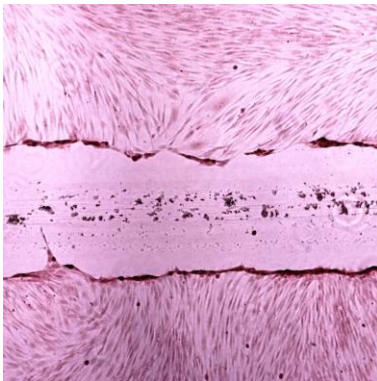
Table :

		Cells having migrated in the wound (L =1cm)		Activity / Negative control
		N	Mean Standard deviation	
Negative control	Wells 1	17	23 5	-
	Wells 2	28		
	Wells 3	23		
Positive control (CULTURE MEDIUM 20% FCS)	Wells 1	43	44 28	95%
	Wells 2	73		
	Wells 3	17		
ID-14/03867	2 %	Wells 1	99	318%
		Wells 2	68	
		Wells 3	117	
	1 %	Wells 1	22	-5%
		Wells 2	28	
		Wells 3	15	
	0.5 %	Wells 1	9	-48%
		Wells 2	11	
		Wells 3	15	

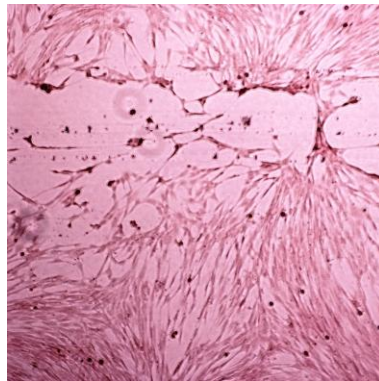
The positive control stimulates to a significant degree the cellular migration and the cicatrisation (+ 95 %). This result validates the model used.



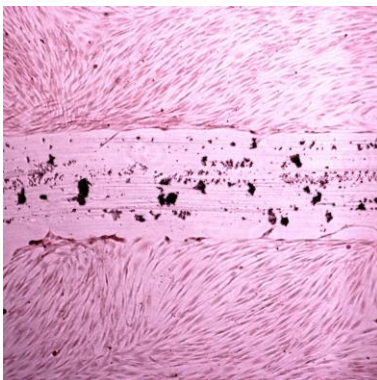
View:



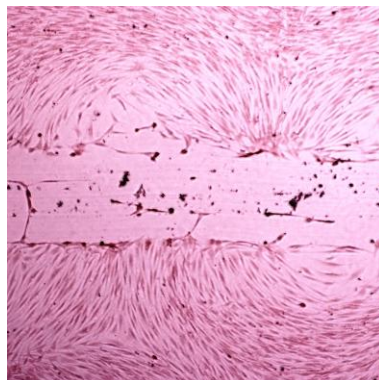
Negative control



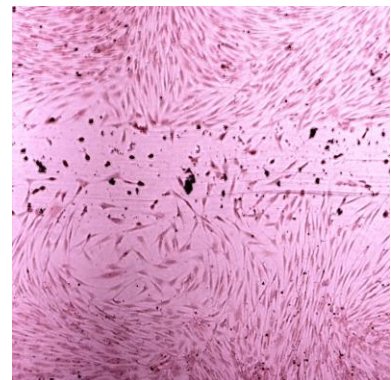
Positive control



ID-14/03867 at 0.5%



ID-14/03867 at 1%



ID-14/03867 at 2%

We can clearly see that cells have migrated into the wound at 2 %.

6. Conclusion

Under the retained experimental conditions, the test item **code ID-14/03867** show the expected effect on the cells migration in a wound performed on fibroblasts mono-layer.

We can observe a clear dose-response curve with a maximal activity at 2% (+318% as compared with the negative control).

At 2%, this activity is also higher than the positive control (i.e. + 114% as compared with the positive control).

7. Archive

The total storage of the study folder is 10 years (report, raw data).

Date:



Frédéric NUNZI
Doctor in Cell Biology / IDEA Lab Manager
2014.07.04 16:01:31 +02'00'
Emis par : CN=ChamberSign France - AC 2 étoiles,
OU=0002 433702479, O=ChamberSign France, C=FR



Frédéric NUNZI

Doctor in cell biology and microbiology

Annex 1:**Preliminary cytotoxicity study**

In a first time, a cytotoxicity effect on primary human fibroblast culture is realized.

After the application of the test item onto cells during 24 hours, the cell viability is quantified by measurement of the living cell succinate dehydrogenase activity. This enzyme is involved in the transformation of MTT (bromure de 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) into blue formazan cristal. A spectrophotometric measurement is performed after the cristal dissolution. The measured absorbances are proportional to the number of alive cells.

Test system

Fibroblasts are prepared and cultured according to the current working instruction.

Cells used are fibroblasts from human skin tissue (child male, Caucasian), at passage 6.

Complete culture medium: DMEM 4.5 g/l glucose, 4 mM L-glutamine or stabilised glutamine, 10 % heat inactivated FCS, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin.

Cells are exempt of mycoplasma. Assessment of mycoplasma is performed according to the internal procedure IL 07.

Reference items

- Negative control: complete culture medium
- Positive control: SDS 0.01 % CAS # 151-21-3

Series definition

Eight dilutions of the test item as well as reference items are tested on 6 wells per concentrations.

Schedule of study

The experimentation was carried out from 10/06/2014 to 12/06/2014.

ProtocolContact of the test item with cells

Cells are inoculated at 30 000 cells/cm². After an overnight culture (37°C, % CO₂), they are incubated with test item and reference item for 24 hours in the culture medium

MTT coloration

The culture media are removed, and after washing with PBS, the cultures are incubated for 2 to 4 hours with a solution of MTT.

After this contact time, the dye solution is remove, the cells are washed and the desorption solution (DMSO) is added. The plate is stirred until complete dissolution of the crystals. The absorbance is measured at 540 nm against blank (desorption solution)

Results calculation and interpretation

The absorbance is measured at 540 nm. Results are express in mortality percentage compared to negative control:

$$\text{mortality \%} = \frac{\text{Abs}_{\text{negative control}} - \text{Abs}_{\text{test item}}}{\text{Abs}_{\text{negative control}}} \times 100$$

Results

Experimentation from 10/06/2014 to 12/06/2014

		UA MTT (N=6) <i>standard deviation</i>	Death rate %
		Contact 24h	
ID-14/03867	Negative control :	1.890 <i>0.087</i>	0
	Positive control : SDS 0.01 % w/v	0.646 <i>0.027</i>	66
	1 %	1.393 <i>0.177</i>	26
	0.5 %	1.671 <i>0.033</i>	12
	0.25 %	1.792 <i>0.041</i>	5
	0.125 %	1.789 <i>0.040</i>	5
	0.0625 %	1.862 <i>0.066</i>	2
	0.03215 %	1.830 <i>0.076</i>	3
	0.015625 %	1.864 <i>0.063</i>	1
	0.007812 %	1.864 <i>0.119</i>	1

The positive control shows mortality higher than 30 %. This validates the test.

The test item ID-14/03867 shows an insignificant cytotoxic effect. We decided to start the test at 2%

Elemento de prueba
MEZCLA M.DUBIA, T.LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS

Estudio de actividad de un elemento de prueba sobre la curación de una monocapa de cultivo de fibroblastos humanos

INFORME FINAL

Director del Estudio: Frédéric NUNZI
 Estudio No.: 6.38-22864-ID-14/03867
 Fecha: 30/06/2014

Patrocinador

Facilidad de Pruebas

EXTRACTOS NATURALES & BIODIVERSIDAD - RESPONSABILIDAD AMBIENTAL Carrera 67 No 67A-62 BOGOTÁ Colombia	Laboratorio IDEA Technopôle Montesquieu 5, rue Jacques Monod CS 60077 33652 MARTILLAC CEDEX Francia
---	--

Groupe IDEA TESTS - IDEA Lab

www.groupeideatests.com – info@groupeideatests.com

SARL au capital de 10 000 € • RCS BORDEAUX 353 989 684 • APE 7120B • TVA FR 66 353 989 684

Site Martillac : Technopôle Montesquieu 5, rue Jacques Monod CS 60077 33652 MARTILLAC CEDEX • Tél. 05 56 64 82 33 • Fax. 05 56 64 82 11

Site Brest : Technopôle Brest-Iroise 90, rue René Descartes 29280 PLOUZANE • Tél. 02 98 05 19 70 • Fax. 02 98 05 09 73


Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2014

Identificación: 6.38-22864-ID-14/03867

CONTENIDO

1. Objetivo del Estudio.....	3
2. Elemento de Prueba	3
3. Principio de Estudio	3
4. Curso de Estudio	3
5. Resultados.....	4
6. Conclusión.....	6
7. Archivo.....	6
Anexo 1.....	8

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

E CO
una
ARIA TR
BOGOTÁ
NOTAR
AUG
11

1. Objetivo del estudio

A petición del patrocinador, hemos evaluado, mediante una prueba in vitro, el efecto de un elemento de prueba en la curación de la monocapa de cultivo de fibroblastos humanos.

2. Elemento de prueba

Nombre: MEZCLA M.DUBIA, T.LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS
Código IDEA: ID-14/03867
Número de lote: 240114
Aspecto : líquido
Color: Café
Condiciones de almacenamiento: Mantener alejado de la luz + temperatura ambiente
Naturaleza del elemento de prueba: Ingrediente cosmético
Fecha de vencimiento*: 29/10/2015

* Si el Patrocinador no proporciona con precisión la fecha de vencimiento (> X meses), dicha fecha se definirá a nuestra discreción como el día correspondiente a X meses a partir de la fecha de fabricación.

La información relacionada con la identificación, pureza y estabilidad del elemento de prueba está bajo la responsabilidad del patrocinador del estudio. La hoja de datos técnicos del elemento de prueba la suministró el patrocinador del estudio.

3. Principio de estudio

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del elemento de prueba sobre la migración de células en una herida realizada al raspar una monocapa de fibroblastos. La migración de las células se considera un marcador de un efecto de cicatrización del elemento de prueba estudiado.

4. Curso de estudio

Cronograma de estudio

La experimentación se llevó a cabo del 10/06/2014 al 27/06/2014.

Sistema de prueba

Las células utilizadas son fibroblastos de tejido cutáneo humano (niño varón, caucásico), en el paso 6.

Artículos de referencia

Los siguientes controles se incluyen en cada análisis:

- Control negativo: medio completo con FCS 1%

Identificación: 6.38-22864-ID-14/03867



CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

- Control positivo: medio completo con FCS 20%

Definición de serie

Se prueban tres concentraciones no citotóxicas del elemento de prueba en tres pocillos de cultivo.

En el estudio, las concentraciones ensayadas, elegidas según el estudio preliminar de citotoxicidad (véase el anexo 1) fueron del 2%, 1% y 0,5%.

Los elementos de referencia también se prueban en triples.

Protocolo

Contacto del elemento de prueba estudiado con células y estudio de migración celular

Las células se inoculan a 40 000 células / cm². Después de 48 horas de cultivo (37°C, 5% CO₂), se hace un raspado de 1 mm de ancho con una punta de pipeta estéril y las 3 concentraciones del elemento de prueba, así como el control positivo y negativo, se ponen en contacto con las células. Las placas de cultivo se incuban (37°C, 5% CO₂)

24 horas.

Después de 24 horas a 37°C, % CO₂, las heridas se observan con microscopio invertido.

Las células que han migrado a las heridas se cuentan con una longitud de 1 cm.

Cálculo e interpretación de resultados

La actividad de curación del elemento de prueba se expresa como un porcentaje de la siguiente manera:

% De actividad = $\frac{\text{células N Elemento de prueba} - \text{N células control negativo}}{\text{Celdas N control negativo}} \times 100$

5. Resultados

Tabla:

		Células que han migrado en la herida. (L = 1 cm)		
		N	Media Desviación estándar	Actividad / Control negativo
Control negativo	Wells 1	17	23 5	-
	Wells 2	28		
	Wells 3	23		
Control positivo (CULTIVO MEDIO 20% FCS)	Wells 1	43		
	Wells 2	73	44	95%
	Wells 3	17	28	

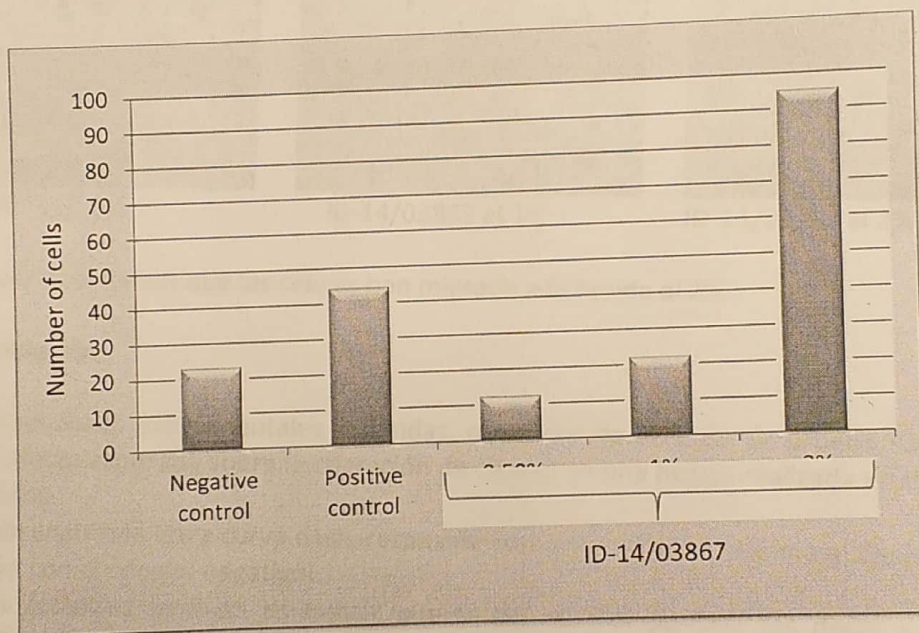
Identificación: 6.38-22864-ID-14/03867

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

ID-14/03867 2%	Wells 1	99	95 25	318%
	Wells 2	68		
	Wells 3	117		
1%	Wells 1	22	22 6	-5%
	Wells 2	28		
	Wells 3	15		
0.5%	Wells 1	9	12 3	-48%
	Wells 2	11		
	Wells 3	15		

El control positivo estimula de forma significativa la migración celular y la cicatrización (+ 95%).
Este resultado valida el modelo utilizado.

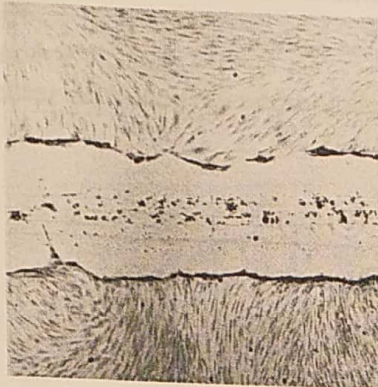
IDEA Lab



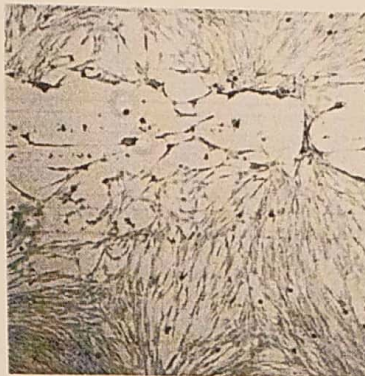
(Número de células - Control negativo - Control positivo)

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

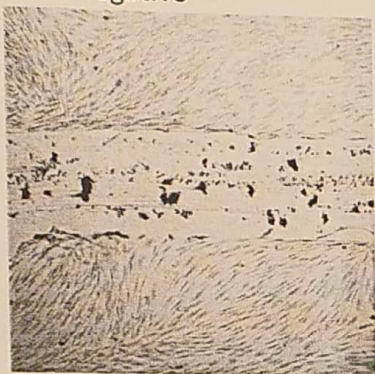
Vista:



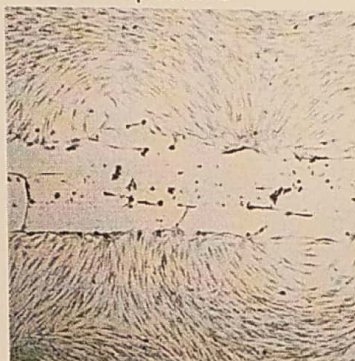
Control negativo



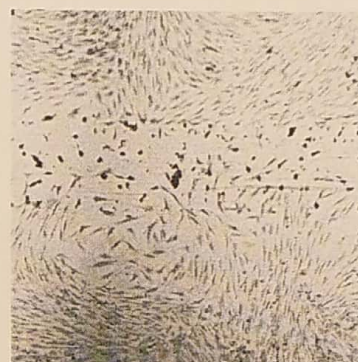
Control positivo



ID-14/03867 al 0,5%



ID-14/03867 al 1%



ID-14/03867 al 2%

Podemos ver claramente que las células han migrado a la herida al 2%.

6. Conclusión

Bajo las condiciones experimentales retenidas, el código de artículo de prueba ID-14/03867 muestra el efecto esperado sobre la migración de células en una herida realizada en monocapas de fibroblastos.

Podemos observar una clara curva dosis-respuesta con una actividad máxima al 2% (+ 318% en comparación con el control negativo).

Al 2%, esta actividad también es mayor que la del control positivo (es decir, + 114% en comparación con el control positivo).

7. Archivo

El almacenamiento total de la carpeta del estudio es de 10 años (informe, datos brutos).

Fecha:

Frédéric NUNZI

Doctor en Biología Celular / Gerente Laboratorio IDEA

2014.07.04 16:01:31 +02'00'

Emis par: CN=ChamberSign France – AC 2 étoiles

ATA
(E)
TO ROTS

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Identificación: 6.38-22864-ID-14/03867

OU=0002 433702479, O=ChamberSign France, C=FR
(Firmado)

Frédéric NUNZI

Doctor en biología y microbiología celular

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Sistema de prueba

Los microorganismos se preparan y cultivan de acuerdo a los procedimientos de métodos actuales. Las células, suspendidas en fisiológicos de cultivo, se incuban en un medio de cultivo en el tubo 2.

Medio de cultivo con leche: ONEM + 5 g/l de glucosa. El pH se ajusta a 7.0 y se esteriliza por autoclave a 121°C por 15 minutos. Se filtra y se esteriliza a 50°C.

Las células se cuentan mediante microscopía de flujo y se suspenden en el medio de cultivo en el tubo 2.

Artículos de referencia

- Células de cultivo: medio de cultivo con leche
- Células de cultivo: SOS de leche CAL # 151-21

Definición de serie

Se preparan cinco diluciones del elemento de prueba. Los elementos de referencia se preparan en el tubo 2.

Cronograma de estudio

La experimentación se llevó a cabo del 10 de mayo de 2014 al 12 de mayo de 2014.

Procedimiento

Conteo del elemento de prueba con microscopía

Las células se inoculan a 10⁶ células/ml. Después de un cultivo de 24 horas a 37°C, el cultivo se incuban con el elemento de prueba y el elemento de referencia durante 24 horas en el medio de cultivo.

Conteo de M.T.



CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

IDEA Lab

Anexo 1:

Estudio preliminar de citotoxicidad

Por primera vez, se realiza un estudio de efecto de citotoxicidad sobre el cultivo primario de fibroblastos humanos.

Después de la aplicación del elemento de prueba en las células durante 24 horas, se cuantifica la viabilidad celular midiendo la actividad succinato deshidrogenasa de las células vivas. Esta enzima participa en la transformación de MTT (bromo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en cristal de formazán azul. Se realiza una medición espectrofotométrica después de la disolución del cristal. Las absorbancias medidas son proporcionales al número de células vivas.

Sistema de prueba

Los fibroblastos se preparan y cultivan de acuerdo con las instrucciones de trabajo actuales.

Las células utilizadas son fibroblastos de tejido cutáneo humano (niño varón, caucásico), en el paso 6.

Medio de cultivo completo: DMEM 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina 4 mM o glutamina estabilizada, FCS inactivado por calor al 10%, penicilina 50 UI/ml, estreptomicina 50 µg/ml.

Las células están exentas de micoplasma. La evaluación del micoplasma se realiza de acuerdo con el procedimiento interno IL 07.

Artículos de referencia

- Control negativo: medio de cultivo completo
- Control positivo: SDS 0.01% CAS # 151-21-3

Definición de serie

Se prueban ocho diluciones del elemento de prueba, así como elementos de referencia, en 6 pocillos por concentración.

Cronograma de estudio

La experimentación se llevó a cabo del 10/06/2014 al 12/06/2014.

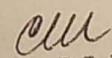
Protocolo

Contacto del elemento de prueba con las células

Las células se inoculan a 30 000 células/cm². Después de un cultivo durante la noche (37°C, % CO₂), se incuban con el elemento de prueba y el elemento de referencia durante 24 horas en el medio de cultivo.

Coloración MTT

Identificación: 6.38-22864-ID-14/03867


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



Se retiran los medios de cultivo y, después de lavar con PBS, los cultivos se incuban durante 2 a 4 horas con una solución de MTT.

Pasado este tiempo de contacto, se retira la solución de tinte, se lavan las células y se agrega la solución de desorción (DMSO). La placa se agita hasta la completa disolución de los cristales. La absorbancia se mide a 540 nm frente al blanco (solución de desorción)

Cálculo e interpretación de resultados

La absorbancia se mide a 540 nm. Los resultados se expresan en porcentaje de mortalidad en comparación con el control negativo:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{Abs}_{\text{control negativo}} - \text{Abs}_{\text{Elemento de prueba}}}{\text{Abs}_{\text{control negativo}}} \times 100$$

Resultados

Experimentación del 10/06/2014 al 12/06/2014

		UA MTT (N=6) desviación estándar	Índice de mortalidad %
		Contacto 24h	
	Control negativo:	1.890 0.087	0
	Control positivo : SDS 0.01% w/v	0,646 0,027	66
ID-14/03867	1%	1.393 0,177	26
	0,5%	1,671 0,033	12
	0.25%	1.792 0,041	5
	0,125%	1,789 0.040	5
	0,0625%	1.862 0.066	2
	0.03215%	1.830 0,076	3
	0.015625%	1.864 0.063	1
	0,007812%	1.864 0,119	1

El control positivo muestra una mortalidad superior al 30%. Esto valida la prueba.

Identificación: 6.38-22864-ID-14/03867

Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés 9
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

El ítem de prueba ID-14/03867 muestra un efecto citotóxico insignificante. Decidimos iniciar la prueba al 2%

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Notaria **30** *Notaria Treinta de Bogotá*
DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO
Ante la Notaria Treinta del Circulo de Bogotá D.C.
Compareció:
MARIN HERNANDEZ CLAUDIA MARITZA
quien exhibió: C.C. **52339204**
y declaró que la firma que aparece en el presente documento es la suya y que el contenido del mismo es cierto.


Verifique estos datos en www.notariacnlinea.com
X94J8KQUZB4UFDGY

CM
FIRMA
6tgg7tvgv5ttvtv
Bogotá D.C. 30/12/2020
a las **9:02:15 a. m.**

CESAR AUGUSTO ROJAS NOTARIO **30**
(E) BOGOTÁ D.C.

hecg



[Logotipo]

PROTECCION DEL CABELLO HUMANO CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO CON METHIOPEPTIDE®

Introducción

El cabello es principalmente un sistema de protección, y por lo tanto está muy expuesto al estrés ambiental, como las radiaciones solares, xenobióticos y estrés térmico. Además, el alisado del cabello y las técnicas de tintura son desafíos adicionales. El estrés oxidativo es una característica común a la mayoría de estos estreses, y tiene múltiples efectos en el cabello, como pérdida de color, fragilidad de la fibra capilar e incluso pérdida de cabello [1]. El bulbo capilar, que es la parte metabólicamente activa del cabello, es un blanco crítico del estrés oxidativo. Aunque está profundamente enterrado en la piel, puede ser desafiado por radiaciones UV y productos químicos depositados en la superficie de la piel. Para estudiar la capacidad de los antioxidantes para proteger el bulbo capilar, hemos utilizado un sistema *in vitro* 3D: folículos pilosos humanos aislados. El peróxido de hidrógeno se utilizó como antioxidante modelo. Este oxidante derivado del oxígeno es conocido como una de las especies oxidativas más relevantes *in vivo*, y se utiliza comúnmente en procedimientos de tintura del cabello. El peróxido de hidrógeno también participa en el blanqueado del cabello asociado a la edad [2].

Figura 1 : representación esquemática de un folículo piloso humano. El bulbo capilar, que contiene la matriz capilar y la papila dérmica, está anclado profundamente en la hipodermis.

En este sistema, hemos probado un péptido que contiene metionina, AMDM, que se comercializa bajo el nombre comercial METHIOPEPTIDE como una solución al 15% en un medio hidroglicólico libre de conservantes.

Métodos

Aislamiento de folículo piloso (HF – por sus siglas en inglés) anágeno: Los HF temporales del cuero cabelludo de las mujeres sometidas a cirugía de levantamiento facial fueron micro-disecados del tejido circundante y cultivados de acuerdo con el procedimiento Philpott [3]. Los HF anágenos fueron seleccionados por análisis morfológico, y transferidos a placas de cultivo que contienen medios E de William complementados con 11% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de insulina, 0,02% de hidrocortisona y 1% de L-Glutamina a 37°C.

Ensayo de estrés del folículo capilar: Los HF cultivados en los medios E de William fueron expuestos al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 24 horas. La elongación del tallo del cabello se midió después de 24 horas de incubación. Ingredientes protectores, por ejemplo, AMDM y el antioxidante de referencia N-acetilcisteína (NAC – por sus siglas en inglés) se añadieron en el medio del HF al inicio del cultivo.

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia: para estudios morfológicos, los HF se cultivaron en el medio E de William durante un período de 2 días, criocortes longitudinales de los HF se tiñeron con Fontana-Masson (evaluación del contenido de melanina). El teñido de Ki67 se llevó a cabo con el fin de evaluar el potencial de crecimiento del HF.

Resultados

En nuestra prueba *in vitro*, la exposición del HF aislado al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) disminuyó fuertemente la tasa de alargamiento del tallo del cabello (Figura 2). El AMDM añadido en el medio de cultivo del HF podría oponerse a los efectos de peróxido de hidrógeno, y la tasa de crecimiento normal (HF cultivado sin peróxido de hidrógeno), fue casi restaurada con la concentración más alta de AMDM. El AMDM fue más eficaz que el NAC antioxidante de referencia. Interesantemente, el AMDM solo (ver AMDM 5 mM) podría estimular el crecimiento en comparación con el HF control no tratado y sin estrés.

[Gráfica]

CLM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Figura 2: Monitoreo del alargamiento del tallo del cabello de HF expuesto al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 24 horas. Control: HF no tratado y no estresado. Las sustancias de prueba fueron N-acetilcisteína (NAC) y METHIOPEPTIDE (AMDM)).

Estos datos se completaron con un estudio histológico. El examen se ha centrado en la región del bulbo con la actividad mitótica más alta, que se localiza por debajo de la "línea de Auber", una línea crítica a través del diámetro más ancho del bulbo (Figura 3). Encontramos que la cantidad de células positivas Ki67 por debajo de la línea de Auber se reduce significativamente después del tratamiento con H₂O₂, mientras que el tratamiento con AMDM limitó claramente esta disminución. Este resultado corrobora la protección potencial de crecimiento observada anteriormente.

[Imagen]
Control

[Imagen]
H₂O₂

[Imagen]
H₂O₂ + AMDM

Figura 3: Monitoreo de células proliferativas evaluadas por inmunofluorescencia Ki67. Células positivas Ki67 teñidas en verde y núcleos en azul (DAPI). La línea de Auber está representada en la línea blanca y roja que delimita la papila dérmica.

La melanina es un objetivo preferencial de muchos estreses oxidativos (aumento metabólico endógeno, UV, ahumado, peróxido de hidrógeno...). Además, la disminución del contenido de melanina es un indicador de envejecimiento del cabello (menos contenido de melanina observado en catágeno en comparación con el anágeno), y también la consecuencia de los tratamientos de decoloración capilar. Por otra parte, los estreses oxidativos pueden afectar severamente el tallo del cabello, que se vuelve poroso, débil y sin brillo. Aquí, mostramos que los HF tratados con H₂O₂ presentan un contenido de melanina disminuida, mientras que el AMDM proporciona una buena protección contra esta disminución.

[Imagen]
Control

[Imagen]
H₂O₂

[Imagen]
H₂O₂ + AMDM

Figura 4: Monitoreo del contenido de melanina mediante tinte Fontana-Masson. La melanina se puede visualizar en marrón.

Conclusión

Hemos demostrado con una prueba *in vitro* que el AMDM, el componente activo de METHIOPEPTIDE puede proteger el folículo piloso humano del estrés oxidativo. Las buenas propiedades de barrido de peróxido de hidrógeno de AMDM explican este resultado sin embargo, la estimulación directa del crecimiento del folículo puede participar. Se necesitan estudios adicionales para comprender mejor el mecanismo de acción del AMDM.

Referencias

- [1] J.-A. Seo, I.-H. Bae, W.-H. Jang, J.H. Kim, S.-Y. Bak, S.-H. Han, Y.-H. Park, K.-M. Lim "Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss" *J. Derm. Sci.*, vol. 66, (2012), pp. 12-19
- [2] M. Seiberg "Age-induced hair greying – the multiple effects of oxidative stress" *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 35, (2013), pp. 532-538
- [3] M.P. Philpott, D. Sanders, G.E. Westgate, T. Kealey "Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology", *J. Dermatol. Sci.*, (July1994), Suppl: S55-72

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



HUMAN HAIR PROTECTION AGAINST OXIDATIVE STRESS WITH METHIOPEPTIDE®

Introduction

Hair primarily is a protective system, and thus is highly exposed to environmental stress, such as sun radiations, xenobiotics and thermal stresses. Besides, hair straightening and dying techniques are additional challenges. Oxidative stress is a feature common to most of these stresses, and has multiple effects on hair, such as colour loss, hair fibre fragility, and even hair loss [1]. The hair bulb, which is the metabolically active part of the hair, is a critical target of oxidative stress. Although deeply buried into the skin, it can be challenged by UV radiations and chemicals deposited at the surface of the skin. To study the ability of antioxidants to protect the hair bulb, we have used a 3D *in vitro* system: isolated human hair follicles. Hydrogen peroxide was used as a model oxidant. This oxygen-derived oxidant is known as one of the most relevant oxidative species *in vivo*, and it is commonly used in hair dying procedures. Hydrogen peroxide is also involved in age-associated hair greying [2].

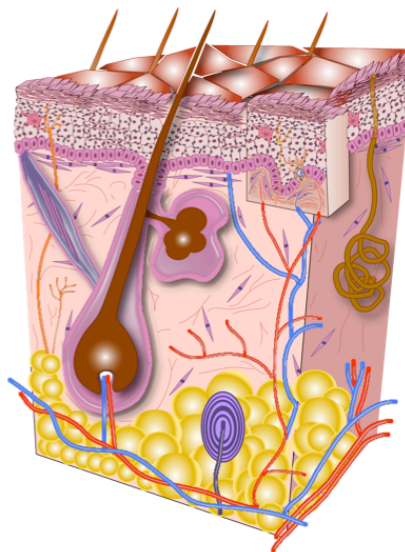


Figure 1 : schematic representation of a human hair follicle.
The hair bulb, that contains the hair matrix and the dermal papilla, is anchored deep into the hypodermis.

In this system, we have tested a methionine-containing peptide, AMDM, which is marketed under the trade name METHIOPEPTIDE as a 15% solution in a preservative-free hydro-glycolic media.

Methods

Anagen hair follicle (HF) isolation: temporal scalp HFs from females undergoing face-lift surgery were micro-dissected from surrounding tissue and cultivated according to the Philpott procedure [3]. Anagen HFs were selected by morphological analysis, and transferred into culture plates containing William's E media supplemented with 11% penicillin/streptomycin, 0.1% insulin, 0.02% hydrocortisone and 1% L-Glutamine at 37°C.

Hair Follicle stress assay: HFs cultivated in William's E media were exposed to Hydrogen peroxide (1mM). Hair shaft elongation was measured after 24 hours of incubation. Protective ingredients, e.g. AMDM or the reference antioxidant N-acetylcysteine (NAC) were added in HF medium at the start of the culture.

Immunohistochemistry and immunofluorescence: for morphological studies, HFs were cultivated in William's E medium over a period of 2 days, HF longitudinal cryocuts were stained with Fontana-Masson (assessment of melanin content). Ki67 staining was carried out in order to assess growth potential of the HF.

Results

In our *in vitro* test, exposure of isolated HF to hydrogen peroxide (H_2O_2) strongly decreased hair shaft elongation rate (Figure 2). AMDM added in HF culture medium could oppose to hydrogen peroxide effects, and normal growth rate (HF cultivated without hydrogen peroxide), was almost restored with AMDM highest concentration. AMDM was more effective than the reference antioxidant NAC. Interestingly, AMDM alone (see AMDM 5 mM) could stimulate growth as compared to non-treated, non-stressed control HF.

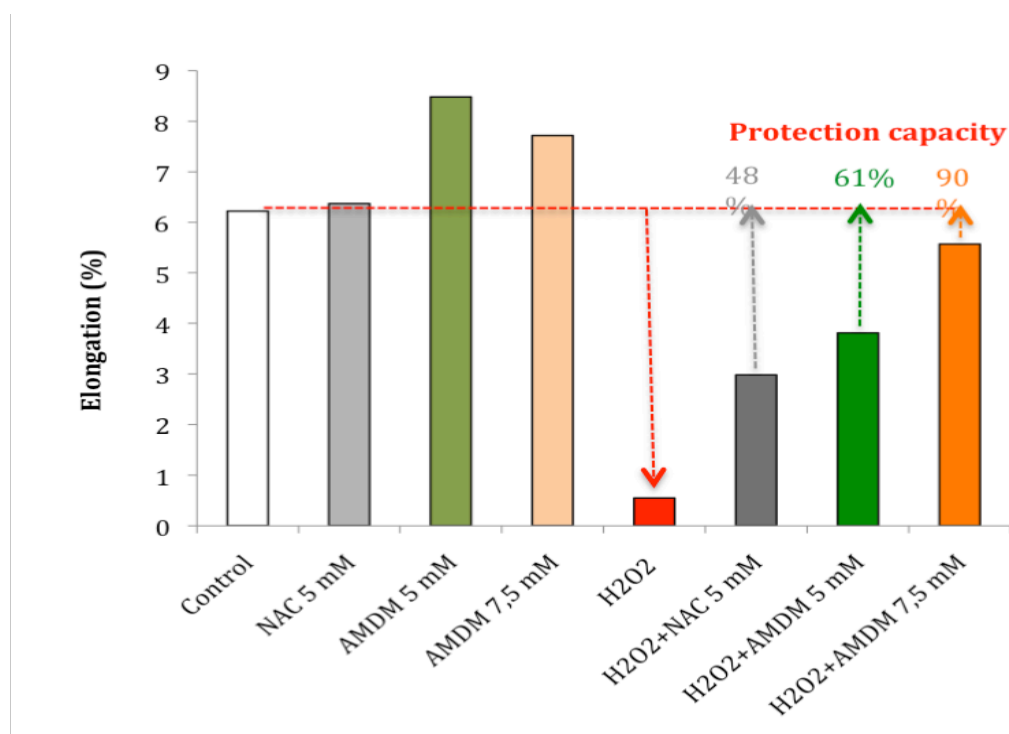


Figure 2: Monitoring of hair shaft elongation of HF exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2) during 24 hours. Control: non treated, non stressed HF. Test substances were N-acetylcysteine (NAC) and METHIOPEPTIDE (AMDM).

These data were completed with an histological study. Examination has focused on the region of the bulb with the highest mitotic activity, which is localised below the “Auber’s line”, a critical line across the widest diameter of the bulb (Figure 3). We found that the quantity of Ki67 positive cells below the Auber’s line is significantly diminished after H_2O_2 treatment, while AMDM treatment clearly limited this decrease. This result corroborates the growth potential protection observed previously.

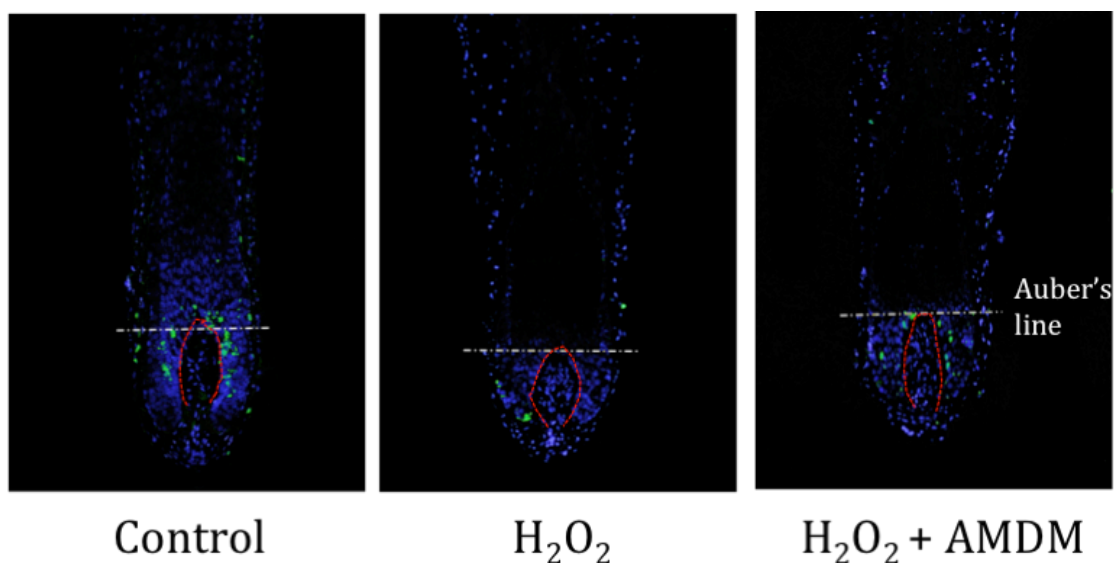


Figure 3: Monitoring of proliferative cells assessed by Ki67 immunofluorescence. Ki67 positive cells stained in green and nuclei in blue (DAPI). Auber's line is represented in white and red line delimits the dermal papilla.

Melanin is a preferential target of many oxidative stresses (endogenous metabolic increase, UV, smoking, hydrogen peroxide...). Besides, decreased melanin content is a marker of aging hair (less melanin content observed in catagen compared to anagen), and also the consequence of hair bleaching treatments. In another hand, oxidative stresses may affect severely the hair shaft, which becomes porous, weak and shineless. Here, we show that HF's treated with H_2O_2 present a decreased melanin content while AMDM provides a good protection against this decrease.

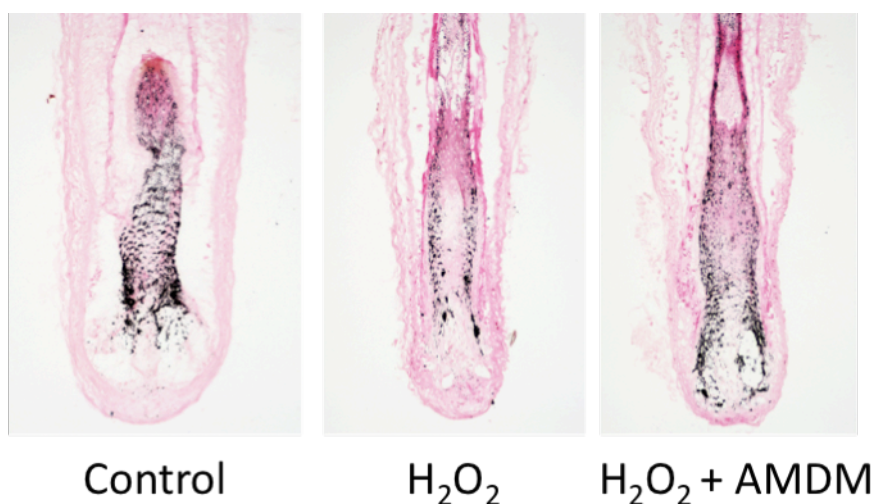


Figure 4: Monitoring of melanin content by Fontana-Masson staining. Melanin can be visualised in brown.

Conclusion

We have shown with an *in vitro* test that AMDM, the active constituent of METHIOPEPTIDE can protect human hair follicle from oxidative stress. The good hydrogen peroxide scavenging properties of AMDM explain this result, however, direct stimulation of follicle growth can participate. Additional studies are needed to better understand AMDM mechanism of action.

References

- [1] J.-A. Seo, I.-H. Bae, W.-H. Jang, J.H. Kim, S.-Y. Bak, S.-H. Han, Y.-H. Park, K.-M. Lim "Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss" *J. Derm. Sci*, vol. 66, (2012), pp. 12-19
- [2] M. Seiberg "Age-induced hair greying – the multiple effects of oxidative stress" *Int. J. Cosmet. Sci*, vol. 35, (2013), pp. 532-538
- [3] M.P. Philpott, D. Sanders, G.E. Westgate, T. Kealey "Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology", *J. Dermatol. Sci.*, (July1994), Suppl: S55-72

REPORT

***Screening of the antioxidant property of the blend of extracts (M.Dubia,
T.Lepidota and P. Bogotensis) toward lipid peroxidation
in human primary fibroblasts***

Included: preliminary study of cytotoxicity

Prepared for

Claudia GAMA

LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA

AUTOPISTA MEDELLIN KILOMETRO 2,4 VIA BOGOTA- SIBERIA COSTADO NORTE
VIA TITAN 600 metros PARQUE INDUSTRIAL PORTOS SABANA 80, BODEGA 32
city COTA
country COLOMBIA.

From

ICDD-sas

Nathalie COMPAGNONE, PhD

CSO-CEO

Study Director

Clotilde Biscarrat

100 route des houillères, CS 50014
13590 Meyreuil
FRANCE

Tel + 33 4 426 128 28

Table of content

1. Summary	3
2. Aim of the study	4
3. Context of the study	4
3.1. ICDD's Description	4
3.2. Using Mitochondria as a cosmetic target	4
3.3. Mitosafe® purpose	4
4. Design of the study	5
4.1. Test element	5
4.2. Concentration tested	5
4.3. Dates	6
4.4. Description of study plan	6
4.5. Validation criteria	7
5. Results & interpretation	8
5.1. Preliminary study of cytotoxicity	8
5.2. Cell viability in the presence of 500µM H ₂ O ₂	9
5.3. Lipid peroxidation rates	11
5.4. Level of protection of the active ingredients from H ₂ O ₂ -induced oxidative stress	12
6. Conclusions	14
7. Appendix	15
7.1. Plate layout	15
7.2. Mitosecure cytotox – Live cell number (RAU)	16
7.3. Plate layout TBARS level per treatment (RFU) – Kinetics	16
7.4. Live cell number (RFU)	17
7.5. Lipid peroxidation rates per treatment	17
8. References	18
9. Archive	19
10. Appendix	20

1. Summary

AIM: the objective of the study, performed by ICDD-sas on behalf of LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA, Claudia Gama, is the analysis of the antioxidant property of 1 active ingredient (a blend of extracts) toward lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in human primary fibroblasts.

METHODS: The compound was received and kept according to Claudia Gama's recommendations. The Mitosafe[®] technology, developed by ICDD-sas, was used. It consists in the study of integrated mechanisms controlling mitochondrial function within live cells. In this study, the scope was limited to the analysis of the antioxidant property at three tested doses in human primary fibroblasts. Briefly, we measured antioxidant properties of test compound toward lipid peroxidation induced by 500 μ M Hydrogen peroxide. The analysis of the experimental conditions was performed to compare their effects on lipid peroxidation with respect to that of Ellagic acid, used as a reference compound. A preliminary cytotoxicity study was performed to determine the doses to be used in the MitoRead AntiOx TBARS.

CONCLUSION :

The blend of extracts (M.Dubia, T.Lepidota and P. Bogotensis) was tested in the Mitoread AntiOx TBARS bioassay in order to screen its antioxidant property toward the H_2O_2 -induced lipid peroxidation in human primary fibroblasts.

The Mitoread AntiOx TBARS assay demonstrated the antioxidant properties of the tested blend of extract, in healthy cells submitted to a 500 μ M H_2O_2 -induced oxidative stress. The active ingredient was pre-incubated within the cells for 4 hours, before induction of oxidative stress. Values for antioxidant or pro-oxidant properties are expressed in the summary table below.

The **blend of extracts**, at 0.35% was the most efficient dose with 77% protection, and at 0.25%, it was the most potent dose with 74% protection. These effects were similar to that of Ellagic acid. At both tested dose the blend of extracted aggravated the cell loss induced by H_2O_2 , at a very slight level when used at 0.25% and to a level comparable to that observed with Ellagic acid at 0.35%. Hence, in the context of cell death induced by a strong oxidative stress, the use of the blend of extract at 0.25% was more efficient in reducing H_2O_2 -induced TBARS, and less toxic than Ellagic acid, a reference anti-oxidant compound.

The **blend of extracts** at 0.5%, did not show any anti-oxidant effects toward H_2O_2 -induced lipid peroxidation, and aggravated oxidative stress-induced cell loss by 33%.

Active ingredient	Concentration	Effect toward H_2O_2 -induced lipid peroxidation in human primary fibroblasts	Effect on the cell viability after 500 μ M H_2O_2 treatment
Ellagic acid	100 μ M	Antioxidant 72% (p=0.034)	$\searrow$ 30% (p=0.000)
The blend of extracts	0.25%	Antioxidant 74% (p=0.035)	$\searrow$ 16% (p=0.000)
	0.35%	Antioxidant 77% (p=0.45)	$\searrow$ 32% (p=0.000)
	0.5%	Inactive	$\searrow$ 33% (p=0.000)

2. Aim of the study

The study aims at the comparison of the antioxidant potential of 1 active ingredient, toward lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide versus that of the reference compound, Ellagic acid, using the Mitosafe® technology. This screening was done in human primary fibroblasts.

3. Context of the study

3.1. ICDD's Description

ICDD-sas is a biotech company that performs research contract for the cosmetic industry. ICDD-sas uses its expertise to measure and decode the mitochondrial functions, using the Mitosafe® technology. ICDD-sas evaluates the efficiency and the harmlessness of active ingredients intended to be used in cosmetic formulations.

3.2. Using Mitochondria as a cosmetic target

The recent understanding that the mitochondrial impairment is central to describe the ageing process ([1],[2],[3]) has raised considerable interest in a new anti-ageing approach that involves the development of molecules targeting mitochondrial dysfunctions. In this regard, ICDD-sas has generated tools allowing the screening of active ingredients that could impact and improve the mitochondrial processes involved in skin ageing. Several assays can be performed in isolation or in combination to assess cell viability, reactive oxygen species production, ATP production, oxygen consumption, lipid peroxidation, as well as mtDNA depletion.

Oxidative stress generated by environmental factors is a basic cause of the progressive age-associated decline in tissue functions ([1],[2],[4]). Evaluating the antioxidant activity of compounds or extracts with the current assays, (H)ORAC, is not optimal because it is independent from the cellular environment and intracellular interactions. Because almost 90% of age-associated ROS production is of mitochondrial origin ([1],[3]), assays that integrate the study of mitochondrial functions in living cells are more relevant. Mitosafe® technology thus offers an alternative to current biochemical assays to analyze and screen natural ingredients according to their performances toward cellular and/or mitochondrial targets.

3.3. Mitosafe® purpose

Mitosafe® assays are functionally integrated bioassays that generate multiplexed outcomes describing the mitochondrial energetic balance, the redox state and the mitochondrial biogenesis in response to active compounds. The MitoRead range, using the Mitosafe® technology, is tuned to bringing fast and relevant information on the potential of compounds to protect mitochondria from aggressions and dysfunctions. These *in cellulo* assays provide an alternative to animal experimentation.

Environmental factors like UV ([5],[6],[7]) and pollution ([8],[9],[10],[11]) slow the cellular functioning and enhance the cellular oxidative stress, resulting in skin premature ageing. Intracellular ROS are mainly formed by dysfunctions on the mitochondrial electron transfer chain (ETC) ([1]). ROS include singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide. They are involved in injuries to biological molecules including lipids, proteins and DNA ([12],[13],[14]). In this regard, mitochondrial DNA is particularly vulnerable due to its proximity to the mitochondrial ETC, its lack of histones and its limited capacities of repair ([15]). ROS-induced mutagenesis of mtDNA is causally

related to reduced energy production, enhanced oxidative stress, decline of mitochondrial functions and ultimately to the cutaneous ageing process ([16],[17],[18]). That explains why mitochondrial age-associated ROS are considered to be key-elements in the mechanism of stress signaling and skin ageing. Consequently, investigation on the potential anti-oxidant properties of active ingredients examine their capabilities to reduce the mitochondrial ROS production in response to pro-oxidant agents, and to protect cells against mitochondrial dysfunctions.

The MitoRead AntiOx TBARS assay consists in the quantification of the antioxidant property of active ingredients toward the lipid peroxidation induced by an oxidative agent, hydrogen peroxide, in living cells. The validation of these outcomes as predictor for the antioxidant potential was obtained from experimental validation, with the reference compound, Ellagic acid.

4. Design of the study

4.1. Test element

ICDD-sas was provided by LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA with 1 active ingredient. It was prepared on May 20th 2014 according to Claudia Gama's recommendations in the appropriate solvent and at concentrations described below.

Upon reception, a code number was attributed to each compound according to internal coding procedure (CQ-P-04).

Compound	M.Dubia, T.Lepidota and P.Bogotensis blend
ICDD code	IC9228
Batch number	NB00406-2014
Shipped weight	20 gr
Temperature storage	+4°C

After approval of the present report, products will be destroyed at the end of a period of 6 months unless otherwise stated in writing by the sponsor. In the event that the ordering party requests return of the test elements, it is its responsibility to organize and schedule pick-up of the test elements at ICDD using its chosen transportation means, at its own cost.

4.2. Concentration tested

The active ingredient was first tested at the following concentrations in the preliminary study of cytotoxicity, according to the study plan signed by both parties on May 19th 2014.

Compound	ICDD code	Tested concentrations
M.Dubia, T.Lepidota and P.Bogotensis blend	IC9228	0.5% - 0.35% - 0.25% - 0.15% - 0.05%

The following concentrations: 0.25%, 0.35%, 0.5%, were chosen after the cytotoxicity study for testing in the Mitoread AntiOx TBARS according to the study plan signed by both parties on May 22nd 2014. Similar procedures were applied to the reference compounds, DMSO (IC4000), H₂O₂

(IC4010) and Ellagic acid (IC4024), provided by ICDD. The blend of extracts was tested in the presence of 0.5% DMSO regardless of vehicle.

Compound	ICDD code	Tested concentration
DMSO	IC4000	0.5%
H ₂ O ₂	IC4010	500 µM
Ellagic Acid	IC4024	100 µM
M.Dubia, T.Lepidota and P.Bogotensis blend	IC9228	0.25%
		0.35%
		0.5%

4.3. Dates

The studies have been performed from May 19th to 29th 2014 in ICDD-sas facilities.

4.4. Description of study plan

Cells used

Human primary fibroblasts were cultured according to the SOP ME-MO-02.
No deviation was observed in cell culture conditions.

Preliminary study : Mitosecure Cytotox methodology

The analysis was performed according to the SOP ME-MO-06. It consists in the quantification of the cytotoxic potential of test elements using colorimetry. Cells were pre-incubated at 37°C during 24 hours with the vehicle only (DMSO) or the test elements at the determined concentrations. After washing, cells were incubated with the MTT dye solution at 37°C, evaluating the cell viability. Following incubation, the solubilization/stop solution was added and the absorbance was immediately recorded using a microplate reader (Varioskan-Thermo). Experiment included a blank and a negative control. The negative control consisted in cultures treated with the vehicle, DMSO (IC4000). All the test elements were tested in quadruplicates. Their cytotoxic effects were compared to the negative control.

Mitoread AntiOx TBARS methodology

The analysis was performed according to the SOP ME-MO-42 ("Mitoread AntiOx TBARS in fibroblasts"). It consists in the quantification of the antioxidant activity of ingredients toward lipid peroxidation using a fluorescent dye. First, cells were pre-incubated with the antioxidant reference compound, Ellagic Acid 100 µM, or the active ingredients at the determined concentrations for 4 hours. After washing, cells were incubated with the fluorescent probe at 37°C for 30 minutes. Following washing, cells were incubated with the pro-oxidant reference compound, H₂O₂ 500 µM. Lipid peroxidation was immediately dynamically recorded during 60 minutes. Fluorescence was recorded every two minutes using a microplate reader (Varioskan-Thermo). Cells were kept at 37°C during the kinetic loop. The analysis of the antioxidant activity was multiplexed to the measurement of cell viability, using spectrophotometry. Experiments included a blank, negative- and positive-controls. The negative control consisted in cultures treated only with the pro-oxidant reference compound, hydrogen peroxide. The pre-incubation with the antioxidant reference compound, Ellagic acid, followed by the treatment with hydrogen peroxide formed the positive control. All the active ingredients were tested in quadruplicates. Their effects were compared simultaneously to the negative and positive controls.

Data acquisition

Data were recorded by the SkanIt software (Thermo) and were formatted in an Excel table (provided in appendix).

Data interpretation

Data expressed the rate of lipid peroxidation per cell for each experimental condition according to the plate layout (provided in appendix). The antioxidant effects of the compounds were expressed as a protection ratio compared to the treatment with the pro-oxidant compound only (negative control) and the non-treated cells. The effect of the positive control was included for comparison.

Data Storage

Raw data were stored according to our SOP, formatted raw data are given in appendix.

4.5. Validation criteria

Only qualified personnel were habilitated to perform the present study. The study was performed by Pauline Picamal, Technician and Clotilde Biscarrat, project manager.

According to our SOP ME-MO-42, the experiment was considered validated.

All validation criteria were fulfilled.

Experiment	SOP	Validation criteria	Results
Mitoread AntiOx TBARS on fibroblasts	ME-MO-42	H ₂ O ₂ 500 µM induces a significant lipid peroxidation compared to the negative control	Fulfilled: Significant lipid peroxidation induction by H ₂ O ₂ 500 µM, p=0.007
		Ellagic acid 100 µM significantly decreases the lipid peroxidation induced by H ₂ O ₂ 100 µM	Fulfilled: Significant decrease in lipid peroxidation induced by H ₂ O ₂ 500 µM, p=0.034

A Student's t-test analysis was made to determine the level of significance of the amplitude of the changes in the different parameters measured, in the tested experimental conditions with respect to the negative (pro-oxidant properties) and positive (antioxidant properties) controls. All statistical data were generated using the SPSS software.

5. Results & interpretation

5.1. Preliminary study of cytotoxicity

Human primary fibroblasts were pre-incubated during 24 hours with either the vehicle DMSO at 0.5% or with the active ingredient tested at the concentrations cited previously. At the end of the pre-incubation, the cell viability was measured using a spectrophotometric method, based on the activity of mitochondrial succinate deshydrogenase activity.

Cell viability profiles are shown in figure 1. The Student's t-test analysis showed significant differences among the experimental conditions studied.

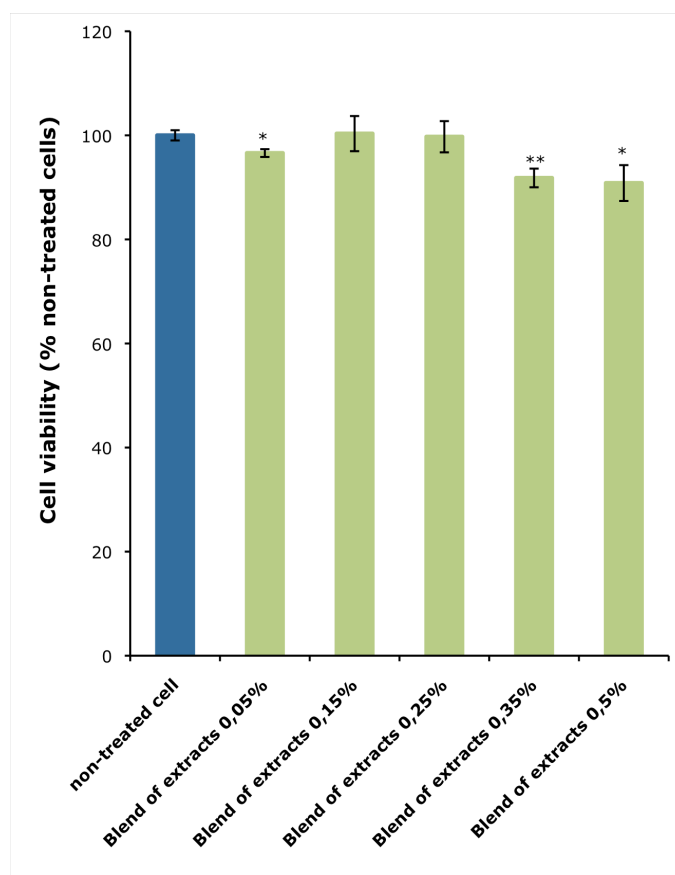


Figure 1 : Effects of the active ingredient on the cell viability in human primary fibroblasts. Significance level compared to the non-treated cells. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Bars are SEM

The table 1 below summarizes the effects of the tested active ingredients on the cell viability compared to the non-treated cells and their cytotoxic potential.

Compound	Dose	Effect on cell viability compared to the negative control	Mean cytotoxic potential (%)	Interpretation
Blend of extracts	0.05%	↘ *	3.40	Non cytotoxic
	0.15%	≈ NC	-	Non cytotoxic
	0.25%	≈ NC	-	Non cytotoxic
	0.35%	↘ **	8.18	very slight cytotoxicity
	0.50%	↘ *	9.16	very slight cytotoxicity

≈ NC : comparable to the negative control (non-treated cells)

Table 1: Effects of the active ingredient on the cell viability in human primary fibroblasts following a 24-hours incubation. ≈ NC : comparable to the negative control (non-treated cells). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

First, at the first three tested doses, 0.05%, 0.15% and 0.25% the blend of extracts did not significantly change the cell viability compared to non-treated cells. Second at the two highest tested doses, 0.35% and 0.5%, the blend of extracts was responsible for a very slight cytotoxicity with respectively 8.18% and 9.16% cell death compared to the non-treated cells, in human primary fibroblasts ($p = 0.007$ and $p = 0.043$ respectively). Such very slight level of cytotoxicity could also derive from seeding difference or analytical imprecisions.

The following concentrations were chosen to perform the Mitoread AntiOx TBARs assay:

Compound	ICDD code	Tested concentrations
Myrciaria Dubia Extract	IC9213	0.25% / 0.35% / 0.5%

5.2. Cell viability in the presence of 500 μ M H₂O₂.

Human primary fibroblasts were pre-incubated during 4 hours with either no test element or with the active ingredient tested at the doses cited previously. Following washing, cells were treated with H₂O₂ 500 μ M during the kinetic loop. Then we assessed the cell viability using a spectrophotometric method, based on the activity of the mitochondrial succinate deshydrogenase activity.

The figure 2 depicts the effects of the pre-incubation with the active ingredient followed by incubation with the pro-oxidative treatment, H₂O₂ 500 μ M, on cell viability, in human primary fibroblasts.

The Student's t-test analysis showed significant differences among the experimental conditions studied.

The figure 2 shows that the pro-oxidative treatment with H₂O₂ 500 μ M significantly decreased the cell viability by 8.8% compared to the non-treated human primary fibroblasts ($p = 0.005$). The pre-incubation with 100 μ M Ellagic acid followed by the treatment with 500 μ M H₂O₂ increased the H₂O₂-induced cell death to 30.1% compared to the non-treated cells ($p = 0.000$).

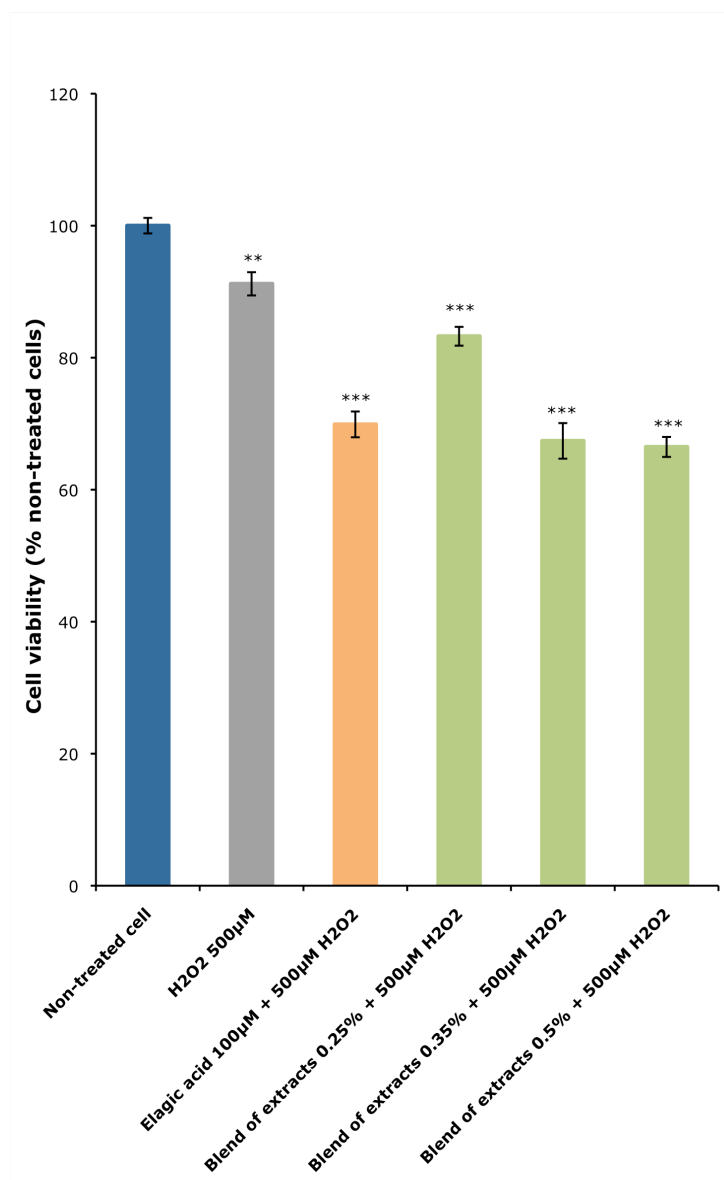


Figure 2: Effects of the test elements and H₂O₂ 500 µM on the cell viability in human primary fibroblasts with calceine. Significance level compared to the non-treated cells, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. Bars are SEM

The table 2 below summarizes the results obtained with the different test element conditions on cell viability.

Active ingredient	Concentration	Effect on the cell viability after 500 µM H ₂ O ₂ treatment
H ₂ O ₂	500µM	↓** 8.80%
Ellagic acid	100µM	↓*** 30.10%
Blend of extracts	0.25%	↓** 16.75%
	0.35%	↓** 32.60%
	0.50%	↓** 33.52%

Table 2: Effects of the test element on the cell viability in human primary fibroblasts.
Only significant effects are depicted

The tested blend of extract induced a reduced cell viability compared to H₂O₂-treated cells, which evolves from a 1.9-fold increase at 0.25% to 3.8-fold at 0.5%. It was comparable at the two highest tested doses and also comparable to that induced by Ellagic acid (3.4 fold increase). In the presence of oxidative stress, the blend of extract was thus inefficient in restoring oxidative-stress induced cell death.

5.3. Lipid peroxidation rates

Human primary fibroblasts were pre-incubated with the antioxidant reference compound, Ellagic acid 100 µM, or the active ingredients for 4 hours. Following washing, cells were treated with the pro-oxidant reference compound, H₂O₂ 500 µM. Simultaneously to the oxidative stress induction, the lipid peroxidation level was evaluated through the dynamical measurement of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) production, byproducts of lipid peroxidation, for 60 minutes. Lipid peroxidation rates (TBARS/min/cell) were calculated for each well and each experimental condition in human primary fibroblasts a linear regression to the kinetic profiles.

The figure 3 depicts the profile of all the active ingredients in human primary fibroblasts. The Student's t-test analysis showed significant differences among the different experimental conditions.

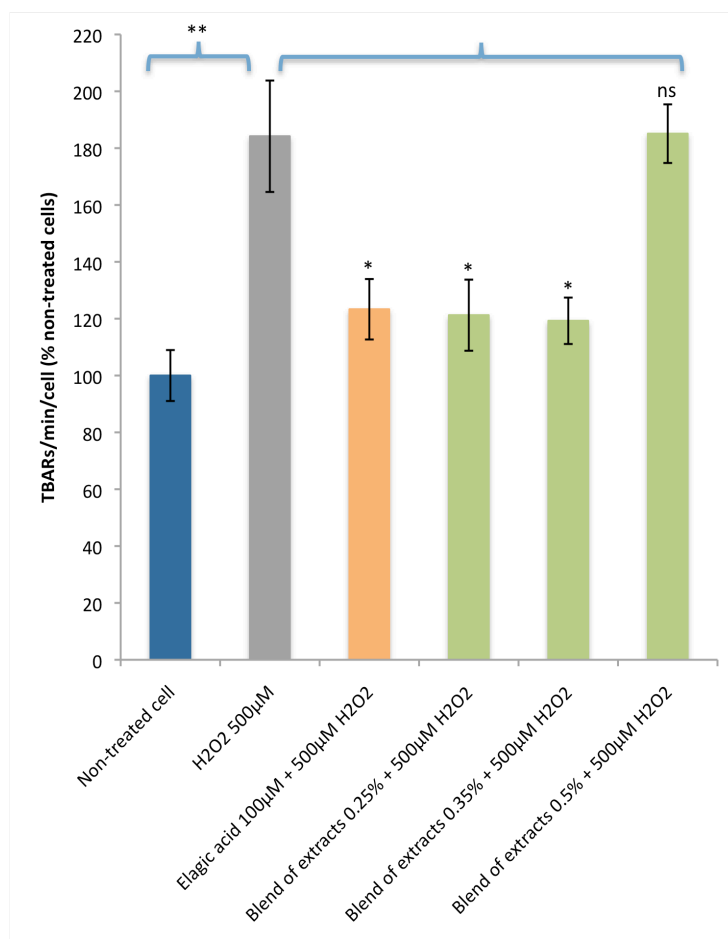


Figure 3: Effects of the test element and the reference compound on the lipid peroxidation rate per cell induced by H₂O₂ 500 µM in human primary fibroblasts. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Bars are SEM

The effects of the negative control, H₂O₂ 500µM, and the positive control, Ellagic acid at 100µM, were validated in human primary fibroblasts, inducing respectively a 1.84- fold TBARS induction (p=0.007) with H₂O₂ treatment, that was reduced by Ellagic acid by 0.67-fold. TBARS level in Ellagic acid treated cells, in which oxidative stress was induced by H₂O₂ 500µM, was only moderately elevated compared to cells in which no oxidative stress was induced (33 %) (p=0.034).

The table 3 below summarizes the effect of the tested active ingredient toward the H₂O₂-induced cellular oxidative stress in human primary fibroblasts.

Active ingredient	Concentration	Effect toward H ₂ O ₂ -induced lipid peroxidation in human primary fibroblasts
Blend of extracts	0.25%	Antioxidant 74% (p=0.035)
	0.35%	Antioxidant 77% (p=0.45)
	0.5%	Inactive

Table 3: Comparative effects of the test elements on the H₂O₂-induced lipid peroxidation in human primary fibroblasts.

- The **Blend of extracts**, at the two lowest doses tested, 0.25% and 0.35%, showed a similar and significant antioxidant effects reducing H₂O₂-induced lipid peroxidation by 0.76-fold in average (p=0.035 and p=0.045). At the higher dose, 0.5%, the **blend of extracts** was inactive and left the rate of H₂O₂-induced lipid peroxidation unchanged.

5.4. Level of protection of the active ingredients from H₂O₂-induced oxidative stress

The figure 4 depicts the level of protection conferred toward H₂O₂-induced oxidative stress, by the tested active ingredient to human primary fibroblasts. This protection level is expressed as a percent. It is calculated by a ratio positioning the effect of each tested compound on a scale derived from the value of the non-treated cells (100% protection) and that of H₂O₂-induced oxidative stress (0% protection). Making abstractions of different metrics in which concentrations are expressed, the level of protection from H₂O₂-induced oxidative stress conferred by the test elements in fibroblasts (in percent) is thus directly comparable and can be used to rank the compound among each other for efficacy in reference to the positive control, Ellagic acid 100 µM. Compounds or doses with pro-oxidant activity will display a negative protection value.

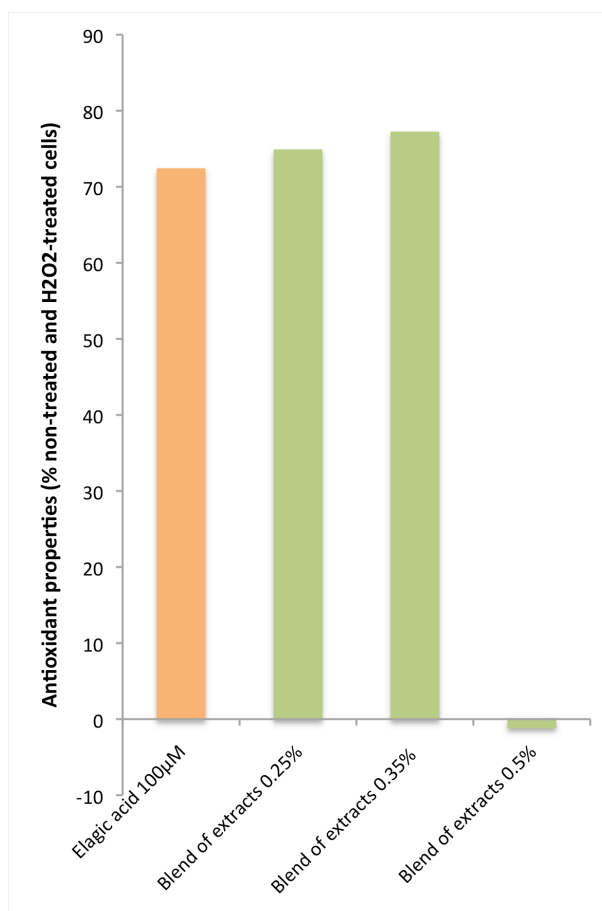


Figure 4: Antioxidant protection of each test element, pre-incubated for 4 hours, toward the cellular lipid peroxidation induced by H₂O₂ 500 µM in human primary fibroblasts

Ellagic acid at 100µM, conferred an antioxidant protection toward H₂O₂-induced lipid peroxidation of 72% (p=0.034). However, this result is to be mitigated by the fact that Ellagic acid does not rescue cell viability induced by 500µM H₂O₂.

The **blend of extracts**, at 0.35% was the most efficient dose with 77% protection. However, this result is to be mitigated by the lack of cell viability rescue obtained after incubation with 500µM H₂O₂. The blend of extracts at 0.25% was the most potent dose with 74% protection, this effect was superior to that Ellagic acid.

The **blend of extracts** at 0.5%, did not show any anti-oxidant nor pro-oxidant effects toward H₂O₂-induced lipid peroxidation.

6. Conclusions

The blend of extracts (M.Dubia, T.Lepidota and P. Bogotensis) was tested in the Mitoread AntiOx TBARS bioassay in order to screen its antioxidant property toward the H₂O₂-induced lipid peroxidation in human primary fibroblasts.

The Mitoread AntiOx TBARS assay demonstrated the antioxidant properties of the tested blend of extract, in healthy cells submitted to a 500µM H₂O₂-induced oxidative stress. The active ingredient was pre-incubated within the cells for 4 hours, before induction of oxidative stress. Values for antioxidant or pro-oxidant properties are expressed in the summary table below.

The **blend of extracts**, at 0.35% was the most efficient dose with 77% protection, and at 0.25%, it was the most potent dose with 74% protection. These effects were similar to that of Ellagic acid. At both tested dose the blend of extracted aggravated the cell loss induced by H₂O₂, at a very slight level when used at 0.25% and to a level comparable to that observed with Ellagic acid at 0.35%. Hence, in the context of cell death induced by a strong oxidative stress, the use of the blend of extract at 0.25% was more efficient in reducing H₂O₂-induced TBARS, and less toxic than Ellagic acid, a reference anti-oxidant compound.

The **blend of extracts** at 0.5%, did not show any anti-oxidant effects toward H₂O₂-induced lipid peroxidation, and aggravated oxidative stress-induced cell loss by 33%.

Active ingredient	Concentration	Effect toward H ₂ O ₂ -induced lipid peroxidation in human primary fibroblasts	Effect on the cell viability after 500 µM H ₂ O ₂ treatment
Ellagic acid	100µM	Antioxidant 72% (p=0.034)	↘30% (p=0.000)
The blend of extracts	0.25%	Antioxidant 74% (p=0.035)	↘16% (p=0.000)
	0.35%	Antioxidant 77% (p=0.45)	↘32% (p=0.000)
	0.5%	Inactive	↘33% (p=0.000)

7. Appendix

7.1. Plate layout

Mitosecure Cytotox

Blank	IC9213 0,25%	IC9213 5%	IC9213 50%								
Blank	IC9213 0,25%	IC9213 5%	IC9213 50%								
Blank	IC9213 0,25%	IC9213 5%	IC9213 50%								
Blank	IC9213 0,25%	IC9213 5%	IC9213 50%								
Non- treated cells	IC9213 1,75%	IC9213 25%									
Non- treated cells	IC9213 1,75%	IC9213 25%									
Non- treated cells	IC9213 1,75%	IC9213 25%									
Non- treated cells	IC9213 1,75%	IC9213 25%									

Mitoread antiox TBARs

Blank	H2O2 500µM	IC9213 2,5%	IC9213 10%								
Blank	H2O2 500µM	IC9213 2,5%	IC9213 10%								
Blank	H2O2 500µM	IC9213 2,5%	IC9213 10%								
Blank	H2O2 500µM	IC9213 2,5%	IC9213 10%								
Non- treated cells	IC4024 100µM	IC9213 5%									
Non- treated cells	IC4024 100µM	IC9213 5%									
Non- treated cells	IC4024 100µM	IC9213 5%									
Non- treated cells	IC4024 100µM	IC9213 5%									

7.2. Mitosecure cytotox – Live cell number (RAU)

Plate:1 - Wavelength:540			
0.0451	0.3466	0.3740	0.3439
0.0456	0.3383	0.3533	0.3228
0.0443	0.3398	0.3396	0.3297
0.0441	0.3360	0.3322	0.2938
0.3446	0.3340	0.3336	
0.3463	0.3379	0.3294	
0.3564	0.3553	0.3093	
0.3551	0.3793	0.3300	

7.3. Plate layout TBARS level per treatment (RFU) – Kinetics

		time (min)															
	Well	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
blank	1	0.1086	0.1112	0.1173	0.1133	0.1154	0.1075	0.1237	0.1242	0.1284	0.1247	0.1216	0.1234	0.1051	0.1204	0.1099	0.1290
	2	0.1058	0.0955	0.1399	0.1245	0.1142	0.1170	0.1137	0.1298	0.0997	0.1095	0.1069	0.1277	0.1239	0.1047	0.1367	0.1237
	3	0.1049	0.1120	0.1138	0.1257	0.1101	0.1047	0.1184	0.1271	0.1258	0.1189	0.1210	0.1135	0.1041	0.1352	0.1127	0.1036
non-treated cells	4	0.1271	0.1151	0.1103	0.1129	0.1113	0.1121	0.1123	0.1162	0.1302	0.1183	0.1099	0.1219	0.1371	0.1036	0.1222	0.1106
	1	0.1220	0.1367	0.1368	0.1339	0.1394	0.1488	0.1417	0.1469	0.1592	0.1511	0.1371	0.1414	0.1323	0.1422	0.1465	0.1430
	2	0.1487	0.1157	0.1321	0.1389	0.1431	0.1419	0.1544	0.1407	0.1604	0.1538	0.1642	0.1447	0.1639	0.1614	0.1559	0.1655
H2O2 500µM	3	0.1350	0.1201	0.1215	0.1358	0.1154	0.1201	0.1198	0.1363	0.1100	0.1496	0.1415	0.1444	0.1448	0.1471	0.1276	0.1490
	4	0.1341	0.1177	0.1133	0.1035	0.1391	0.1016	0.1167	0.1206	0.1201	0.1181	0.1189	0.1138	0.1266	0.1223	0.1270	0.1285
	1	0.1555	0.1301	0.1499	0.1674	0.1615	0.1801	0.1778	0.1611	0.1759	0.1827	0.1880	0.1883	0.1691	0.1937	0.1651	0.1854
IC4024 + H2O2 500µM	2	0.1274	0.1377	0.1437	0.1471	0.1543	0.1602	0.1737	0.1423	0.1594	0.1631	0.1586	0.1516	0.1682	0.1754	0.1699	0.1598
	3	0.1332	0.1252	0.1416	0.1342	0.1436	0.1643	0.1519	0.1595	0.1694	0.1825	0.1803	0.1561	0.1525	0.1857	0.1688	0.1786
	4	0.1354	0.1210	0.1259	0.1299	0.1443	0.1236	0.1414	0.1515	0.1405	0.1679	0.1467	0.1544	0.1472	0.1348	0.1440	0.1728
0.25% + H2O2 500µM	1	0.1433	0.1472	0.1347	0.1398	0.1621	0.1644	0.1568	0.1719	0.1540	0.1495	0.1373	0.1415	0.1731	0.1501	0.1599	0.1693
	2	0.1303	0.1587	0.1404	0.1352	0.1441	0.1489	0.1399	0.1552	0.1453	0.1802	0.1554	0.1734	0.1509	0.1527	0.1732	0.1786
	3	0.1313	0.1425	0.1531	0.1535	0.1333	0.1547	0.1534	0.1610	0.1533	0.1613	0.1732	0.1593	0.1814	0.1678	0.1530	0.1724
IC9228	4	0.1335	0.1270	0.1348	0.1116	0.1388	0.1614	0.1309	0.1580	0.1444	0.1556	0.1658	0.1511	0.1713	0.1552	0.1633	0.1615
	1	0.1582	0.1524	0.1374	0.1539	0.1787	0.1758	0.1802	0.1731	0.2088	0.1691	0.1975	0.1922	0.1812	0.1548	0.2078	0.2044
	2	0.1305	0.1551	0.1700	0.1569	0.1950	0.1743	0.1667	0.1825	0.1725	0.1801	0.1777	0.1887	0.1806	0.1809	0.1730	0.1693
0.35% + H2O2 500µM	3	0.1541	0.1706	0.1494	0.1471	0.1646	0.1670	0.1548	0.1684	0.1850	0.1596	0.1775	0.1846	0.1683	0.1817	0.1731	0.1714
	4	0.1331	0.1531	0.1652	0.1639	0.1483	0.1607	0.1874	0.1683	0.1730	0.1668	0.2096	0.1727	0.1771	0.1843	0.1947	0.1709
	1	0.1699	0.1675	0.1669	0.1469	0.1949	0.1757	0.1823	0.1746	0.1724	0.1722	0.1895	0.1989	0.1757	0.1847	0.1767	0.1913
0.5% + H2O2 500µM	2	0.1639	0.1807	0.1596	0.1573	0.1700	0.1607	0.1711	0.1674	0.1569	0.1734	0.1936	0.1780	0.1726	0.1858	0.1773	0.1595
	3	0.1521	0.1584	0.1852	0.1791	0.1980	0.1842	0.1885	0.2074	0.1812	0.1946	0.1903	0.2034	0.1984	0.1783	0.2052	0.2047
	4	0.1168	0.1273	0.1607	0.1606	0.1337	0.1424	0.1672	0.1574	0.1515	0.1625	0.1664	0.1630	0.1762	0.1716	0.1777	0.1889
IC9228	1	0.1497	0.1543	0.1721	0.1564	0.1622	0.1626	0.1577	0.1676	0.1979	0.1569	0.1979	0.1586	0.1712	0.1770	0.2038	0.1932
	2	0.1848	0.1854	0.1983	0.1719	0.1893	0.1965	0.1936	0.2020	0.2174	0.1838	0.1983	0.1932	0.2019	0.2104	0.2366	0.2082
	3	0.1481	0.1464	0.1741	0.1805	0.1540	0.1804	0.1681	0.1799	0.1765	0.1873	0.1635	0.1687	0.1745	0.1849	0.1837	0.1971
	4	0.1714	0.1720	0.1569	0.1555	0.1845	0.1713	0.1711	0.1825	0.1927	0.2053	0.1812	0.1896	0.1746	0.1834	0.1973	0.1811
		time (min)															
	Well	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	
blank	1	0.1172	0.1032	0.1045	0.1198	0.0976	0.0986	0.1106	0.1411	0.1127	0.1197	0.1118	0.1045	0.1169	0.1232	0.1039	
	2	0.1332	0.1297	0.1265	0.1185	0.1369	0.1172	0.1331	0.1333	0.1169	0.1154	0.1071	0.1195	0.1270	0.1125	0.1054	
	3	0.1197	0.1327	0.1248	0.1234	0.1157	0.0998	0.1022	0.1295	0.0995	0.1072	0.1178	0.1278	0.1078	0.1089	0.1205	
non-treated cells	4	0.1079	0.1035	0.1160	0.1237	0.1061	0.1175	0.1156	0.0996	0.0920	0.0908	0.1323	0.1051	0.1020	0.1146	0.1122	
	1	0.1709	0.1406	0.1431	0.1583	0.1386	0.1540	0.1562	0.1595	0.1634	0.1528	0.1540	0.1656	0.1377	0.1366	0.1412	
	2	0.1632	0.1595	0.1791	0.1594	0.1553	0.1585	0.1745	0.1554	0.1717	0.1778	0.1727	0.1599	0.1614	0.1782	0.2004	
H2O2 500µM	3	0.1538	0.1336	0.1471	0.1552	0.1567	0.1605	0.1501	0.1410	0.1577	0.1554	0.1422	0.1578	0.1446	0.1792	0.1439	
	4	0.1343	0.1412	0.1136	0.1536	0.1467	0.1384	0.1258	0.1389	0.1351	0.1255	0.1527	0.1524	0.1333	0.1471	0.1394	
	1	0.1961	0.1990	0.1693	0.1809	0.2143	0.1631	0.1822	0.1847	0.2124	0.1859	0.1997	0.1963	0.1801	0.1757	0.1984	
IC4024 + H2O2 500µM	2	0.1571	0.1791	0.1754	0.1726	0.1692	0.1646	0.1799	0.1654	0.1511	0.1772	0.2057	0.1798	0.1760	0.1996	0.1896	
	3	0.1304	0.1601	0.1650	0.1873	0.1564	0.1764	0.1768	0.1816	0.1816	0.1614	0.1620	0.1772	0.1765	0.1875	0.1737	
	4	0.1534	0.1610	0.1688	0.1635	0.1595	0.1769	0.1667	0.1660	0.1614	0.1693	0.1653	0.1751	0.1542	0.1643	0.1592	
0.25% + H2O2 500µM	1	0.1320	0.1882	0.1556	0.1783	0.1667	0.1761	0.1575	0.1885	0.1686	0.1571	0.1537	0.1855	0.1578	0.1721	0.1747	
	2	0.1821	0.1657	0.1604	0.1795	0.1668	0.1709	0.1641	0.1849	0.1546	0.1447	0.1655	0.1648	0.1733	0.1725	0.1505	
	3	0.1719	0.1632	0.1719	0.1748	0.1596	0.1491	0.1650	0.1589	0.1598	0.1863	0.1781	0.1511	0.1867	0.1877	0.1770	
IC9228	4	0.1608	0.1540	0.1752	0.1745	0.1524	0.1519	0.1848	0.1807	0.1670	0.1819	0.1562	0.1711	0.1854	0.1741	0.1668	
	1	0.1801	0.2003	0.1921	0.2052	0.2268	0.1675	0.2056	0.2164	0.2063	0.2085	0.2245	0.2327	0.2307	0.2248	0.2005	
	2	0.1680	0.1755	0.1963	0.1915	0.1599	0.1476	0.1998	0.1756	0.2021	0.2234	0.1961	0.2101	0.2037	0.1839	0.1870	
0.35% + H2O2 500µM	3	0.1641	0.1757	0.1885	0.1951	0.1538	0.2046	0.1972	0.1860	0.2009	0.1646	0.1857	0.1934	0.1834	0.1812	0.1559	
	4	0.1925	0.1807	0.1706	0.1689	0.1763	0.1778	0.1576	0.1817	0.2038	0.1675	0.2002	0.1866	0.1978	0.1621	0.2078	
	1	0.2174	0.2036	0.1885	0.1930	0.1984	0.1810	0.1953	0.1895	0.1981	0.2113	0.1798	0.1856	0.1954	0.2231	0.1945	
0.5% + H2O2 500µM	2	0.1942	0.1776	0.1641	0.1892	0.1827	0.1744	0.1859	0.1778	0.1971	0.1908	0.1745	0.1763	0.1998	0.1861	0.2105	
	3	0.1776	0.1864	0.2074	0.1944	0.2043	0.1912	0.2462	0.2332	0.2024	0.2040	0.2254	0.2005	0.2191	0.2018	0.1997	
	4	0.1966	0.1831	0.1758	0.1842	0.1761	0.1700	0.1621	0.1845	0.1669	0.1833	0.1926	0.2048	0.1588	0.2068	0.1691	
IC9228	1	0.1939	0.1651	0.1661	0.1995	0.1792	0.1930	0.1959	0.1908	0.1975	0.2078	0.1712	0.1974	0.1880	0.2151	0.1984	
	2	0.2019	0.2248	0.2159	0.2016	0.2365	0.2171	0.2258	0.2349	0.2068	0.2192	0.2357	0.2043	0.1955	0.2308	0.1920	
	3	0.1781	0.1991	0.1894	0.1905	0.1981	0.1944	0.1976	0.1939	0.1935	0.2036	0.1764	0.1709	0.2263	0.1855	0.2013	
0.5% + H2O2 500µM	4	0.2240	0.2132	0.2088	0.1943	0.2088	0.1975	0.2002	0.1987	0.2163	0.2042	0.2127	0.2151	0.2111	0.2097	0.2181	

Grey value = outlier

7.4. Live cell number (RFU)

Fluorescence viability assay:

Plate:1 - Wavelength:540			
0.05	0.30	0.26	0.22
0.05	0.28	0.28	0.24
0.05	0.29	0.27	0.22
0.05	0.28	0.26	0.23
0.31	0.25	0.22	
0.32	0.23	0.24	
0.31	0.22	0.23	
0.31	0.23	0.21	

7.5. Lipid peroxidation rates per treatment

	Well	TBARs/min/cell
non-treated	1	19.3439
cells	2	23.9830
	3	30.0675
	4	25.8965
H2O2 500µM	1	41.2087
	2	37.3466
	3	59.5993
	4	44.7190
IC4024 + H2O2 500µM	1	35.4163
	2	24.1932
	3	28.4132
	4	34.4186
IC9228	1	38.1024
0.25% + H2O2 500µM	2	30.7073
	3	28.4224
	4	23.1394
IC9228	1	34.2727
0.35% + H2O2 500µM	2	27.5670
	3	46.9580
	4	26.9695
IC9228	1	43.8370
0.5% + H2O2 500µM	2	46.5054
	3	40.6907
	4	52.7445

Grey value=outlier

8. References

1. Balaban, R.S., Nemeto, S., Finkel, T., *Mitochondria, oxidative stress and aging*. Cell. 2005. 120:483-95
2. Wallace, D.C., Brown, M.D., Melov, S., *Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging*. Biofactors. 1998. 7:187-90
3. Finkel, T., Hollbrook, N.J., *Oxidants, oxidative stress and biology of aging*. Nature. 2000. 408:239-47
4. Stadtman, E.R., *Protein oxidation and aging*. Science. 1992. 257:1220-24
5. Bossi, O., et al, *UV-irradiation increases ROS production via PKC delta signaling in primary murine fibroblasts*. J Cell Biochem. 2008. 105(1):194-207
6. Paz, M.L., et al, *Mitochondrial function and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes*. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2008. 24(3):115-22
7. Aitken, G.R., et al, *Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCa T keratinocytes*. Clin Exp Dermatol. 2007. 32(6):722-27
8. Wan, G., et al, *Real-world exposure of airborne particulate matter triggers oxidative stress in an animal model*. In J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2010. 2(1):64-68
9. Becker, S., et al, *Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress*. Environ Health Perspect. 2005. 113(8):1032-38
10. Lanuti, E.L., Kirsner, R.S., *Effects of pollution on skin aging*. J Invest Dermatol. 2010. 130(12):2696
11. Vierkötter, A., et al. *Airborne particle exposure and extrinsic skin aging*. J Invest Dermatol. 130(12):2719-26
12. Liu, Y., et al, *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. J Neurochem. 2002. 80:780-87
13. Oliveira, B.F., et al, *The role of oxidative stress in the aging process*. Scientific World Journal. 2010. 10:1121-28
14. Toyokuni, S., *Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology*. Pathol Int. 1999. 49(2):91-102
15. Wertz, P.W., van den Bergh, B., *The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers*. Chem Phys Lipids. 1998. 91(2):85-96
16. Marnett, L.J., *Oxyradicals and DNA damage*. Carcinogenesis. 2000. 21(3):361-70
17. Clayton, D.A., et al, *The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria*. PNAS. 1974. 71:2777-81
18. Schmid, D., Züllig, F., *Mutations in mitochondrial DNA as principal aging factor*. Cosmetics and Toiletries magazine. 2007. 122(1):71-76
19. Loeb, L.A., et al, *The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mt DNA mutations*. PNAS. 102:18769-770
20. Berneburg, M., et al, *Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin*. J Invest Dermatol. 2004. 122:1277-8

9. Archive

All data compiled in the present document have been generated and are conform to ICDD-sas' internal procedures. No deviation from conformity was observed.

Solely, the written copy mentioning "ORIGINAL" is considered as valid. Electronic versions are provided for the convenience of Claudia Gama, LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA, but do not engage the responsibility of ICDD-sas.

A copy of the present report will be kept for a period of at least 10 years. Raw data will be stored for the same period.

June 9 th 2014	Signature
Scientific director Nathalie Compagnone, PhD ICDD-sas	
Study director Clotilde Biscarrat ICDD-sas	
Quality Assurance Nicolas Pelletier ICDD-sas	

10. Appendix

REPORTE

Cribado de la propiedad antioxidante de la mezcla de extractos (M.Dubia, T.Lepidota y P. Bogotensis) hacia la peroxidación de lípidos en fibroblastos primarios humanos
Incluye: estudio preliminar de citotoxicidad

Preparado para

Claudia GAMA

LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA

AUTOPISTA MEDELLÍN KILOMETRO 2,4 VÍA BOGOTÁ- SIBERIA COSTADO NORTE VÍA TITÁN
600 metros PARQUE INDUSTRIAL PORTOS SABANA 80, BODEGA 32
ciudad COTA
país COLOMBIA.

De

ICDD-sas

Nathalie COMPAGNONE, PhD
CSO-CEO

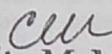
Directora de Estudio Clotilde Biscarrat

100 route des houillères, CS 50014
13590 Meyreuil
FRANCIA

Tel + 33 4 426 128 28

Tabla de contenido

1. Resumen
2. Objetivo del estudio
3. Contexto del estudio
 - 3.1. Descripción de ICDD
 - 3.2. Uso de las Mitocondrias como objetivo cosmético
 - 3.3. Propósito de Mitosafe®
4. Diseño del estudio


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

- 4.1. Elemento de prueba
- 4.2. Concentración probada
- 4.3. Fechas
- 4.4. Descripción del plan de estudio
- 4.5. Criterios de validación
5. Resultados e interpretación
 - 5.1. Estudio preliminar de citotoxicidad
 - 5.2. Viabilidad celular en presencia de 500 μM H_2O_2
 - 5.3. Tasas de peroxidación lipídica
 - 5.4. Nivel de protección de los ingredientes activos del estrés oxidativo inducido por H_2O_2
6. Conclusiones
7. Apéndice
 - 7.1. Disposición de placas
 - 7.2. Citotoxicidad de Mitosecure – Número de células vivas (RAU)
 - 7.3. Disposición de placas TBARS nivel por tratamiento (RFU) – Cinética
 - 7.4. Número de células vivas (RFU)
 - 7.5. Tasas de peroxidación de lípidos por tratamiento
8. Referencias
9. Archivo
10. Apéndice

1. Resumen

OBJETIVO: el objetivo del estudio, realizado por ICDD-sas en nombre de LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA. Claudia Gama, es el análisis de la propiedad antioxidante de 1 ingrediente activo (una mezcla de extractos) hacia la peroxidación lipídica inducida por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en fibroblastos primarios humanos.

MÉTODOS: El compuesto fue recibido y mantenido de acuerdo con las recomendaciones de Claudia Gama. Se utilizó la tecnología de Mitosafe[®], desarrollada por ICDD-sas. Consiste en el estudio de mecanismos integrados que controlan la función mitocondrial dentro de células vivas. En este estudio, el alcance se limitó al análisis de la propiedad antioxidante en tres dosis probadas en fibroblastos primarios humanos. Brevemente, medimos las propiedades antioxidantes del compuesto de prueba hacia la peroxidación lipídica inducida por peróxido de hidrógeno de 500 μM . El análisis de las condiciones experimentales se realizó para comparar sus efectos sobre la peroxidación lipídica con respecto a aquella del ácido elágico, utilizado como compuesto de referencia. Se realizó un estudio preliminar de citotoxicidad para determinar las dosis que se utilizarán en el MitoRead AntiOx TBARS.

CONCLUSIÓN :

La mezcla de extractos (M.Dubia, T.Lepidota y P. Bogotensis) se probó en el bioensayo Mitoread AntiOx TBARS con el fin de analizar su propiedad antioxidante hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos.

El ensayo Mitoread AntiOx TBARS demostró las propiedades antioxidantes de la mezcla probada de extracto, en células sanas sometidas a un estrés oxidativo inducido por 500 μM H_2O_2 . El ingrediente activo fue pre-incubado dentro de las células durante 4 horas, antes de la inducción del estrés oxidativo. Los valores de las propiedades antioxidantes o pro-oxidantes se expresan en la tabla de resumen a continuación.

CMM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Página 2 de 11

DE C
30
TARIA TRE
BOGOTÁ D
NOTARIO
2 AUGUS

La **mezcla de extractos** a 0.35% fue la dosis más eficiente con 77% de protección, y a 0.25%, fue la dosis más potente con 74% de protección. Estos efectos fueron similares a aquellos del ácido Elágico. En la dosis de ambas pruebas, la mezcla de extraído agravó la pérdida celular inducida por H_2O_2 , a un nivel muy leve cuando se utiliza en un 0,25% y a un nivel comparable al observado con ácido Elágico al 0,35%. Por lo tanto, en el contexto de la muerte celular inducida por un fuerte estrés oxidativo, el uso de la mezcla de extracto en 0.25% fue más eficiente en la reducción de TBARS inducido por H_2O_2 , y menos tóxico que el ácido Elágico, un compuesto antioxidante de referencia.

La **mezcla de extractos** al 0.5%, no mostró ningún efecto antioxidante hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 , y pérdida celular oxidativa agravada inducida por estrés por un 33%.

Ingrediente Activo	Concentración	Efecto hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos	Efecto sobre la viabilidad celular después del tratamiento con H_2O_2 de 500 μ M
Ácido Elágico	100 μ M	Antioxidante 72% (p=0.034)	→ 30% (p=0.000)
La mezcla de extractos	0,25%	Antioxidante 74% (p=0.035)	→ 16% (p=0.000)
	0,35%	Antioxidante 77% (p=0.45)	→ 32% (p=0.000)
	0,5%	Inactivo	→ 33% (p=0.000)

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

2. Objetivo del estudio

El estudio tiene como objetivo la comparación del potencial antioxidante de 1 ingrediente activo, hacia la peroxidación lipídica inducida por peróxido de hidrógeno frente al del compuesto de referencia, el ácido Elágico, utilizando la tecnología Mitosafe[®]. Este cribado se realizó en fibroblastos primarios humanos.

3. Contexto del estudio

3.1. Descripción de ICDD

ICDD-sas es una empresa biotecnológica que realiza contratos de investigación para la industria cosmética. ICDD-sas utiliza su experiencia para medir y decodificar las funciones mitocondriales, utilizando la tecnología de Mitosafe[®]. ICDD-sas evalúa la eficiencia y la inocuidad de los ingredientes activos destinados a ser utilizados en formulaciones cosméticas.

3.2. Uso de las mitocondrias como objetivo cosmético

La reciente comprensión de que el deterioro mitocondrial es fundamental para describir el proceso de envejecimiento ([1],[2],[3]) ha suscitado un interés considerable en un nuevo enfoque antienvjecimiento que implica el desarrollo de moléculas dirigidas a disfunciones mitocondriales. En este sentido, ICDD-sas ha generado herramientas que permiten el cribado de ingredientes activos que podrían impactar y mejorar los procesos mitocondriales involucrados en el envejecimiento de la piel. Se pueden realizar varios ensayos de forma aislada o en combinación para evaluar la viabilidad celular, la producción reactiva de especies de oxígeno, la producción de ATP, el consumo de oxígeno, la peroxidación lipídica, así como el agotamiento del ADNmt.

El estrés oxidativo generado por los factores ambientales es una causa básica de la disminución progresiva asociada a la edad en las funciones tisulares ([1],[2],[4]). Evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos con los ensayos actuales, (H)ORAC, no es óptimo porque es independiente del entorno celular y las interacciones intracelulares. Debido a que casi el 90% de la producción de ROS asociada a la edad es de origen mitocondrial ([1],[3]), los ensayos que integran el estudio de las funciones mitocondriales en las células vivas son más relevantes. Por lo tanto, la tecnología Mitosafe[®] ofrece una alternativa a los ensayos bioquímicos actuales para analizar y detectar ingredientes naturales de acuerdo con sus desempeños hacia metas celulares y/o mitocondriales.

3.3. Propósito de Mitosafe[®]

Los ensayos Mitosafe[®] son bioensayos integrados funcionalmente que generan resultados multiplexados que describen el equilibrio energético mitocondrial, el estado reducido y la biogénesis mitocondrial en respuesta a compuestos activos. La gama MitoRead, que utiliza la tecnología

Mitosafe[®], está ajustada para aportar información rápida y relevante sobre el potencial de los compuestos para proteger las mitocondrias de las agresiones y disfunciones. Estos ensayos *in cellulo* proporcionan una alternativa a la experimentación animal.

Factores ambientales como los rayos UV ([5],[6],[7]) y la contaminación ([8],[9],[10],[11]) ralentizan el funcionamiento celular y mejoran el estrés oxidativo celular, lo que resulta en un envejecimiento prematuro de la piel. Las ROS intracelulares se forman principalmente por disfunciones en la cadena de transferencia de electrones mitocondriales (ETC) ([1]). Los ROS incluyen oxígeno singlete, anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno. Están involucrados en lesiones a moléculas biológicas incluyendo lípidos, proteínas y ADN ([12],[13],[14]). En este sentido, el ADN mitocondrial es particularmente vulnerable debido a su proximidad al ETC mitocondrial, su falta de histonas y sus limitadas capacidades de reparación ([15]). La mutagénesis inducida por ROS de ADNmt está relacionada causalmente con la reducción de la producción de energía, el aumento del estrés oxidativo, la disminución de las funciones mitocondriales y, en última instancia, con el proceso de envejecimiento cutáneo ([16],[17],[18]). Eso explica por qué los ROS asociados a la edad mitocondrial se consideran elementos clave en el mecanismo de señalización del estrés y envejecimiento de la piel. En consecuencia, la investigación sobre las posibles propiedades antioxidantes de los principios activos examina sus capacidades para reducir la producción de ROS mitocondrial en respuesta a agentes pro-oxidantes, y para proteger las células contra las disfunciones mitocondriales.

El ensayo MitoRead AntiOx TBARS consiste en la cuantificación de la propiedad antioxidante de los ingredientes activos hacia la peroxidación lipídica inducida por un agente oxidativo, peróxido de hidrógeno, en células vivas. La validación de estos resultados como predictor del potencial antioxidante se obtuvo de la validación experimental, con el compuesto de referencia, ácido Elágico.

4. Diseño del estudio

4.1. Elemento de prueba

LABORATORIOS MYN Y CIA LTDA proporcionó a ICDD-sas 1 ingrediente activo. Fue preparado el 20 de mayo 2014 de acuerdo con las recomendaciones de Claudia Gama acerca del disolvente apropiado y en las concentraciones descritas a continuación

Tras la recepción, se atribuyó un número de código a cada compuesto según el procedimiento de codificación interna (CQ-P-04).

Compuesto	Mezcla de M.Dubia, T.Lepitoda y Bogotensis
Código ICDD	IC9228
Número de lote	NB00406-2014
Peso despachado	20 gr
Temperatura de almacenamiento	+4 °C

Después de la aprobación del presente informe, los productos serán destruidos al final de un período de 6 meses a menos que el patrocinador indique lo contrario por escrito. En el caso de que la parte ordenante solicite la devolución de los elementos de prueba, es su responsabilidad organizar y programar la recogida de los elementos de prueba en ICDD utilizando los medios de transporte elegidos, a su propio costo.

4.2. Concentración probada

El ingrediente activo fue probado por primera vez en las siguientes concentraciones en el estudio preliminar de citotoxicidad, según el plan de estudio firmado por ambas partes el 19 de mayo de 2014.

Compuesto	Código ICDD	Concentraciones Probadas
Mezcla de M.Dubia, T.Lepitoda y Bogotensis	IC9228	0,5% - 0,35% - 0,25% - 0,15% - 0,05%

Las siguientes concentraciones: 0,25%, 0,35%, 0,5%, fueron elegidas después del estudio de citotoxicidad para las pruebas en los Mitoread AntiOx TBARS de acuerdo con el plan de estudio firmado por ambas partes el 22 de mayo de 2014. Se aplicaron procedimientos similares a los compuestos de referencia, DMSO (IC4000), H₂O₂ (IC4010) y ácido Elágico (IC4024), proporcionados por ICDD. La mezcla de extractos se probó en presencia de 0,5% DMSO independientemente del vehículo.

Compuesto	Código ICDD	Concentraciones Probadas
DMSO	IC4000	0,5%
H ₂ O ₂	IC4010	500 µM
Ácido Elágico	IC4024	100 µM
Mezcla de M.Dubia, T.Lepitoda y Bogotensis	IC9228	0,25%

[Logo]		Reporte Número: RR1412-CTL27-140602 02-Junio-2014
		0,35%
		0,5%

4.3. Fechas

Los estudios se han realizado del 19 al 29 de mayo de 2014 en las instalaciones de ICDD-sas.

4.4. Descripción del plan de estudio

Células utilizadas

Los fibroblastos primarios humanos se cultivaron según el SOP – (*Procedimiento de Operación Estándar por sus siglas en inglés*) ME-MO-02. No se observó ninguna desviación en las condiciones de cultivo celular.

Estudio preliminar: Metodología Mitosecure de Citotoxicidad

El análisis se realizó de acuerdo con el SOP ME-MO-06. Consiste en la cuantificación del potencial citotóxico de los elementos de ensayo utilizando colorimetría. Las células se pre-incubaron a 37 °C durante 24 horas con el vehículo solamente (DMSO) o los elementos de ensayo en las concentraciones determinadas. Después del lavado, las células se incubaron con la solución de tinte MTT a 37 °C, evaluando la viabilidad celular. Después de la incubación, se añadió la solución de solubilización/parada y la absorbancia se registró inmediatamente utilizando un lector de microplacas (Varioskan-Thermo). El experimento incluyó un control en blanco y negativo. El control negativo consistió en cultivos tratados con el vehículo, DMSO (IC4000). Todos los elementos de prueba fueron probados en cuadruplicados. Sus efectos citotóxicos se compararon con el control negativo.

Metodología Mitoread AntiOx TBARS

El análisis se realizó de acuerdo con el SOP ME-MO-42 ("Mitoread AntiOx TBARS in fibroblasts"). Consiste en la cuantificación de la actividad antioxidante de los ingredientes hacia la peroxidación lipídica utilizando un tinte fluorescente. En primer lugar, las células fueron pre-incubadas con el compuesto de referencia antioxidante, el ácido Elágico 100 µM, o los ingredientes activos en las concentraciones determinadas durante 4 horas. Después del lavado, las células fueron incubadas con la sonda fluorescente a 37 °C durante 30 minutos. Después del lavado, las células fueron incubadas con el compuesto de referencia pro-oxidante, H₂O₂ 500 µM. La peroxidación lipídica se registró inmediatamente dinámicamente durante 60 minutos. La fluorescencia se registraba cada dos minutos utilizando un lector de microplacas (Varioskan-Thermo). Las células se mantuvieron a 37 °C durante el circuito cinético. El análisis de la actividad antioxidante se multiplexó para la medición de la viabilidad celular, utilizando espectrofotometría. Los experimentos incluyeron controles en blanco, negativos y positivos. El control negativo consistió en cultivos tratados sólo con el compuesto de referencia pro-oxidante, peróxido de hidrógeno. La pre-incubación con el compuesto de referencia antioxidante, el ácido Elágico, seguido por el tratamiento con peróxido de hidrógeno formó el control positivo. Todos los ingredientes activos fueron probados en cuadruplicados. Sus efectos se compararon simultáneamente con los controles negativos y positivos.

Adquisición de datos

Los datos fueron registrados por el software SkanIt (Thermo) y fueron formateados en una tabla de Excel (adjunta en el apéndice).

Interpretación de datos

Los datos expresaron la tasa de peroxidación lipídica por célula para cada condición experimental de acuerdo con la disposición de la placa (proporcionada en el apéndice). Los efectos antioxidantes de los compuestos se expresaron como una relación de protección en comparación con el tratamiento con el compuesto pro-oxidante solamente (control negativo) y las células no tratadas. El efecto del control positivo se incluyó para la comparación.

Almacenamiento de datos

Los datos sin procesar se almacenaron de acuerdo con nuestro SOP – (*Procedimiento de Operación Estándar por sus siglas en inglés*). Los datos sin procesar formateados se proporcionan en el apéndice.

4.5. Criterios de validación

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Sólo se ha habilitado personal calificado para realizar el presente estudio. El estudio fue realizado por Pauline Picamal, Técnico y Clotilde Biscarrat, Gerente de Proyecto.

Según nuestro SOP ME-MO-42, el experimento se consideró validado. Se cumplieron todos los criterios de validación.

Experimento	SOP	Criterios de validación	Resultados
Mitoread AntiOx TBARS en fibroblastos	ME- MO-42	El H ₂ O ₂ de 500 µM induce una peroxidación lipídica significativa en comparación con el control negativo	Cumplido: Inducción significativa de peroxidación lipídica por H ₂ O ₂ de 500 µM, p=0.007
		El ácido Elágico de 100 µM disminuye significativamente la peroxidación lipídica inducida por el H ₂ O ₂ de 100 µM	Cumplido: Disminución significativa de la peroxidación lipídica inducida por H ₂ O ₂ de 500 µM, p=0.034

Se realizó un análisis de prueba t de estudiante para determinar el nivel de significancia de la amplitud de los cambios en los diferentes parámetros medidos, en las condiciones experimentales probadas con respecto a los controles negativos (propiedades pro-oxidantes) y positivos (propiedades antioxidantes). Todos los datos estadísticos se generaron utilizando el software SPSS.

5. Resultados e interpretación

5.1. Estudio preliminar de citotoxicidad

Los fibroblastos primarios humanos se pre-incubaron durante 24 horas con el vehículo DMSO al 0,5% o con el ingrediente activo probado en las concentraciones citadas anteriormente. Al final de la pre-incubación, la viabilidad celular se midió utilizando un método espectrofotométrico, basado en la actividad mitocondrial succinato deshidrogenasa.

Los perfiles de viabilidad celular se muestran en la figura 1. El análisis de la prueba t de estudiante mostró diferencias significativas entre las condiciones experimentales estudiadas.

[Gráfica]

Figura 1 : Efectos del ingrediente activo en la viabilidad celular en fibroblastos primarios humanos. Nivel de significancia en comparación con las células no tratadas. $p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$. Las barras son SEM

La tabla 1 a continuación resume los efectos de los ingredientes activos probados en la viabilidad celular en comparación con las células no tratadas y su potencial citotóxico.

Compuesto	Dosis	Efecto sobre la viabilidad celular en comparación con el control negativo	Potencial citotóxico medio (%)	Interpretación
Mezcla de extractos	0,05%	→ *	3,40	No citotóxico
	0,15%	≈ NC	-	No citotóxico
	0,25%	≈ NC	-	No citotóxico
	0,35%	→ **	8,18	Citotoxicidad muy leve
	0,50%	→ *	9,16	Citotoxicidad muy leve

≈ NC : comparable al control negativo (células no tratadas)

Tabla 1: Efectos del ingrediente activo en la viabilidad celular en fibroblastos primarios humanos luego de una incubación de 24 horas. ≈ NC : comparable con el control negativo (células no tratadas). $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$.

En primer lugar, en las tres primeras dosis probadas, 0,05%, 0,15% y 0,25% la mezcla de extractos no cambió significativamente la viabilidad celular en comparación con las células no tratadas. En segundo lugar, en las dos dosis más altas probadas, 0,35% y 0,5%, la mezcla de extractos fue responsable de una citotoxicidad muy leve con 8,18% y 9,16% respectivamente de muerte celular en comparación con las células no tratadas, en fibroblastos primarios humanos ($p = 0.007$ y $p = 0.043$ respectivamente). Este nivel muy leve de citotoxicidad también podría derivar de la diferencia de siembra o de imprecisiones analíticas.

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Las siguientes concentraciones fueron elegidas para realizar el ensayo Mitoread AntiOx TBARS:

Compuesto	Código ICDD	Concentraciones Probadas
Extracto de Myrciaria Dubia	IC9213	0,25% / 0,35% / 0,5%

5.2. Viabilidad celular en presencia de H₂O₂ de 500 µM

Los fibroblastos primarios humanos se pre-incubaron durante 4 horas sin elemento de prueba o con el ingrediente activo probado en las dosis citadas anteriormente. Después del lavado, las células fueron tratadas con H₂O₂ de 500 µM durante el ciclo cinético. Luego evaluamos la viabilidad celular utilizando un método espectrofotométrico, basado en la actividad mitocondrial succinato deshidrogenasa.

La figura 2 muestra los efectos de la pre-incubación con el ingrediente activo seguido de incubación con el tratamiento pro-oxidativo, H₂O₂ de 500 µM, en la viabilidad celular, en fibroblastos primarios humanos.

El análisis de la prueba t de estudiante mostró diferencias significativas entre las condiciones experimentales estudiadas.

La figura 2 muestra que el tratamiento pro-oxidativo con H₂O₂ de 500 µM disminuyó significativamente la viabilidad celular en un 8,8% en comparación con los fibroblastos primarios humanos no tratados ($p = 0.005$). La pre-incubación con ácido Elágico de 100 µM seguido del tratamiento con H₂O₂ de 500 µM aumentó la muerte celular inducida por H₂O₂ al 30,1% en comparación con las células no tratadas ($p = 0.000$).

[Gráfica]

Figura 2: Efectos de los elementos de ensayo y H₂O₂ de 500 µM en la viabilidad celular en fibroblastos primarios humanos con calceína. Nivel de significancia en comparación con las celdas no tratadas, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Las barras son SEM

La tabla 2 a continuación resume los resultados obtenidos con las diferentes condiciones del elemento de prueba en la viabilidad celular.

Ingrediente activo	Concentración	Efecto sobre la viabilidad celular después del tratamiento con H ₂ O ₂ de 500 µM
H ₂ O ₂	500 µM	→ ** 8,80%
Ácido Elágico	100 µM	→ ** 30,10%
Mezcla de extractos	0,25%	→ ** 16,75%
	0,35%	→ ** 32,60%
	0,50%	→ ** 33,52%

Tabla 2: Efectos del elemento de prueba en la viabilidad celular en fibroblastos primarios humanos. Sólo se representan efectos significativos

La mezcla probada de extracto indujo una menor viabilidad celular en comparación con las células tratadas con H₂O₂ la cual evoluciona a partir de un aumento de 1,9 veces al 0,25% a 3,8 veces al 0,5%. Fue comparable a las dos dosis más altas probadas y también comparable a la inducida por el ácido Elágico (3,4 veces el aumento). En presencia de estrés oxidativo, la mezcla de extracto fue por lo tanto ineficiente en la restauración de la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

5.3. Tasas de peroxidación lipídica

Los fibroblastos primarios humanos fueron pre-incubados con el compuesto de referencia antioxidante, el ácido Elágico de 100 µM, o los ingredientes activos durante 4 horas. Tras el lavado, las células fueron tratadas con el compuesto de referencia pro-oxidante, H₂O₂ de 500 µM. Simultáneamente a la inducción del estrés oxidativo, el nivel de peroxidación lipídica se evaluó a través de la medición dinámica de la producción de TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico), subproductos de la peroxidación lipídica, durante 60 minutos. Las tasas de peroxidación lipídica (TBARS/min/célula) se calcularon para cada well y cada condición experimental en los fibroblastos primarios humanos una regresión lineal a los perfiles cinéticos.

La figura 3 representa el perfil de todos los ingredientes activos en los fibroblastos primarios humanos.

El análisis de la prueba t de estudiante mostró diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales.

[Gráfica]

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Figura 3: Efectos del elemento de ensayo y del compuesto de referencia en la tasa de peroxidación lipídica por célula inducida por H_2O_2 de 500 μM en fibroblastos primarios humanos. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Las barras son SEM

Los efectos del control negativo de H_2O_2 de 500 μM , y el control positivo de ácido Elágico de 100 μM , fueron validados en fibroblastos primarios humanos, induciendo respectivamente una inducción TBARS de 1,84 veces ($p = 0.007$) con tratamiento H_2O_2 , que se redujo por el ácido Elágico en 0,67 veces. El nivel de TBARS en las células tratadas con ácido Elágico, en las que el estrés oxidativo fue inducido por H_2O_2 de 500 μM , sólo fue moderadamente elevado en comparación con las células en las que no se indujo estrés oxidativo (33 %) ($p = 0.034$).

La tabla 3 a continuación resume el efecto del ingrediente activo probado hacia el estrés oxidativo celular inducido por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos.

Ingrediente Activo	Concentración	Efecto hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos
Mezcla de extractos	0,25%	Antioxidante 74% ($p = 0.035$)
	0,35%	Antioxidante 77% ($p = 0.45$)
	0,5%	Inactivo

Tabla 3: Efectos comparativos de los elementos de prueba en la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos.

- La **Mezcla de extractos**, en las dos dosis más bajas probadas, 0,25% y 0,35%, mostró un efecto antioxidante similar y significativo reduciendo la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en 0.76 veces en promedio ($p = 0.035$ y $p = 0.045$). En la dosis más alta, 0.5%, la mezcla de extractos estaba inactiva y dejó la tasa de peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 sin modificaciones.

5.4. Nivel de protección de los ingredientes activos del estrés oxidativo inducido por H_2O_2

La figura 4 muestra el nivel de protección conferido hacia el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , por el ingrediente activo probado a los fibroblastos primarios humanos. Este nivel de protección se expresa como un porcentaje. Se calcula mediante una relación que posiciona el efecto de cada compuesto probado en una escala derivada del valor de las células no tratadas (100% de protección) y aquel del estrés oxidativo inducido por H_2O_2 (0% de protección). Por lo tanto, realizando las abstracciones de diferentes métricas en las que se expresan las concentraciones, el nivel de protección de H_2O_2 inducido por H_2O_2 conferido por los elementos de ensayo en fibroblastos (en porcentaje) es directamente comparable y se puede utilizar para clasificar el compuesto entre sí para la eficacia en referencia al control positivo, el ácido Elágico de 100 μM . Los compuestos o dosis con actividad pro-oxidante mostrarán un valor de protección negativo.

[Gráfica]

Figura 4: Protección antioxidante de cada elemento de ensayo, pre-incubado durante 4 horas, hacia la peroxidación lipídica celular inducida por H_2O_2 de 500 μM en fibroblastos primarios humanos

El ácido Elágico de 100 μM , confirió una protección antioxidante hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 del 72% ($p = 0.034$). Sin embargo, este resultado debe ser mitigado por el hecho de que el ácido Elágico no rescata la viabilidad celular inducida por H_2O_2 de 500 μM .

La **mezcla de extractos** al 0,35% fue la dosis más eficiente con 77% de protección. Sin embargo, este resultado debe ser mitigado por la falta de rescate de viabilidad celular obtenido después de la incubación con H_2O_2 de 500 μM . La mezcla de extractos al 0,25% fue la dosis más potente con 74% de protección, este efecto fue superior a ese ácido Elágico.

La **mezcla de extractos** al 0.5%, no mostró ningún efecto antioxidante ni pro-oxidante hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 .

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

6. Conclusiones

La mezcla de extractos (M.Dubia, T.Lepidota y P. Bogotensis) se probó en el bioensayo Mitoread AntiOx TBARS con el fin de analizar su propiedad antioxidante hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos.

El ensayo Mitoread AntiOx TBARS demostró las propiedades antioxidantes de la mezcla probada de extracto, en células sanas sometidas a un estrés oxidativo inducido por H_2O_2 de 500 μM . El ingrediente activo fue pre-incubado dentro de las células durante 4 horas, antes de la inducción del estrés oxidativo. Los valores de las propiedades antioxidantes o pro-oxidantes se expresan en la tabla de resumen a continuación.

La **mezcla de extractos** al 0,35% fue la dosis más eficiente con 77% de protección, y en 0,25%, fue la dosis más potente con 74% de protección. Estos efectos fueron similares a los del ácido Elágico. En la dosis de ambas pruebas, la mezcla de extractos agravó la pérdida celular inducida por H_2O_2 , a un nivel muy leve cuando se utilizó al 0,25% y a un nivel comparable al observado con el ácido Elágico al 0,35%. Por lo tanto, en el contexto de la muerte celular inducida por un fuerte estrés oxidativo, el uso de la mezcla de extracto al 0.25% fue más eficiente en la reducción de TBARS inducidas por H_2O_2 , y menos tóxico que el ácido Elágico, un compuesto antioxidante de referencia.

La **mezcla de extractos** al 0.5%, no mostró ningún efecto antioxidante hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 , y agravó la pérdida celular oxidativa inducida por estrés en 33%.

Ingrediente activo	Concentración	Efecto hacia la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 en fibroblastos primarios humanos	Efecto sobre la viabilidad celular después del tratamiento con H_2O_2 de 500 μM
Ácido elágico	100 μM	Antioxidante 72% ($p = 0.034$)	→ 30% ($p = 0.000$)
La mezcla de extractos	0,25%	Antioxidante 74% ($p = 0.035$)	→ 16% ($p = 0.000$)
	0,35%	Antioxidante 77% ($p = 0.45$)	→ 32% ($p = 0.000$)
	0,5%	Inactivo	→ 33% ($p = 0.000$)

7. Apéndice

7.1. Disposición de placas

Citotoxicidad de mitosecure

[Tabla]

Antioxidación Mitoread TBARS

[Tabla]

7.2. Citotoxicidad de Mitosecure – Número de células vivas (RAU)

[Tabla]

7.3. Disposición de placas TBARS nivel por tratamiento (RFU) – Cinética

[Tabla]

7.4. Número de células vivas (RFU)

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



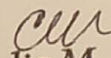
CR/14/MYN01: Análisis de los efectos de dos elementos de prueba y un producto terminado sobre la producción de interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa y prostaglandina E2 por queratinocitos con un fenotipo inflamatorio

Informe final No. CR / 14 / MYN01 según cotización 17_05_2013 V3

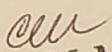
StratiCELL SA

PATROCINADOR: Laboratorios MyN y Compañía Ltda
Sra. Claudia Patricia Gama
calidad@neyber.co

La información contenida en este informe es confidencial y no se divulgará sin la autorización por escrito del Patrocinador. En caso de mayor acuerdo y colaboración, StratiCELL se compromete a no revelar ninguno de los resultados, prácticas de trabajo o funciones que se les hayan transmitido durante el curso de este trabajo.


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

OBJETIVOS DEL ESTUDIO	Análisis de los efectos de dos elementos de prueba y un producto terminado sobre la producción de interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa y prostaglandina E2 por queratinocitos con un fenotipo inflamatorio
REFERENCIA DE COTIZACIÓN	Laboratorios MyN y Compañía Ltda 17_05_2013 V3
REFERENCIA INTERNA DEL ESTUDIO	CR/14/MYN01
PATROCINADOR	Laboratorios MyN y Compañía Ltda Autop. Med Km 2,4 Vía titán 600 mts Portos Sabana 80 Bodega 32 Bogotá, Colombia
REPRESENTANTE DEL PATROCINADOR	Sra. Claudia Patricia Gama
INSTALACIONES DE PRUEBA	StratiCELL SA Parc Scientifique Crealys Rue Jean Sonet 10 5032 Isnes, Bélgica
PERSONAL CIENTÍFICO	Sra. Virginie Brumenil
DIRECTOR DEL ESTUDIO	Aline Chrétien, Ph.D.
FECHA DE INICIO DEL ESTUDIO	2 de julio de 2014
FECHA DE FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO	5 de agosto de 2014
FECHA DE TRANSMISIÓN DEL INFORME	13 de agosto de 2014


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



1. Objetivos del estudio

El estudio tiene como objetivo medir los efectos de dos elementos de prueba y un producto terminado sobre la liberación de mediadores inflamatorios. Este estudio se realizó en cultivos monocapa de queratinocitos humanos primarios en la inflamación inducida por PMA. Se utilizó una epidermis reconstituida como sistema de administración del producto terminado.

Los mediadores analizados se enumeran en la tabla a continuación:

Mediadores inflamatorios objetivo
<i>Interleucina 6 (IL-6)</i>
<i>Prostaglandina E2 (PGE2)</i>
<i>Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)</i>

La inducción de inflamación por PMA y la cinética de los experimentos se han optimizado de acuerdo con los objetivos. Para PGE₂, el fenotipo inflamatorio se indujo mediante un tratamiento con Acetato de Miristato de Forbol (PMA *por sus siglas en inglés*). Para inducir la liberación de TNF- α , los cultivos se trataron con PMA combinado con el ionóforo de calcio A23187. Para IL-6, los cultivos se trataron con PMA combinado con el ionóforo de calcio en un medio de cultivo, con complemento de calcio a 0,8 mM.

Los efectos de los elementos de prueba y el producto terminado se compararon con moléculas de referencia, es decir, dexametasona e indometacina.

Se realizó la cuantificación de los mediadores inflamatorios mediante ELISA.

2. Instalación de pruebas

El estudio se realizó en los Laboratorios StratiCELL en Parc Créalys, rue Jean Sonet, 10, 5032 ISNES, Bélgica. Virginie Brumenil realizó los ensayos con muestras biológicas y el informe de los resultados.

3. Elementos de prueba

3.1. Registro, manipulación y almacenamiento

El Patrocinador suministró los elementos de prueba. A su llegada, el 2 de julio de 2014, los elementos de prueba fueron inspeccionados, etiquetados y registrados por Virginie Brumenil, y almacenados de acuerdo con las especificaciones del Patrocinador que se enumeran en la siguiente tabla.



CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Elementos de prueba	Lote	Solubilidad	Cantidad	Almacenamiento
Mezcla M. dubia, T. lepidota y P. bogotensis.	NB00406 - 2014	Medio de cultivo	50 g	4° C
Extracto de hoja de Phytolacca bogotensis	280114			
Crema anedad para piernas cansadas	250514 - 3 - 2	NA		

3.2. Almacenamiento tras la finalización del estudio

Una vez finalizado el estudio, StratiCELL mantendrá los elementos de prueba sobrantes en condiciones de almacenamiento controladas. Si no se ha recibido ninguna recomendación del Patrocinador 6 meses después del informe final, se destruirán los elementos. A solicitud, se devolverán al Patrocinador (los costos de envío se cobrarán al Patrocinador) o se guardarán para almacenamiento a largo plazo.

4 Metodología

4.1. Cultivo de células

El estudio se realizó utilizando cultivos monocapa de queratinocitos epidérmicos derivados del prepucio humano normal (NHEKs por su sigla en inglés). Las células se cultivaron en medio Epilife que contenía gentamicina y componentes del kit HKGS (Complementos de Crecimiento de Queratinocitos Humanos) añadidos por separado, a excepción de la hidrocortisona inhibidora PLA-2, que no se incluyó en el medio de cultivo. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

El producto terminado se aplicó sobre Epidermis Humana Reconstituida (StratiCELL®, RHE / 001, lote VB0714/1), que se pone en contacto con los cultivos de queratinocitos NHEKs monocapa durante el tratamiento. Los tejidos se cultivaron en la interfaz aire-líquido durante 14 días antes del experimento en un medio de cultivo adecuado en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂. La ficha técnica de RHE/001 se presenta en el anexo 1 del informe.

Células, medios y reactivos	Tipos	Proveedores	Referencias de catálogo
Queratinocitos (NHEKs)	Células	Lonza	CC-2507
Epilife	Medio de cultivo	Invitrogen	M-Epi-500-A
HKGS	Suplemento	Invitrogen	S-001-5
Kit HKGS	Suplemento	Invitrogen	S-001-K
Gentamicina	Antibiótico	Invitrogen	15710-049
CaCl ₂	Suplemento	Merck	1.02378.0500
FGF-7, KGF	Suplemento	R&D Systems	251-KG
Ácido ascórbico	Suplemento	VWR	83568-180

4.2 Determinación de las concentraciones de prueba de trabajo de los elementos de prueba.

Se realizó un estudio preliminar para determinar las concentraciones de prueba óptimas de los dos elementos de prueba (*mezcla de M. dubia*, *T. lepidota* y *P. bogotensis* y extracto de hoja de *Phytolacca bogotensis*) que se aplicarán en el medio de cultivo de células NHEK. Las células se sembraron en placas de 24 wells, 24 horas antes del tratamiento con las diferentes concentraciones de los elementos de prueba.

Se utilizó SDS al 0,008% como control positivo de citotoxicidad para validar el experimento.

Este estudio evaluó la viabilidad celular usando el ensayo MTS (3- (4,5-dimetiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) después de 26 horas de contacto con los elementos de prueba. Se ha realizado con base en 5 concentraciones, por triplicado (n=3).

Con respecto al producto terminado, no se ha realizado ningún ensayo de citotoxicidad preliminar. Las células y la viabilidad de RHE/001 se evaluaron al final del experimento utilizando el ensayo MTS.

Moléculas	Tipo	Proveedores	Referencias	Concentración
MTS	Reactivo	Promega	G3581	/
SDS	Reactivo	VWR	444464T	0.008 %

Al final del experimento, se seleccionaron 2 concentraciones no citotóxicas de acuerdo con el Patrocinador para nuevos experimentos ELISA.

Las concentraciones probadas se enumeran en la siguiente tabla:

Elementos de prueba	Concentraciones probadas (%)
Mezcla <i>M. dubia</i> , <i>T. lepidota</i> y <i>P. bogotensis</i> .	1,5 - 0,75 - 0,375 - 0,188 -
Extracto de hoja de <i>Phytolacca bogotensis</i>	0,094

4.3 Inducción del fenotipo inflamatorio en cultivo de queratinocitos NHEK y tratamiento con los elementos de prueba y de referencia

4.3.1 Consideraciones cinéticas

Para la cuantificación de PGE₂, se indujo la inflamación mediante un tratamiento con PMA (10 ng/ml) durante 24 horas. Para inducir la liberación de TNF- α , se requirió un tratamiento tanto con PMA

como con ionóforo de calcio A23187 (2, μ M). Para la inducción de IL-6, se realizó un tratamiento tanto con PMA como con ionóforo de calcio en medio de cultivo complementado con calcio a 0,8 mM.

Las moléculas de referencia fueron dexametasona (10 μ M) e indometacina (10 μ g/ml).

Las células se trataron con los elementos de prueba y de referencia durante 2 horas antes y durante la inducción de PMA/A23187.

- Se solubilizaron los dos elementos de prueba (*mezcla de M. dubia*, *T. lepidota* y *P. bogotensis* y extracto de hoja de *Phytolacca bogotensis*) directamente en el medio de cultivo de los queratinocitos NHEK.
- El producto terminado se aplicó tópicamente sobre una epidermis humana reconstruida (2 mg/cm²) utilizada como sistema de liberación, colocada sobre la monocapa de NHEKs. El "control sin tratar", el "control inducido" y la "condición inducida tratada con la molécula de referencia" en el medio de cultivo se cultivaron junto con el sistema de suministro vacío (RHE sin tratar) por el tiempo que duró del experimento (26 h). En la siguiente figura se presenta el esquema de la aplicación.

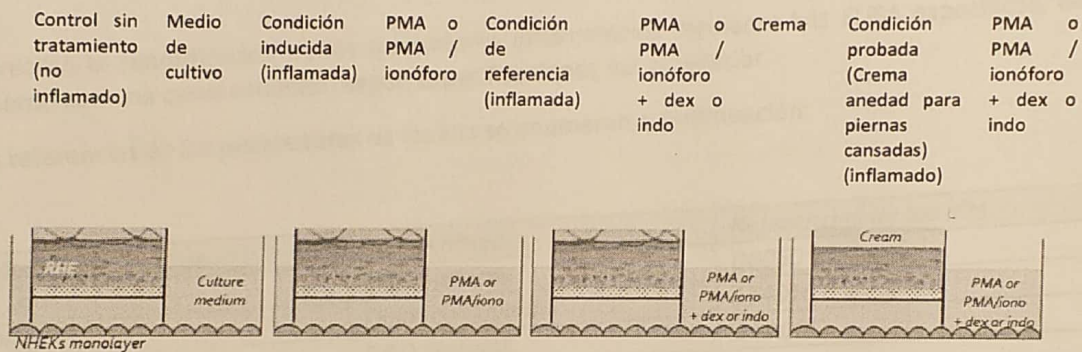
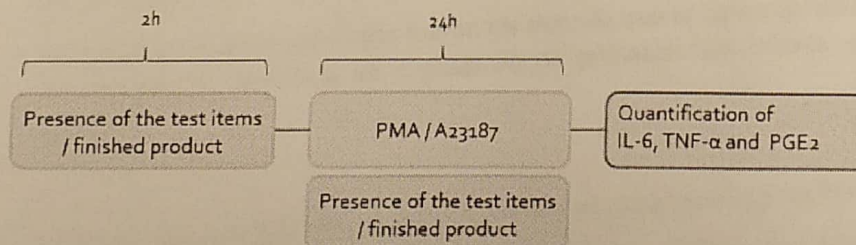


Figura 1: Esquema de aplicación del producto terminado y moléculas de referencia.

Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron al final del experimento y se almacenaron a -20°C. Cada condición se ha realizado por triplicado (n=3).

A continuación se observa la cinética seguida para ambos tipos de tratamientos (elementos de prueba y productos terminados).



CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

En la siguiente tabla se observan los elementos de referencia y las moléculas utilizadas para inducir el fenotipo inflamatorio:

Moléculas	Tipo	Proveedor	Referencias de catálogo	Solventes	Concentraciones
Dexametasona	Reactivo	Sigma	D2915	H2O	10 μ M
Indometacina	Reactivo	Sigma	I7378	Etanol	10 μ g / ml
Acetato de miristato de forbol (PMA)	Reactivo	Sigma	79346	H2O	10 ng / ml
Ionóforo de calcio A23187	Reactivo	Sigma	C7522	DMSO	2 μ M

4.3.2 Cuantificación de los mediadores inflamatorios

Se realizó la cuantificación de los marcadores inflamatorios mediante kits ELISA específicos, de acuerdo con una curva estándar, según especificaciones del proveedor.

Las referencias de los proveedores de los kits se enumeran a continuación:

Moléculas objetivo	Proveedores	Referencias de los kits
IL-6	R&D Systems	D6050
PGE ₂	Químico Cayman	514010
TNF- α	R&D Systems	DTA00C

5. Resultados

5.1 Experimento de búsqueda de dosis para los dos elementos de prueba solubles

Para optimizar las concentraciones de los elementos de prueba, se ha realizado un estudio de citotoxicidad, sobre la base de 5 concentraciones.

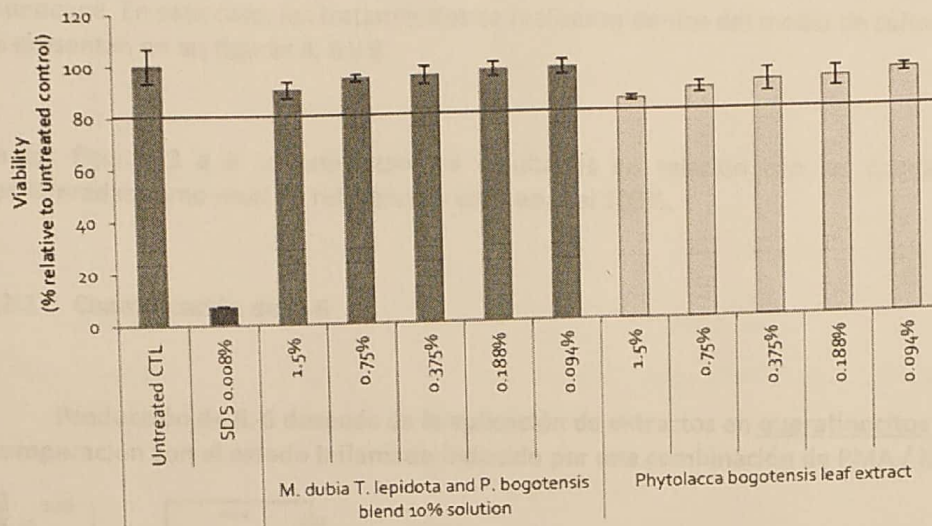
Los parámetros experimentales fueron los mismos que se aplicaron para las medidas de liberación de citocinas en términos de duplicación de población acumulada, confluencia y esquema de aplicación.

Se utilizó SDS al 0,008% como control positivo de citotoxicidad para validar el experimento.

El umbral de citotoxicidad se fijó arbitrariamente en un 80% de viabilidad, en comparación con el control no tratado.

Los resultados se presentan en el siguiente gráfico:

Viabilidad de los queratinocitos de NHEK después de 26 horas de tratamiento con los 2 elementos de prueba (MTS)



Solución de mezcla al 10% de *M. dubia*, *T. lepidota* y *P. bogotensis*.

Extracto de hoja de *Phytolacca bogotensis*

Figura 2: Porcentaje de viabilidad de queratinocitos de NHEKs en comparación con el control sin tratamiento, después de 26 h de contacto con las diferentes concentraciones de los dos elementos de prueba.

Conforme a estos resultados, el patrocinador ha seleccionado 2 concentraciones para continuar con el experimento principal

Estas concentraciones se enumeran a continuación:

Elementos de prueba	Concentraciones probadas (%)
Mezcla <i>M. dubia</i> , <i>T. lepidota</i> y <i>P. bogotensis</i> .	1,5 - 0,75
Extracto de hoja de <i>Phytolacca bogotensis</i>	

5.2 Mediciones de liberación de citocinas / PGE2 de NKEs inflamados por ELISA

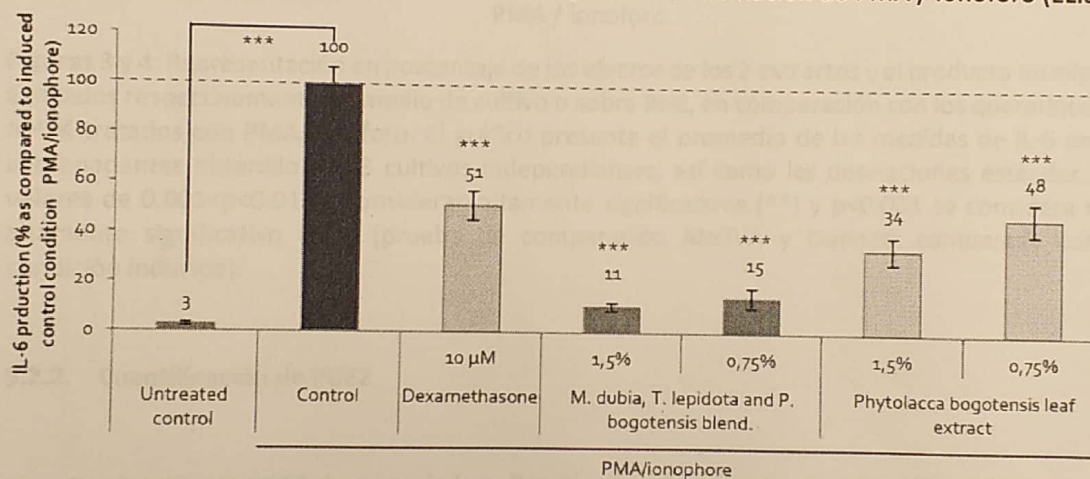
Como se establece en la metodología, se aplicaron los dos extractos solubles en agua directamente en el medio de cultivo celular de los queratinocitos NHEK. Los resultados se presentan en las figuras 3, 5 y 7.

Se aplicó el producto terminado en la capa confinada de la epidermis reconstruida que se utiliza como sistema de liberación, colocada sobre monocapas de NHEK. El control sin tratar, las condiciones inducidas por PMA y las condiciones inducidas tratadas con los elementos de referencia se obtuvieron mediante cocultivo entre los queratinocitos de RHE y NHEK de entrega vacía en monocapa. En este caso, los tratamientos se realizaron dentro del medio de cultivo. Los resultados se presentan en las figuras 4, 6 y 8.

En las figuras 3 a 8 se presentan los resultados en relación con las condiciones inducidas consideradas como nivel de referencia y colocadas al 100%.

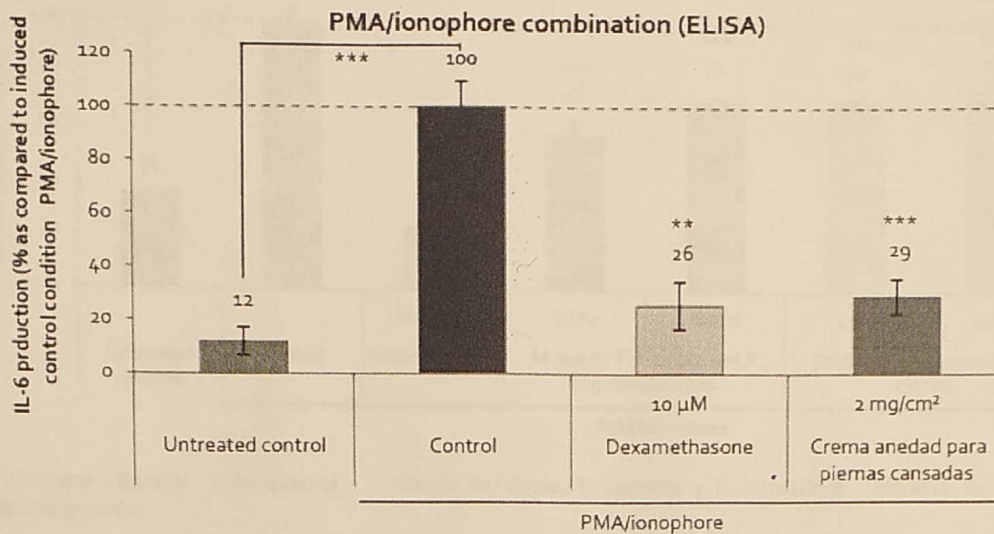
5.2.1 Cuantificación de IL-6

Producción de IL-6 después de la aplicación de extractos en queratinocitos NHEK, en comparación con el estado inflamado inducido por una combinación de PMA / ionóforo (ELISA)



Producción de IL-6 después de la aplicación de productos terminados en RHE con co-cultivos con queratinocitos NHEK, en comparación con el estado inflamado inducido por una combinación de PMA / ionóforo (ELISA)

Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



Control sin tratar

Control

Dexametasona

Crema anedad para piernas cansadas

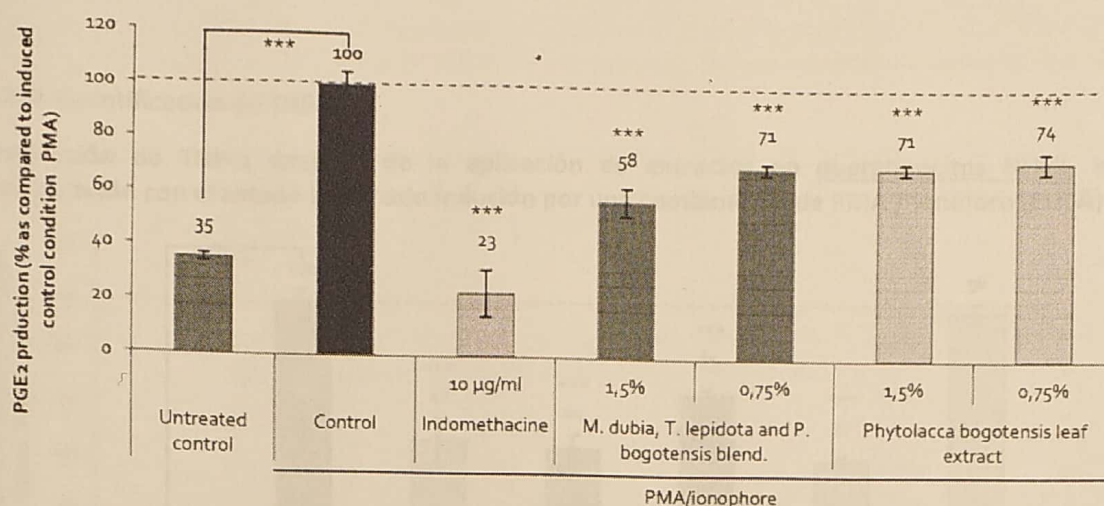
PMA / ionóforo

Figuras 3 y 4: Representación en porcentaje de los efectos de los 2 extractos y el producto terminado aplicados respectivamente en medio de cultivo o sobre RHE, en comparación con los queratinocitos NHEK tratados con PMA/ionóforo. El gráfico presenta el promedio de las medidas de IL-6 en los sobrenadantes obtenidos de 3 cultivos independientes, así como las desviaciones estándar. Los valores de $0,001 < p < 0,01$ se consideran altamente significativos (**) y $p < 0,001$ se considera muy altamente significativo (***) (prueba de comparación ANOVA y Dunnett comparada con la condición inducida).

5.2.2. Cuantificación de PGE2

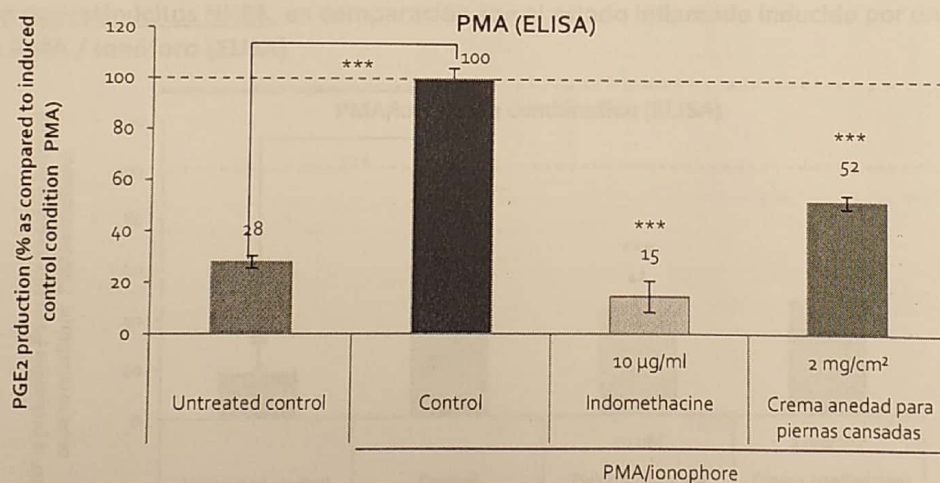
Producción de PGE2 después de la aplicación de extractos en queratinocitos NHEK, en comparación con el estado inflamado inducido por PMA (ELISA)

Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



Control sin tratar Control Indometacina Mezcla M. dubia, T. lepidota y P. bogotensis. Extracto de hoja de Phytolacca bogotensis

Producción de PGE2 después de la aplicación de productos terminados en RHE con co-cultivos con queratinocitos NHEK, en comparación con el estado inflamado inducido por PMA (ELISA)

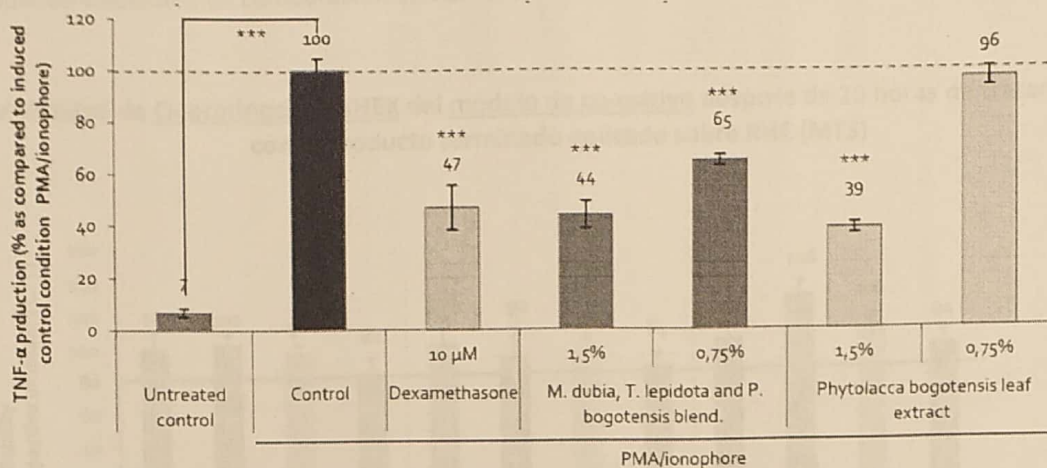


Control sin tratar Control Indometacina Crema anedad para piernas cansadas

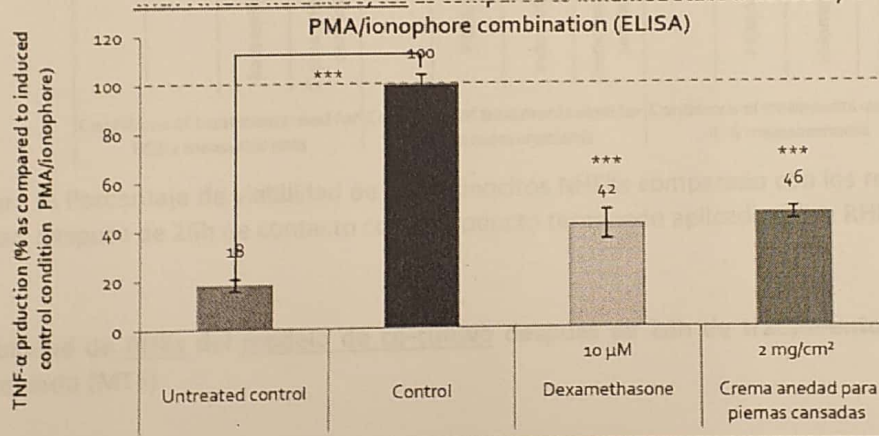
Figuras 5 y 6: Representación en porcentaje de los efectos de los 2 extractos y el producto terminado aplicados respectivamente en medio de cultivo o sobre RHE, en comparación con los queratinocitos NHEK tratados con PMA/ionóforo. El gráfico presenta la media de las medidas de PGE2 en los sobrenadantes obtenidos de 3 cultivos independientes, así como las desviaciones estándar. Los valores de $p < 0.001$ se consideran altamente significativos (***) (Prueba de comparación ANOVA y Dunnett comparada con la condición inducida).

5.2.3. Cuantificación de TNF- α

Producción de TNF- α después de la aplicación de extractos en queratinocitos NHEK, en comparación con el estado inflamado inducido por una combinación de PMA / ionóforo (ELISA)



Producción de TNF- α después de la aplicación de productos terminados en RHE con co-cultivos con queratinocitos NHEK, en comparación con el estado inflamado inducido por una combinación de PMA / ionóforo (ELISA)



Figuras 7 y 8: Representación en porcentaje de los efectos de los 2 extractos y el producto terminado aplicados respectivamente en medio de cultivo o sobre RHE, en comparación con los queratinocitos NHEK tratados con PMA/ionóforo. El gráfico presenta el promedio de las medidas de TNF- α en los sobrenadantes obtenidos de 3 cultivos independientes, así como las desviaciones estándar. Los valores de $p < 0.001$ se consideran altamente significativos (***) (Prueba de comparación ANOVA y Dunnett comparada con la condición inducida).

5.3 Viabilidad de los queratinocitos NHEK y RHE después del tratamiento con el producto terminado

Para comprobar la ausencia de citotoxicidad inducida por el producto terminado en el modelo de cocultivo, se ha realizado un ensayo MTS tanto en monocapas de queratinocitos NHEKs como RHE al final de los tratamientos.

Los resultados se presentan a continuación. Confirman la ausencia de citotoxicidad del producto terminado después de 26 h de contacto. El umbral de citotoxicidad se fijó arbitrariamente en un 80% de viabilidad, en comparación con el control no tratado.

Viabilidad de Queratinocitos NHEK del modelo de co-cultivo después de 26 horas de tratamiento con el producto terminado aplicado sobre RHE (MTS)

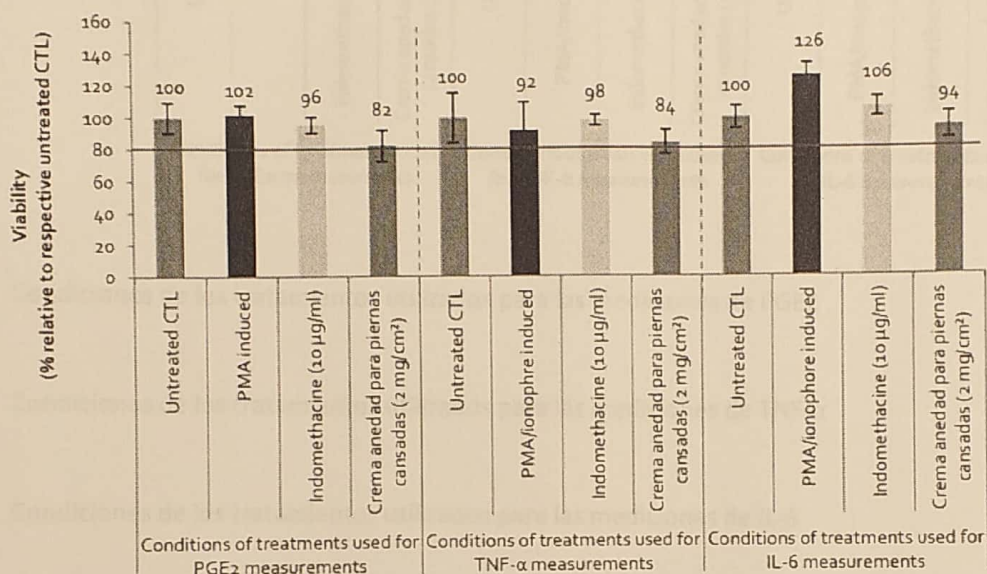
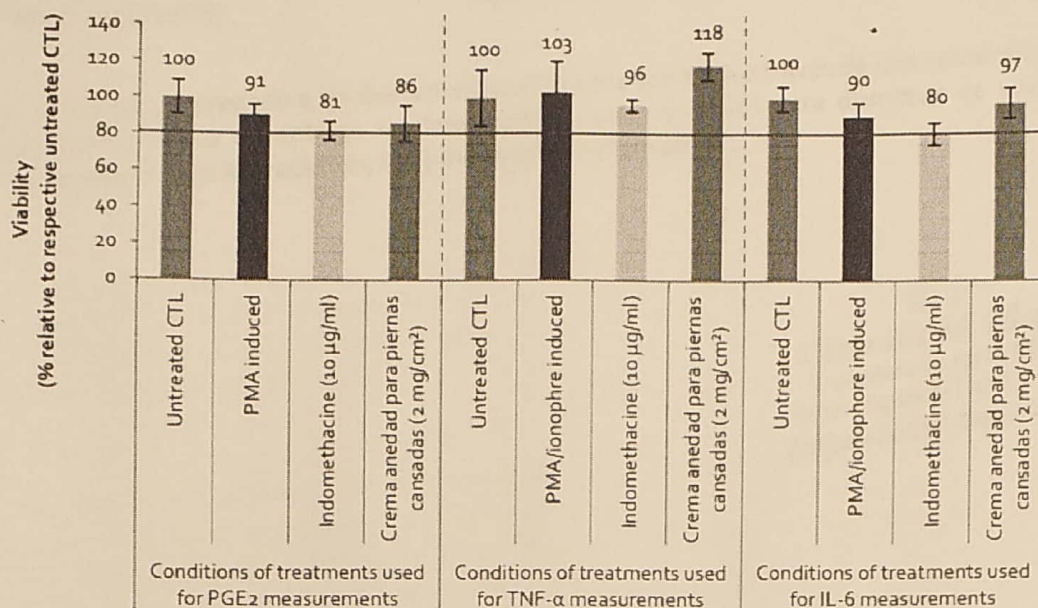


Figura 9: Porcentaje de viabilidad de queratinocitos NHEKs comparado con los respectivos CTL sin tratar, después de 26h de contacto con el producto terminado aplicado sobre RHEs.

Viabilidad de RHEs del modelo de co-cultivo después de 26h de tratamiento con el producto terminado (MTS)

Claudia M. Marín
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



Condiciones de los tratamientos utilizados para las mediciones de PGE2

Condiciones de los tratamientos utilizados para las mediciones de TNF-α

Condiciones de los tratamientos utilizados para las mediciones de IL-6

Figura 10: Porcentaje de viabilidad de RHEs en comparación con los respectivos CTL sin tratar, después de 26 horas de contacto con el producto terminado.

5.4. Conclusión

Como era de esperar, las moléculas de referencia dexametasona o indometacina inhibieron la liberación de IL-6, PGE2 y TNF-α. Estos resultados validan el método de prueba y análisis.

Los dos elementos de prueba solubles muestran importantes propiedades antiinflamatorias. Tienen la capacidad de disminuir la producción de los tres mediadores estudiados, según la dosis, a excepción del *extracto de hoja de Phytolacca bogotensis* al 0,75%, en una liberación de TNF-α.

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

El producto terminado, entregado a los queratinocitos tratados con PMA a través de una epidermis reconstruida como sistema de entrega también muestra una capacidad para disminuir de una manera muy significativa la liberación de los 3 mediadores inflamatorios.

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



- Protocolo firmado y autorizado
- Hoja de interdependencia / Interdependencias
- Registro de interdependencias / Interdependencias de interdependencia
- Informe final original firmado
- Copia de interdependencias
- Copia de los datos estadísticos aplicables

7. Conclusión

La información contenida en este protocolo es válida y los datos estadísticos aplicables corresponden al estudio considerado confiable y el producto es confiable en el presente estado del

- Informe final, 13 de agosto de 2014

- Informe final, 13 de agosto de 2014

Bibliografía

I. Los queratinocitos humanos tratados con forbol-12-miristato-13-acetato expresan moléculas similares a B7 que cumplen una función coestimuladora en la activación de las células T. Augustin M, Dietrich A, Niedner R, Kapp A, Schöpf E, Ledbetter J, Brady W, Linsley P y Simon JJ Invest. Dermatol., Vol 100 (3), pp 275-281, 1993.

II. Inducción de citocinas en queratinocitos epidérmicos humanos expuestos a irritantes de contacto y su relación con la inflamación inducida por sustancias químicas en la piel de ratón. Wilmer J, Burleson F, Kayama F, Kanno J y Luster MJ Invest. Dermatol., Vol 102 (6), pp 915-922, 1994.

III. El papel de las citocinas de queratinocitos en la inflamación y la inmunidad. McKenzie RC y Sauder D NJ. Invest. Dermatol., Vol 95 (6, complemento), págs. 105S-107S, 1990.

6. Archivos

Todos los datos originales de laboratorio sin procesar y demás documentos o materiales que surjan del proyecto se almacenarán en las instalaciones de StratiCELL, parc Créalys 10, rue Jean Sonet 5032 ISNES (Bélgica), hasta por 5 años después de la finalización del trabajo analítico. A más tardar 5 años después de la finalización del trabajo analítico, se esperarán las instrucciones del Patrocinador para devolver o eliminar los archivos. La implementación de dichas instrucciones correrá por cuenta del Patrocinador. Si no se recibe ninguna recomendación del patrocinador, se destruirán todos los datos y documentos.

Los materiales archivados incluirán los siguientes documentos:

- Protocolo firmado y enmiendas
- Toda la correspondencia y memorandos
- Registros de muestras analíticas e impresiones de instrumentos
- Informe final original firmado
- Cuadernos de laboratorio individuales
- Todos los demás materiales aplicables

7. Confidencialidad

La información contenida en este protocolo analítico y los datos experimentales pertenecientes al estudio se consideran confidenciales y se prohíbe su divulgación a terceros sin el permiso escrito del



Patrocinador, a menos que se comparta con personal involucrado en el estudio. Todos los resultados y datos pertenecen al patrocinador.

8. Aprobaciones

Este informe final fue redactado por el líder del proyecto del estudio,

Virginie Brumenil
Líder del proyecto
StratiCELL SA

Fecha

Este informe final fue leído y aprobado por el Director del Estudio y el Director del Centro de Pruebas de las Instalaciones,

Aline Chrétien, Ph.D.
Director del Estudio
StratiCELL SA

Fecha

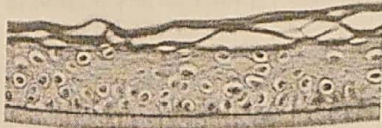
Michel Salmon, Ph.D.
CEO
Director de Instalaciones de Prueba
StratiCELL SA

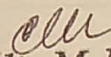
Fecha

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Anexo 1: Hoja de datos de calidad RHE

Isnes, 28 de julio de 2014

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	Epidermis reconstituida <i>in vitro</i> de queratinocitos humanos cultivados durante 14 días en medio sin suero en la interfaz aire-líquido en filtros de policarbonato (tejidos multicapa y completamente diferenciados).
GRADO DE CULTIVO	0.63 cm ²
REFERENCIA	RHE/001
LOTE No.	VB0714/1
HISTOLOGÍA DE QC Alineación celular, capa de células basales V 4 ≤ Número de capas de células ≤ 7 V 15% ≤ estrato córneo ≤ 30% V	
VIABILIDAD DE QC	Valor MTS para el lote de producción VB0714/1: 1,429 +/- 0,072
PREPARADO POR	Virginie Brumenil Líder del proyecto
APROBADO POR	Michel Salmon, PhD, CEO


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Anexo 2: Datos no elaborados obtenidos para las mediciones de los mediadores inflamatorios en los sobrenadantes de cultivos celulares de queratinocitos NHEKs en estado inflamatorio.

IL-6

Estándar (pg/ml)	OD		OD promedio
0	0,017	0,031	0,024
3,13	0,037	0,040	0,039
6,25	0,091	0,085	0,088
12,5	0,130	0,131	0,131
25	0,230	0,244	0,237
50	0,445	0,455	0,450
100	0,839	0,868	0,854
300	1,955	2,011	1,983

	[Elemento de prueba]	OD	[IL-6] (pg/ml) (factor de dilución 5x)	Promedio (pg/ml)	Desviación estándar	% de PMA / CTL ionóforo (= [IL-6] / PMA promedio / ionóforo * 100)	Promedio del %	Desviación estándar
CTL	/	0,018	5,8	7,6	2,0	2	3	0,72
		0,022	7,3			3		
		0,028	9,7			4		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 µM	0,512	293,6	275,2	18,3	107	100	6,657
		0,484	274,9			100		
		0,457	257,0			93		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 µM + 10 µM	0,253	128,5	141,6	16,0	47	51	5,801
		0,304	159,3			58		
		0,267	0,267			50		
Mezcla M. dubia, T. lepidota y P. bogotensis	1,5%	0,081	33,8	29,1	4,5	12	11	1,653
		0,062	24,7			9		
		0,071	29,0			11		
	0,75%	0,114	50,4	40,1	11,0	18	15	4,01
		0,070	28,5			10		
Extracto de hoja de Phytolacca bogotensis	1,5%	0,096	41,2			15		
		0,186	89,6	94,6	14,9	33	34	5,424
		0,224	111,4		40			
	0,75%	0,174	82,8		30			
		0,290	150,8	130,8	17,9	55	48	6,522
CTL	/	0,232	116,1			42		
		0,248	125,5			46		
		0,092	39,2	35,0	15,0	13	12	5,134
		0,108	47,3			16		
		0,048	18,3			6		
PMA/A23187	10 ng/ml / 2 µM 10 µM	0,540	312,6	292,0	27,8	107	100	9,534
		0,462	260,3			89		
		0,526	303,1			104		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 µM + 10 µM	0,123	55,1	74,6	25,8	19	26	8,835

		0,141	64,7			22		
		0,211	103,8			36		
Crema anidad para piernas cansadas	2 mg/cm ²	0,144	66,3	84,7	19,1	23	29	6,532
		0,175	83,4			29		
		0,212	104,4			36		

PGE2

Estándar (pg/ml)	OD		OD promedio
0	1,320	1,350	1,335
7,8	1,258	1,129	1,194
15,6	1,210	1,187	1,199
31,3	1,136	1,088	1,112
62,5	1,041	0,946	0,994
125	0,836	0,721	0,779
250	0,561	0,575	0,568
500	0,381	0,387	0,384
1000	0,316	0,316	0,316

	[Elemento de prueba]	OD	[PGE2] (pg/ml)	Promedio (pg/ml)	Desviación estándar	% de PMA/CTL 10 ng/ml (=[PGE2] promedio de PMA 10 ng/ml *100	Promedio del %	Desviación estándar
CTL	/	0,976	93,4	98,2	13,6	34	35	4,918
		0,996	87,6			32		
		0,903	113,6			41		
PMA /	10 ng/ml	0,532	269,8	276,6	21,7	98	100	7,829
		0,504	300,9			109		
		0,543	259,3			94		
PMA + IND	10 ng/ml	1,081	62,7	64,7	7,8	23	23	2,812
		1,097	58,1			21		
		1,045	73,3			26		
Mezcla M. dubia, T. lepidota y P. bogotensis	10 µg/ml	0,745	155,9	160,4	4,7	56	58	1,705
		0,732	159,9			58		
		0,715	165,3			60		
	1,50%	0,65	190,3	195,9	6,8	69	71	2,456
		0,623	203,4			74		
		0,642	193,9			70		
Extracto de hoja de Phytolacca bogotensis	0,75	0,654	188,5	197,1	7,9	68	71	2,85
		0,622	204			74		
		0,632	198,8			72		
	1,5%	0,625	202,4	203,9	6	73	74	2,183



		0,632	198,8			72		
		0,61	210,6			76		
CTL	0,75	0,896	115,4	121,9	6,7	26	28	1,523
		0,873	121,5			28		
		0,845	128,8			29		
PMA	10 ng/ml	0,432	424,1	438,4	26,9	97	100	6,134
		0,414	469,5			107		
		0,433	421,8			96		
PMA +Ind	10 µg/ml	1,098	57,8	63,6	6,9	13	15	1,568
		1,084	61,9			14		
		1,052	71,2			16		
Crema anedada para piernas cansadas	2 mg/cm²	0,569	237,6	228	8,5	54	52	1,938
		0,587	224,8			51		
		0,592	221,5			51		

TNF-α

Estándar (pg/ml)	OD		OD promedio
0	0,050	0,129	0,090
15,6	0,160	0,161	0,161
31,3	0,270	0,266	0,268
62,5	0,249	0,256	0,253
125	0,415	0,393	0,404
250	0,762	0,692	0,727
500	1,277	1,360	1,319
1000	2,074	2,143	2,109

	[Elemento de prueba]	OD	[TNF-α] (pg/ml)	Promedio (pg/ml)	Desviación estándar	% de PMA/CTL ionóforo (= [TNF-α] / PMA promedio / ionóforo*100)	Promedio del %	Desviación estándar
CTL	/	0,053	15,9	13,2	2,9	8	7	1,519
		0,040	10,1			5		
		0,048	13,6			7		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 µM	0,249	196,0	193,5	9,1	101	100	4,716
		0,239	183,4			95		
		0,253	201,1			104		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 µM + 10 µM	0,137	74,4	90,6	16,6	38	47	8,582
		0,154	89,9	107,6		46		
		0,172	107,6			56g		
		0,159	94,7	84,8	10,2	49	44	5,254

Mezcla M. dubia, T. lepidota y P. bogotensis	1,5%	0,149	85,2			44		
		0,137	74,4			38		
	0,75	0,188	124,3	125,4	3,9	64	65	2,008
		0,193	129,7			67		
		0,186	122,1			63		
Extracto de hoja de Phytolacca bogotensis	1,5%	0,137	74,4	74,7	4,0	38	39	2,057
		0,142	78,8			41		
		0,133	70,9			37		
	0,75%	0,238	182,2	186,4	7,3	94	96	3,751
		0,238	182,2			94		
CTL	/	0,248	194,7			101		
		0,097	42,5	43,1	5,7	18	18	2,397
		0,090	37,6			16		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 µM	0,106	49,1			20		
		0,288	248,3	239,4	9,8	104	100	4,075
		0,274	228,9			96		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 µM + 10 µM	0,283	241,2			101		
		0,181	116,9	100,5	14,6	49	42	6,077
		0,160	95,7			40		
Crema anedad para piernas cansadas	2 mg/cm2	0,153	89,0			37		
		0,170	105,6	111,0	6,3	44	46	2,628
		0,182	117,9			49		
		0,174	109,6			46		

Notaria
30
Notaría Treinta de Bogotá

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO

Ante la Notaría Treinta del Circulo de Bogotá D.C.
Compareció:

MARIN HERNANDEZ CLAUDIA MARITZA
quien exhibió: C.C. 52339204
y declaró que la firma que aparece en el presente documento es la suya y que el contenido del mismo es cierto.


Verifique estos datos en
www.notariaenlinea.com

R3592YP6NGWSVKZH

CESAR AUGUSTO ROJAS
NOTARIO 30
(E) BOGOTA D.C.

FIRMA
4edd5excdx3eexex
Bogotá D.C. 30/12/2020
a las 9:02:07 a. m.

CLM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA TREINTA
BOGOTA D.C.
NOTARIO (E)
CESAR AUGUSTO ROJAS

CR/14/MYNo1: Analysis of the effects of two test items and one finished product on the production of interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and prostaglandin E2 by keratinocytes with an inflammatory phenotype

Final report n° CR/14/MYNo1 according to quote 17_05_2013 V3

StratiCELL SA

**SPONSOR: Laboratorios MyN y Compañía Ltda
Mrs. Claudia Patricia Gama
calidad@neyber.co**

The information contained within this report is confidential and will not be disclosed without written authorization from the Sponsor. In case of further agreement and collaboration, StratiCELL undertakes not to disclose any of the results, work practices or functions conveyed to them during the course of this work.

STUDY OBJECTIVES	Analysis of the effects of two test items and one finished product on the production of interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and prostaglandin E2 by keratinocytes with an inflammatory phenotype
QUOTATION REFERENCE	Laboratorios MyN y Compañía Ltda 17_05_2013 V3
INTERNAL REFERENCE OF THE STUDY	CR/14/MYN01
SPONSOR	Laboratorios MyN y Compañía Ltda Autop. Med Km 2,4 Via titan 600 mts Portos Sabana 80 Bodega 32 Bogota Columbia
SPONSOR REPRESENTATIVE	Mrs. Claudia Patricia Gama
TEST FACILITY	StratiCELL SA Parc Scientifique Crealys Rue Jean Sonet 10 5032 Isnes Belgium
SCIENTIFIC PERSONNEL	Mrs. Virginie Brumenil
STUDY DIRECTOR	Aline Chrétien, Ph.D.
STUDY INITIATION DATE	02 nd July 2014
STUDY COMPLETION DATE	05 th August 2014
REPORT TRANSMISSION DATE	13 th August 2014

1. Study objectives

The study aims to measure the effects of two test items and one finished product on the release of inflammatory mediators. This study has been performed on monolayer cultures of primary human keratinocytes in PMA-induced inflammation. A reconstituted epidermis was used as a delivery system for the finished product.

The analyzed mediators are listed in the table below:

<i>Target inflammatory mediators</i>
<i>Interleukin 6 (IL-6)</i>
<i>Prostaglandin E₂ (PGE₂)</i>
<i>Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)</i>

The PMA induction of inflammation and the kinetic of the experiments have been optimized according to the targets. For PGE₂, the inflammatory phenotype has been induced by a treatment with Phorbol Myristate Acetate (PMA). To induce TNF- α release, cultures have been treated with PMA combined with the calcium ionophore A23187. For IL-6, cultures have been treated with PMA combined with the calcium ionophore in a culture medium supplemented with 0.8 mM calcium.

The effects of the test items and the finished product have been compared to reference molecules, *i.e.* dexamethasone and indomethacine.

The quantification of the inflammatory mediators has been performed by ELISA.

2. Test facility

The study has been conducted in StratiCELL Laboratories, Parc Créalys, rue Jean Sonet, 10, 5032 ISNES, Belgium. The assays on biological samples and the reporting of the results have been conducted by Virginie Brumenil.

3. Test items

3.1. Registration, handling and storage

The test items were supplied by the Sponsor. At their arrival on July 02, 2014, the test items were inspected, labeled and registered by Virginie Brumenil, and stored according to the specifications of the Sponsor listed in the table below.

<i>Test items</i>	<i>Lot</i>	<i>Solubility</i>	<i>Quantity</i>	<i>Storage</i>
<i>M. dubia, T. lepidota and P. bogotensis blend.</i>	<i>NB00406-2014</i>	<i>Culture medium</i>	<i>50 g</i>	<i>4°C</i>
<i>Phytolacca bogotensis leaf extract</i>	<i>280114</i>			
<i>Crema anedad para piernas cansadas</i>	<i>250514-3-2</i>	<i>NA</i>		

3.2. Storage after study completion

After completion of the study, StratiCELL will maintain the leftover test items under controlled storage conditions. If no recommendation from the Sponsor has been received 6 months after the final report, the items will be destroyed. Upon demand, they will be returned to the Sponsor (shipping costs to be charged to the Sponsor), or kept for long-term storage.

4. Methodology

4.1. Cell culture

The study was performed using monolayer cultures of Normal Human foreskin-derived Epidermal Keratinocytes (NHEKs). The cells were grown in Epilife medium containing gentamycin and components of the HKGS kit (Human Keratinocyte Growth Supplement) added separately, excepted the PLA-2 inhibitor hydrocortisone, which was not included in the culture medium. The cells were maintained in a humidified incubator at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere.

The finished product has been applied on Reconstituted Human Epidermis (StratiCELL®, RHE/001, batch VB0714/1) placed in contact with the monolayer NHEKs keratinocytes cultures during the treatment. Tissues were cultured at the air-liquid interface for 14 days before the experiment in a suitable culture medium in a humid atmosphere at 37°C with CO₂ 5%. The technical datasheet of RHE/001 is presented in annex 1 of the report.

<i>Cells, media et reagents</i>	<i>Types</i>	<i>Suppliers</i>	<i>Catalogue references</i>
<i>Keratinocytes (NHEKs)</i>	<i>Cells</i>	<i>Lonza</i>	<i>CC-2507</i>
<i>Epilife</i>	<i>Culture medium</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>M-Epi-500-A</i>
<i>HKGS</i>	<i>Supplement</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>S-001-5</i>
<i>HKGS kit</i>	<i>Supplement</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>S-001-K</i>
<i>Gentamycin</i>	<i>Antibiotic</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>15710-049</i>
<i>CaCl₂</i>	<i>Supplement</i>	<i>Merck</i>	<i>1.02378.0500</i>
<i>FGF-7, KGF</i>	<i>Supplement</i>	<i>R&D Systems</i>	<i>251-KG</i>
<i>Ascorbic acid</i>	<i>Supplement</i>	<i>VWR</i>	<i>83568-180</i>

4.2. Determination of the working test concentrations of the test items

In order to determine the optimal test concentrations of the two test items (*M. dubia*, *T. lepidota* and *P. bogotensis* blend. and *Phytolacca bogotensis* leaf extract) to be applied in the culture medium of NHEK cells, a preliminary study has been performed. Cells have been seeded in 24-wells plates, 24h before the treatment with the different concentrations of the test items.

SDS at 0.008 % has been used as cytotoxicity positive control in order to validate the experiment.

This study evaluated the cell viability by using the MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) after 26h of contact with the test items. It has been performed based on 5 concentrations, in triplicate (n=3).

Concerning the finished product, no preliminary cytotoxicity assay has been performed. The cells and RHE/001 viabilities have been evaluated at the end of the experiment using the MTS assay.

Molecules	Type	Suppliers	References	Concentration
MTS	Reagent	Promega	G3581	/
SDS	Reagent	VWR	444464T	0.008 %

At the end of the experiment, 2 non-cytotoxic concentrations have been selected in accordance with the Sponsor for further ELISA experiments.

The tested concentrations are listed in table below:

Test items	Tested concentrations (%)
<i>M. dubia</i> , <i>T. lepidota</i> and <i>P. bogotensis</i> blend.	1.5 – 0.75 – 0.375 – 0.188 – 0.094
<i>Phytolacca bogotensis</i> leaf extract	

4.3. Induction of the inflammatory phenotype in cultured NHEKs keratinocytes and treatment with the test and reference items

4.3.1 Kinetic considerations

For the quantification of PGE₂, inflammation has been induced by a treatment with PMA (10 ng/ml) during 24h. In order to induce the release of TNF- α , a treatment with both PMA and the calcium ionophore A23187 (2 μ M) was necessary. For IL-6 induction, a treatment with both PMA and calcium ionophore was realized in culture medium supplemented with 0.8mM calcium.

The reference molecules were dexamethasone (10 μ M) and indomethacine (10 μ g/ml).

Cells have been treated with the test and reference items during 2h before and during the PMA/A23187 induction.

- The two test items (*M. dubia*, *T. lepidota* and *P. bogotensis* blend and *Phytolacca bogotensis* leaf extract) have been solubilized directly in the culture medium of the NHEKs keratinocytes.
- The finished product has been topically applied on a reconstructed human epidermis (2 mg/cm²) used as a delivery system, placed itself on the NHEKs monolayer. The “untreated control”, “induced control” and “induced condition treated with the reference molecule” in the culture medium were co-cultured with the empty delivery system (untreated RHE) for the duration of the experiment (26h). The application outline is presented in the figure below.

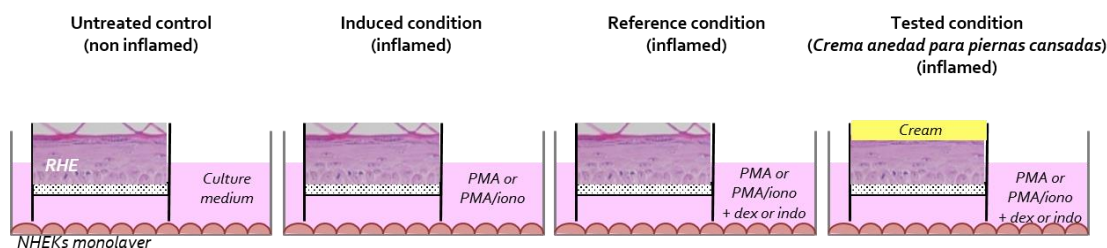
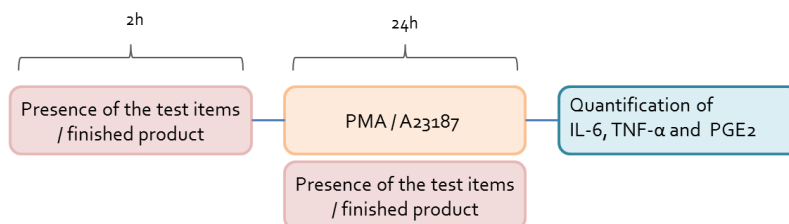


Figure 1 : Application scheme of the finished product and reference molecules.

Cell culture supernatants have been collected at the end of the experiment and stored at -20°C. Each condition has been performed in triplicate (n=3).

The kinetic followed for both kind of treatments (test items and finished products) is shown below.



The reference items and molecules used to induce the inflammatory phenotype are listed in the table below:

<i>Molecules</i>	<i>Type</i>	<i>Supplier</i>	<i>Catalogue references</i>	<i>Solvents</i>	<i>Concentrations</i>
<i>Dexamethasone</i>	<i>Reagent</i>	<i>Sigma</i>	<i>D2915</i>	<i>H₂O</i>	<i>10 μM</i>
<i>Indomethacine</i>	<i>Reagent</i>	<i>Sigma</i>	<i>I7378</i>	<i>Ethanol</i>	<i>10 μg/ml</i>
<i>Phorbol Myristate Acetate (PMA)</i>	<i>Reagent</i>	<i>Sigma</i>	<i>79346</i>	<i>H₂O</i>	<i>10 ng/ml</i>
<i>Calcium ionophore A23187</i>	<i>Reagent</i>	<i>Sigma</i>	<i>C7522</i>	<i>DMSO</i>	<i>2 μM</i>

4.3.2 Quantification of the inflammatory mediators

The quantification of the inflammatory markers has been performed using specific ELISA kits, based on a standard curve, according to supplier's specifications.

Supplier's references of the kits are listed below:

<i>Target molecules</i>	<i>Suppliers</i>	<i>References of the kits</i>
<i>IL-6</i>	<i>R&D Systems</i>	<i>D6050</i>
<i>PGE₂</i>	<i>Cayman chemical</i>	<i>514010</i>
<i>TNF-α</i>	<i>R&D Systems</i>	<i>DTA00C</i>

5. Results

5.1. Dose-finding experiment for the two soluble test items

In order to optimize the concentrations of the test items, a cytotoxicity study has been performed, on the basis of 5 concentrations.

The experimental parameters were the same as those that were applied for the cytokine release measurements in terms of cumulative population doublings, confluence and application scheme.

SDS at 0.008 % has been used as a cytotoxic positive control in order to validate the experiment.

The threshold of cytotoxicity was arbitrarily fixed à 80% of viability, as compared to the untreated control.

Results are presented in the graph below :

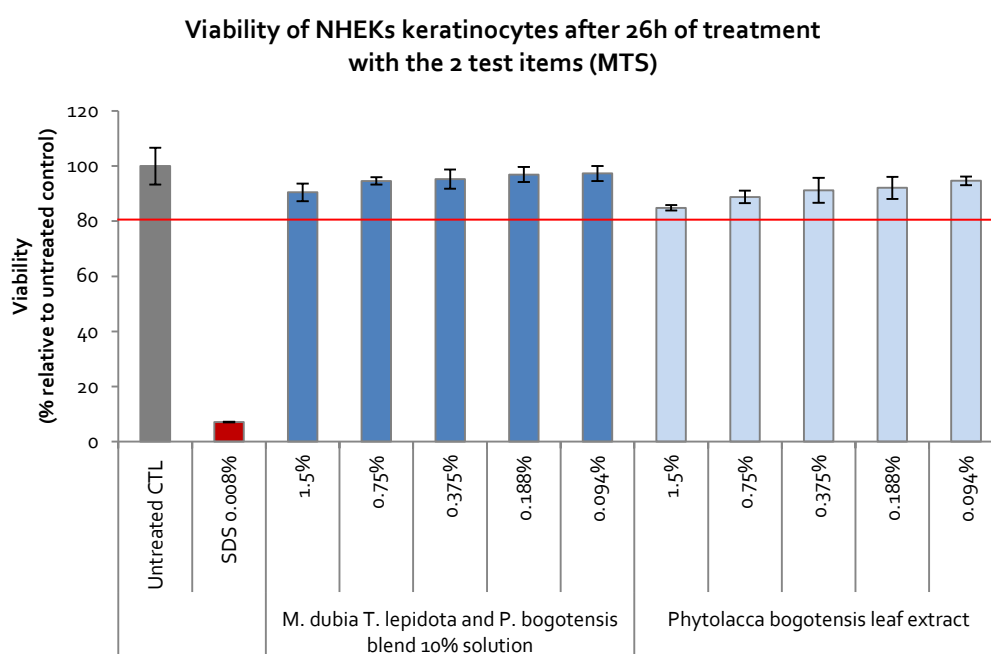


Figure 2 : Percentage of NHEKs keratinocytes viability as compared to the untreated control, after 26h of contact with the different concentrations of the two test items.

Based on these results, 2 concentrations have been selected by the Sponsor in order to go ahead with the main experiment

These concentrations are listed below:

Test items	Tested concentrations (%)
<i>M. dubia</i> , <i>T. lepidota</i> and <i>P. bogotensis</i> blend.	1.5 – 0.75
<i>Phytolacca bogotensis</i> leaf extract	

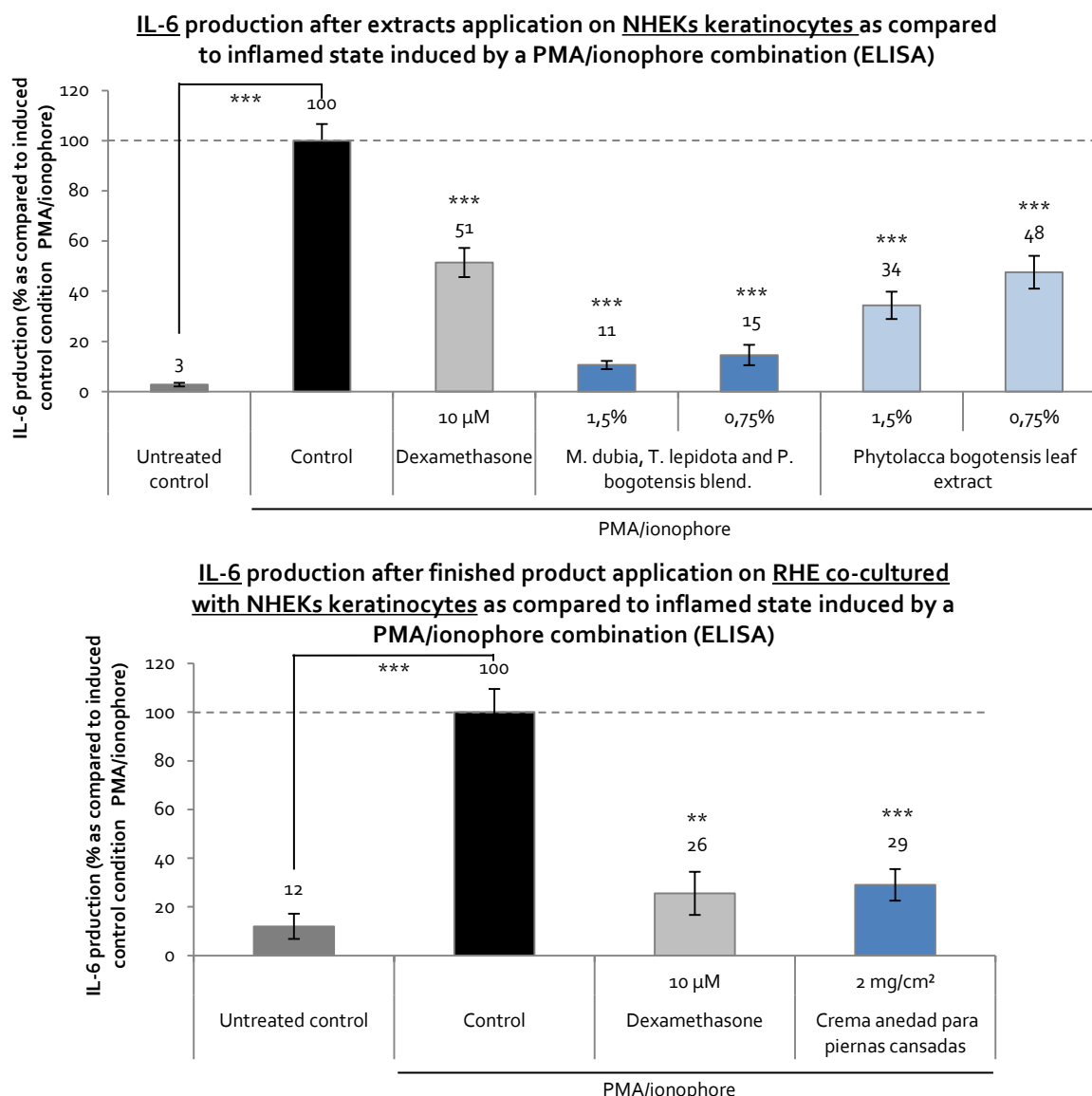
5.2. Measurements of cytokines/PGE2 release from inflamed NHEKs by ELISA

As detailed in the methodology, the two water-soluble extracts have been applied directly in the cell culture medium of the NHEKs keratinocytes. The results are presented in figures 3, 5 and 7.

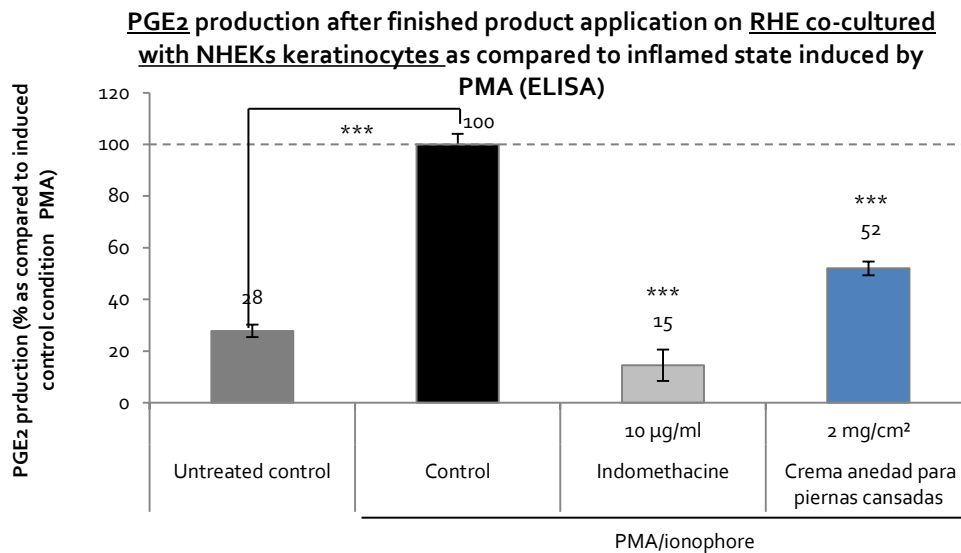
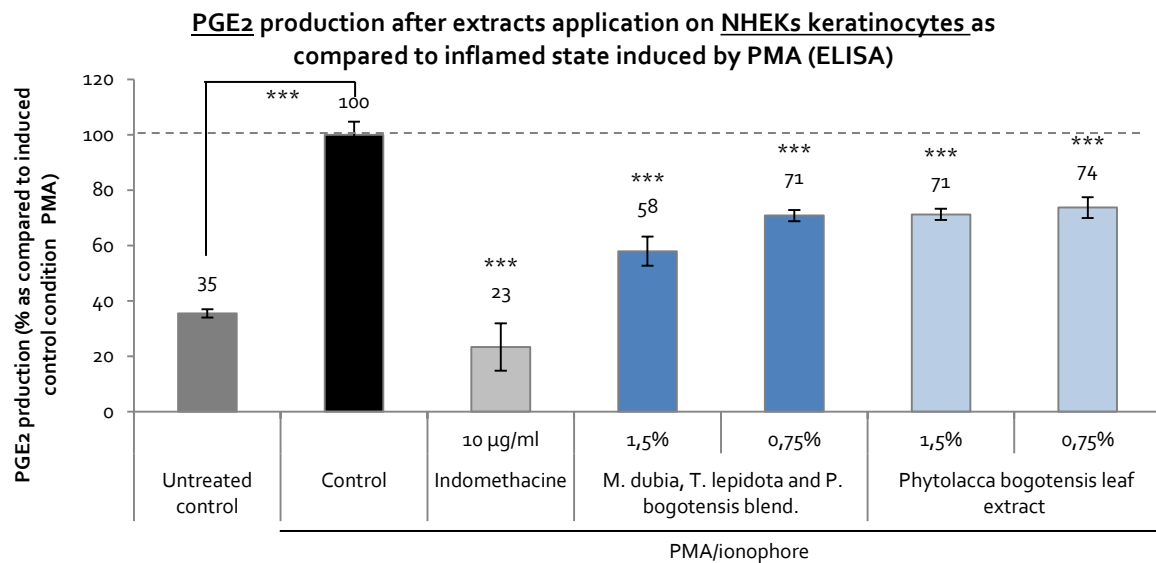
The finished product has been applied on the cornified layer of reconstructed epidermis, used as delivery system, placed themselves on NHEKs monolayers. The untreated control, the PMA-induced conditions and the induced conditions treated with the reference items were achieved by co-culture between the empty delivery RHEs and NHEK keratinocytes in monolayer. In this case, treatments were carried out within the culture medium. The results are presented in figures 4, 6 and 8.

In figures 3 to 8, results are expressed relative to induced conditions considered as reference level and placed at 100%.

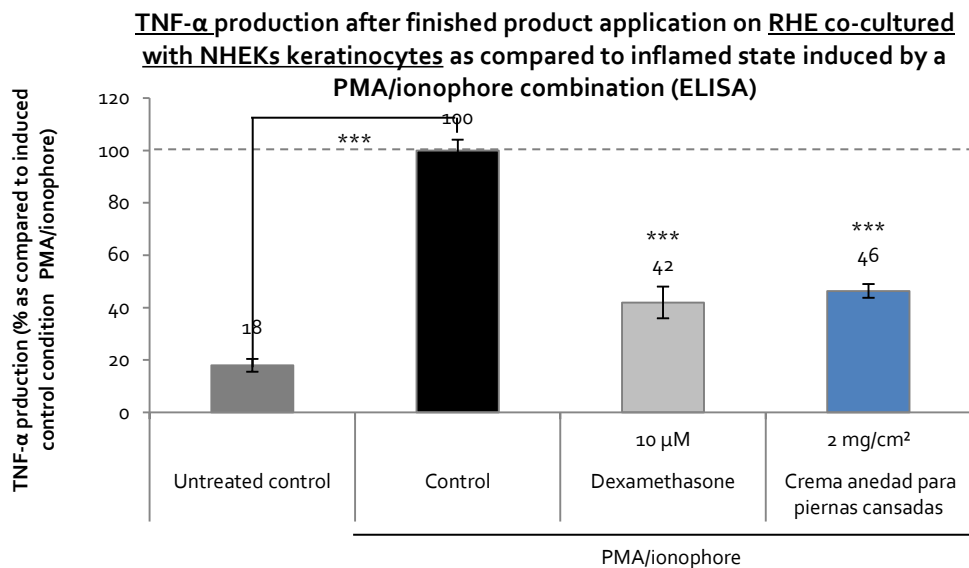
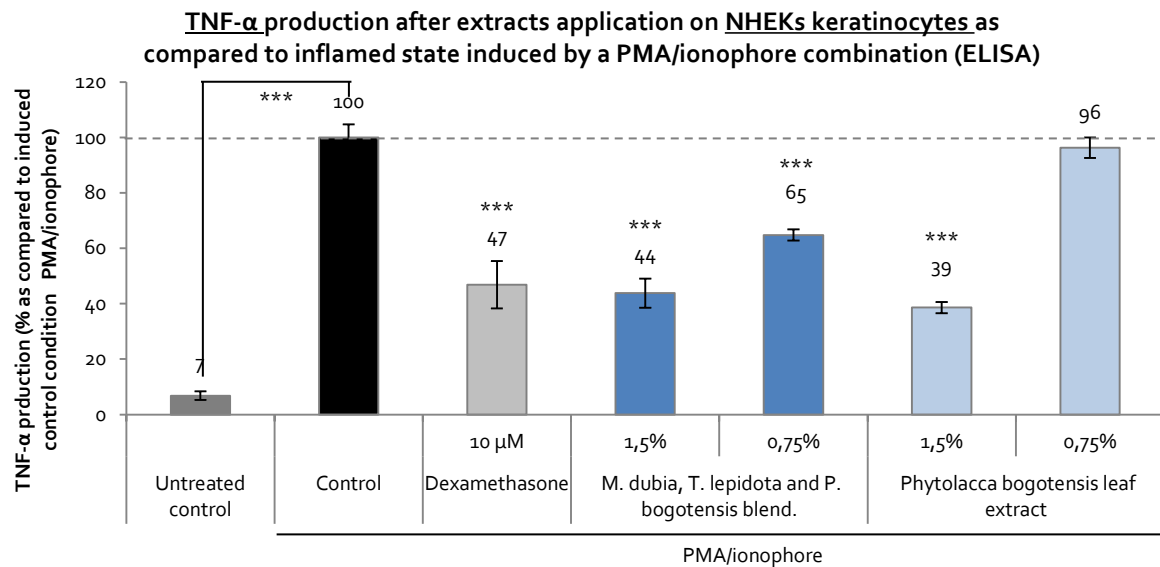
5.2.1. Quantification of IL-6



Figures 3 and 4 : Representation in percent of the effects of the 2 extracts and the finished product applied respectively into culture medium or on RHE, compared to the PMA/ionophore treated NHEKs keratinocytes. The graph presents the mean of the IL-6 measurements in the supernatants obtained from 3 independent cultures, as well as the standard deviations. Values of $0.001 < p < 0.01$ are considered as highly significant (**) and $p < 0.001$ as very highly significant (***) (ANOVA and Dunnett comparison test compared to the induced condition).

5.2.2. Quantification of PGE₂

Figures 5 and 6 : Representation in percent of the effects of the 2 extracts and the finished product applied respectively into culture medium or on RHE, compared to the PMA/ionophore treated NHEKs keratinocytes. The graph presents the mean of the PGE₂ measurements in the supernatants obtained from 3 independent cultures, as well as the standard deviations. Values of $p < 0.001$ are considered as very highly significant (***) (ANOVA and Dunnett comparison test compared to the induced condition).

5.2.3. Quantification of TNF- α 

Figures 7 and 8 : Representation in percent of the effects of the 2 extracts and the finished product applied respectively into culture medium or on RHE, compared to the PMA/ionophore treated NHEKs keratinocytes. The graph presents the mean of the TNF- α measurements in the supernatants obtained from 3 independent cultures, as well as the standard deviations. Values of $p < 0.001$ are considered as very highly significant (***) (ANOVA and Dunnett comparison test compared to the induced condition).

5.3. Viability of NHEKs keratinocytes and RHEs after treatment with the finished product

In order to check the absence of cytotoxicity induced by the finished product on the co-culture model, a MTS assay has been performed on both NHEKs keratinocytes monolayers and RHEs at the end of the treatments.

Results are illustrated below. They confirm the absence of cytotoxicity from the finished product after 26h of contact. The threshold of cytotoxicity was arbitrarily fixed at 80% of viability, as compared to the untreated control.

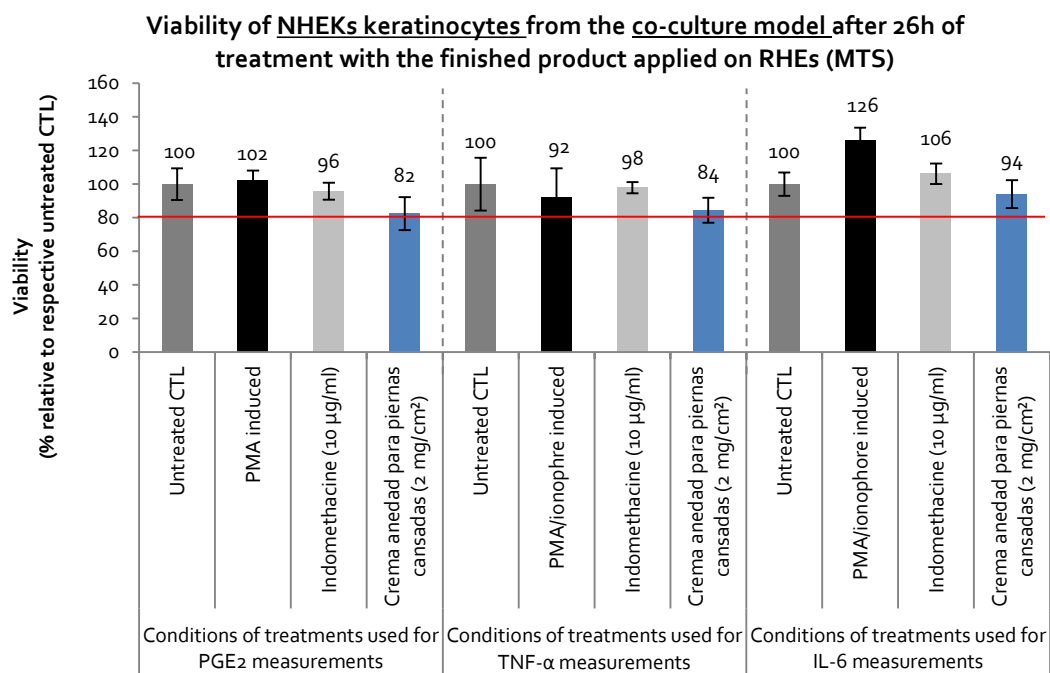


Figure 9 : Percentage of NHEKs keratinocytes viability as compared to the respective untreated CTL, after 26h of contact with the finished product applied on RHEs.

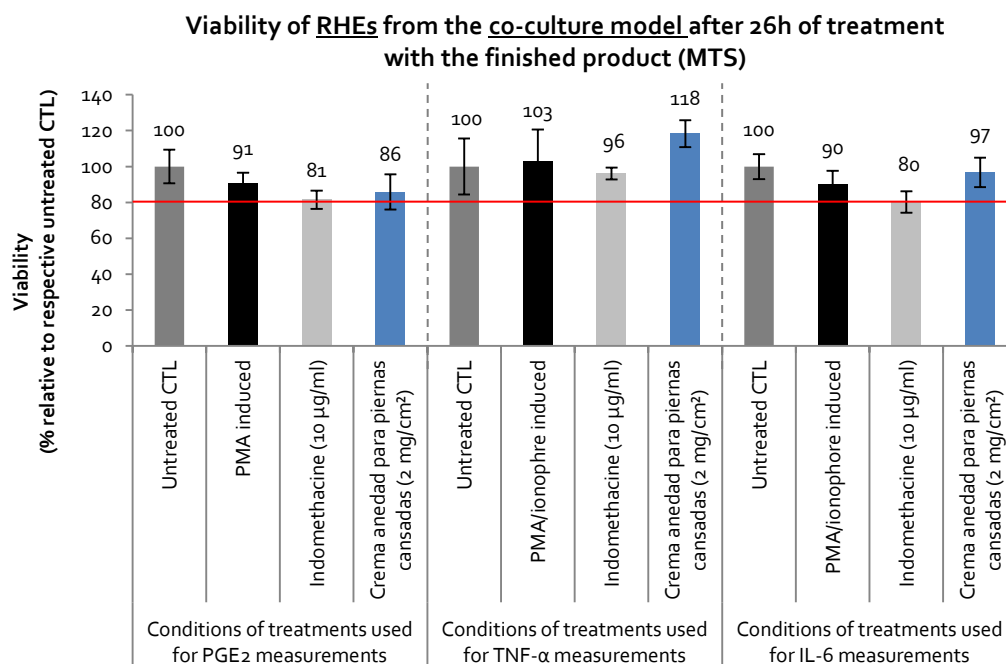


Figure 10 : Percentage of RHEs viability as compared to the respective untreated CTL, after 26h of contact with the finished product.

5.4. Conclusion

As expected, the reference molecules dexamethasone or indomethacine both inhibited the release of IL-6, PGE₂ and TNF- α . These results validate the test and analysis method.

The two soluble test items show significant anti-inflammatory properties. They have an ability to decrease the production of the three studied mediators, in a dose-dependent manner, except the *Phytolacca bogotensis* leaf extract at 0.75%, on the TNF- α release.

The finished product, delivered to the PMA-treated keratinocytes through a reconstructed epidermis as delivery system, also shows a capability to decrease in a very highly significant manner the release of the 3 inflammatory mediators.

Bibliography

- I. *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate – treated human keratinocytes express B7-like molecules that serve a costimulatory role in T-cell activation.* Augustin M, Dietrich A, Niedner R, Kapp A, Schöpf E, Ledbetter J, Brady W, Linsley P and Simon J. *J. Invest. Dermatol.*, Vol 100 (3), pp 275-281, 1993.
- II. *Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin.* Wilmer J, Burleson F, Kayama F, Kanno J and Luster M. *J. Invest. Dermatol.*, Vol 102 (6), pp 915-922, 1994.
- III. *The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity.* McKenzie R C and Sauder D N. *J. Invest. Dermatol.*, Vol 95 (6, supplement), pp 105S-107S, 1990.

6. Archives

All the original raw laboratory data and other documents or materials arising out of the project will be stored in StratiCELL facilities, parc Créalys 10, rue Jean Sonet 5032 ISNES (Belgium), for up to 5 years after completion of the analytical work. No later than 5 years after completion of the analytical work, instructions for returning or disposing of the archives will be waited from the Sponsor. Implementation of such instructions will be at charge of the Sponsor. If no recommendation has been received from the sponsor, all data and documents will be destroyed.

The archived materials will include the following documents:

- Signed protocol and amendments
- All correspondence and memoranda
- Analytical sample records and instrument printouts
- Original, signed final report
- Individual laboratory notebooks
- All other applicable materials

7. Confidentiality

The information contained in this analytical protocol and the experimental data pertaining to the study must be considered as strictly confidential, and will never be disclosed to others without written permission of the Sponsor, except to the staff involved in the study. All results and data belong to the sponsor.

8. Approvals

This final report has been written by the Project Leader of the study,

Virginie Brumenil
Project Leader
StratiCELL SA

Date

This final report has been read and approved by the Study Director and the Test Facility Director,

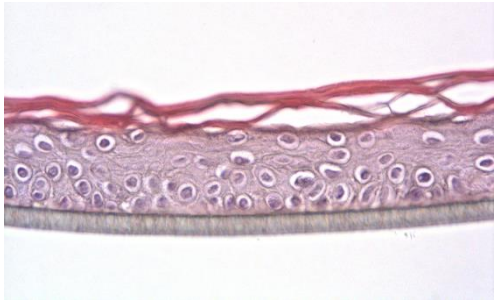
Aline Chrétien, Ph.D.
Study Director
StratiCELL SA

Date

Michel Salmon, Ph.D.
CEO
Test Facility Director
StratiCELL SA

Date

Annex 1 : RHE quality data sheetIsnes, July 28th 2014

PRODUCT DESCRIPTION	<i>In vitro</i> reconstituted epidermis from human keratinocytes grown for 14 days in serum-free medium at the air-liquid interface on polycarbonate filters (multi-layered and fully differentiated tissues).						
CULTURE SCALE	0.63 cm ²						
REFERENCE	RHE/001						
BATCH N°	VB0714/1						
QC HISTOLOGY <table border="1"> <tr> <td>Cellular alignment basal cell layer</td><td>v</td></tr> <tr> <td>4 ≤ number cell layers ≤ 7</td><td>v</td></tr> <tr> <td>15% ≤ stratum corneum ≤ 30%</td><td>v</td></tr> </table>	Cellular alignment basal cell layer	v	4 ≤ number cell layers ≤ 7	v	15% ≤ stratum corneum ≤ 30%	v	
Cellular alignment basal cell layer	v						
4 ≤ number cell layers ≤ 7	v						
15% ≤ stratum corneum ≤ 30%	v						
QC VIABILITY	MTS value for production batch VB0714/1 : 1.429 +/- 0.072						
PRODUCED BY	Virginie Brumenil Project Leader						
APPROVED BY	Michel Salmon, PhD, CEO						

Annex 2 : Raw data obtained for the measurements of the inflammatory mediators in the cell culture supernatants from NHEKs keratinocytes in inflammatory state.

IL-6

Std (pg/ml)	OD		Mean OD
0	0,017	0,031	0,024
3,13	0,037	0,040	0,039
6,25	0,091	0,085	0,088
12,5	0,130	0,131	0,131
25	0,230	0,244	0,237
50	0,445	0,455	0,450
100	0,839	0,868	0,854
300	1,955	2,011	1,983

	[test item]	OD	[IL-6] (pg/ml) (dilution factor 5x)	Mean (pg/ml)	Standard deviation	% of PMA/ionophore CTL (= [IL-6] / mean PMA/ionophore*100)	Mean of the %	Standard deviation
CTL	/	0,018	5,8	7,6	2,0	2	3	0,72
		0,022	7,3			3		
		0,028	9,7			4		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 µM	0,512	293,6	275,2	18,3	107	100	6,657
		0,484	274,9			100		
		0,457	257,0			93		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 µM + 10 µM	0,253	128,5	141,6	16,0	47	51	5,801
		0,304	159,3			58		
		0,267	136,9			50		
M. dubia, T. lepidota and P. bogatensis blend.	1,5%	0,081	33,8	29,1	4,5	12	11	1,653
		0,062	24,7			9		
		0,071	29,0			11		
	0,75%	0,114	50,4	40,1	11,0	18	15	4,01
		0,070	28,5			10		
		0,096	41,2			15		
Phytolacca bogatensis leaf extract	1,5%	0,186	89,6	94,6	14,9	33	34	5,424
		0,224	111,4			40		
		0,174	82,8			30		
	0,75%	0,290	150,8	130,8	17,9	55	48	6,522
		0,232	116,1			42		
		0,248	125,5			46		
CTL	/	0,092	39,2	35,0	15,0	13	12	5,134
		0,108	47,3			16		
		0,048	18,3			6		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 µM	0,540	312,6	292,0	27,8	107	100	9,534
		0,462	260,3			89		
		0,526	303,1			104		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 µM + 10 µM	0,123	55,1	74,6	25,8	19	26	8,835
		0,141	64,7			22		
		0,211	103,8			36		
Crema anedad para piernas cansadas	2 mg/cm²	0,144	66,3	84,7	19,1	23	29	6,532
		0,175	83,4			29		
		0,212	104,4			36		

PGE₂

Std (pg/ml)	OD		Mean OD
0	1,320	1,350	1,335
7,8	1,258	1,129	1,194
15,6	1,210	1,187	1,199
31,3	1,136	1,088	1,112
62,5	1,041	0,946	0,994
125	0,836	0,721	0,779
250	0,561	0,575	0,568
500	0,381	0,387	0,384
1000	0,316	0,316	0,316

	[test item]	OD	[PGE ₂] (pg/ml)	Mean (pg/ml)	Standard deviation	% of PMA CTL10 ng/ml (= [PGE ₂] / mean PMA 10 ng/ml *100)	Mean of the %	Standard deviation
CTL	/	0,976	93,4	98,2	13,6	34	35	4,918
		0,996	87,6			32		
		0,903	113,6			41		
PMA	10 ng/ml	0,532	269,8	276,6	21,7	98	100	7,829
		0,504	300,9			109		
		0,543	259,3			94		
PMA + Ind	10 ng/ml + 10 µg/ml	1,081	62,7	64,7	7,8	23	23	2,812
		1,097	58,1			21		
		1,045	73,3			26		
M. dubia, T. lepidota and P. bogotensis blend.	1,5%	0,745	155,9	160,4	4,7	56	58	1,705
		0,732	159,9			58		
		0,715	165,3			60		
	0,75%	0,650	190,3	195,9	6,8	69	71	2,456
		0,623	203,4			74		
		0,642	193,9			70		
Phytolacca bogotensis leaf extract	1,5%	0,654	188,5	197,1	7,9	68	71	2,850
		0,622	204,0			74		
		0,632	198,8			72		
	0,75%	0,625	202,4	203,9	6,0	73	74	2,183
		0,632	198,8			72		
		0,610	210,6			76		
CTL	/	0,896	115,4	121,9	6,7	26	28	1,523
		0,873	121,5			28		
		0,845	128,8			29		
PMA	10 ng/ml	0,432	424,1	438,4	26,9	97	100	6,134
		0,414	469,5			107		
		0,433	421,8			96		
PMA + Ind	10 ng/ml + 10 µg/ml	1,098	57,8	63,6	6,9	13	15	1,568
		1,084	61,9			14		
		1,052	71,2			16		
Crema anedad para piernas cansadas	2 mg/cm²	0,569	237,6	228,0	8,5	54	52	1,938
		0,587	224,8			51		
		0,592	221,5			51		

TNF- α

Std (pg/ml)	OD		Mean OD
0	0,050	0,129	0,090
15,6	0,160	0,161	0,161
31,3	0,270	0,266	0,268
62,5	0,249	0,256	0,253
125	0,415	0,393	0,404
250	0,762	0,692	0,727
500	1,277	1,360	1,319
1000	2,074	2,143	2,109

	[test item]	OD	[TNF- α] (pg/ml)	Mean (pg/ml)	Standard deviation	% of PMA/ionophore CTL (= [TNF- α] / mean PMA/ionophore*100)	Mean of the %	Standard deviation
CTL	/	0,053	15,9	13,2	2,9	8	7	1,519
		0,040	10,1			5		
		0,048	13,6			7		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 μ M	0,249	196,0	193,5	9,1	101	100	4,716
		0,239	183,4			95		
		0,253	201,1			104		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 μ M + 10 μ M	0,137	74,4	90,6	16,6	38	47	8,582
		0,154	89,9			46		
		0,172	107,6			56		
M. dubia, T. lepidota and P. bogatensis blend.	1,5%	0,159	94,7	84,8	10,2	49	44	5,254
		0,149	85,2			44		
		0,137	74,4			38		
	0,75%	0,188	124,3	125,4	3,9	64	65	2,008
		0,193	129,7			67		
		0,186	122,1			63		
Phytolacca bogotensis leaf extract	1,5%	0,137	74,4	74,7	4,0	38	39	2,057
		0,142	78,8			41		
		0,133	70,9			37		
	0,75%	0,238	182,2	186,4	7,3	94	96	3,751
		0,238	182,2			94		
		0,248	194,7			101		
CTL	/	0,097	42,5	43,1	5,7	18	18	2,397
		0,090	37,6			16		
		0,106	49,1			20		
PMA / A23187	10 ng/ml / 2 μ M	0,288	248,2	239,4	9,8	104	100	4,075
		0,274	228,9			96		
		0,283	241,2			101		
PMA / A23187 + Dex	10 ng/ml / 2 μ M + 10 μ M	0,181	116,9	100,5	14,6	49	42	6,077
		0,160	95,7			40		
		0,153	89,0			37		
Crema anedad para piernas cansadas	2 mg/cm ²	0,170	105,6	111,0	6,3	44	46	2,628
		0,182	117,9			49		
		0,174	109,6			46		

CONFIDENTIAL

REPORT : IN VITRO SAFETY STUDY

OCULAR PRIMARY IRRITATION

B.C.O.P.

**STUDY PERFORMED ON THE ISOLATED BOVINE CORNEA
MEASUREMENT OF THE BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY
(According to the OECD protocol n° 437 of 7 September 2009)**

TEST ITEM : **M.DUBIA, T. LEPIDOTA AND P. BOGOTENSIS BLEND 10%
SOLUTION** (batch n°NB00406-2014 of 29/04/2014)

I.E.C. CODE NUMBER : 140905 01154001

GENERAL STUDY PLAN : N° 20140032 of 27 May 2014

SPECIFIC STUDY PLAN : N° 140905SSP of 3 June 2014

REPORT : N° 140905RD of 27 June 2014

SCHEDULE

Experiment starting and completion date: 3rd June 2014

Study completion: 27 June 2014

SPONSOR'S REPRESENTATIVE	STUDY DIRECTOR
Mrs C. GAMA Química Farmacéutica Laboratorios MyN y Compañía LTDA Carrera 67 No. 67A-62. BOGOTA – COLOMBIE	Miss S. MAILLET Pharmacist Graduate in Cosmetology I.E.C. 88, boulevard des Belges 69006 LYON - FRANCE

22-page document

This document has no contractual value. Any copy, even incomplete, must be submitted to a written authorization from I.E.C.

88, Bd des Belges 69006 LYON - FRANCE

Tél. +33 (0) 4 72 69 89 60 - Fax. +33 (0) 4 72 69 71 08 - email : info@iecfrance.com

www.iecfrance.com

FRANCE - JAPAN - SINGAPORE - KOREA - BULGARIA - SPAIN - SOUTH AFRICA - CHINA

S.A. au capital social de 1 200 000 € - B 380 306 597 R.C.S. Lyon

T A B L E O F C O N T E N T S
--

AUTHENTICATION	3
JUDGMENT	3
PROTOCOL	4
STUDY OBJECTIVE.....	4
TYPE OF STUDY	4
STUDY RELEVANCE	4
TEST SYSTEM	5
METHODOLOGY	5
ANALYSIS OF THE DATA AND CLASSIFICATION	10
VALIDATION OF THE TRIAL.....	10
INTERPRETATION OF THE RESULTS	10
CHARACTERISATION, RESULTS AND CLASSIFICATION.....	11
CHARACTERISATION OF THE TEST ITEM.....	11
RESULTS AND CLASSIFICATION.....	11
CONCLUSION.....	12
QUALITY ASSURANCE	13
AMENDMENT(S) AND COMPLIANCE TO THE STUDY PLAN(S)	14
STORAGE AND ELIMINATION OF THE TEST ITEM, OF THE CONTROL PRODUCTS AND OF THE TEST SYSTEM	14
DATA RECORDING AND ARCHIVING	14
GUIDELINES	15
BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES.....	16
APPENDIX 1: RESULTS	17
APPENDIX 2: STATEMENT OF COMPLIANCE WITH GOOD LABORATORY PRACTICES (SAFETY TESTS)	19
APPENDIX 3: SPECIFIC STUDY PLAN AND AMENDMENT IF ANY	21

A U T H E N T I C A T I O N

The study subject of the present report was conducted under my responsibility, in compliance with the General and the Specific Study Plans, and in accordance with I.E.C. Standard Operating Procedures and the Good Laboratory Practices for cosmetic products (arrêté du 10 août 2004 publié au Journal Officiel de la République Française le 18 septembre 2004).

All observations and data obtained during this study are reported in the present document.
I have read this report, I certify that these data are an accurate reflection of the results obtained and I agree with its content.

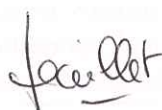
J U D G M E N T

(degree of compliance of the study with the Good Laboratory Practices)

The study was conducted in compliance with the principles of the Good Laboratory Practices and is **declared in compliance with the G.L.P.**

Lyon,

27/06/14



Stéphanie MAILLET
Study Director

INSTITUT D'EXPERTISE CLINIQUE

Head office: route de Bibost, 69690 Bessenay - France
Phone: +33 (0) 4.74.70.93.39 - Fax: +33 (0) 4.74.70.94.98

REPORT**SPONSOR :****Laboratorios MyN y Compañía LTDA****TEST ITEM :**

M.DUBIA, T. LEPIDOTA AND
P. BOGOTENSIS BLEND 10% SOLUTION
(batch n°NB00406-2014 of 29/04/2014)

IN VITRO SAFETY STUDY:**OCULAR PRIMARY IRRITATION****B.C.O.P.**

STUDY PERFORMED ON THE ISOLATED BOVINE CORNEA
MEASUREMENT OF THE BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY
(According to the OECD protocol n° 437 of 7 September 2009)

P R O T O C O L

<u>STUDY OBJECTIVE</u>	To evaluate the ocular primary irritation of a test item by the determination of its effect on the opacity and permeability of bovine corneas obtained from eyes freshly collected in a slaughter-house.
<u>TYPE OF STUDY</u>	In vitro study performed on the isolated bovine cornea, according to the OECD protocol n° 437 of 7 September 2009.
<u>STUDY RELEVANCE</u>	The majority of the alternative methods (in vitro and/or ex vivo) to the Draize ocular irritation test on rabbit (Draize et coll., 1944), being based on the cytotoxicity, is not linked to the main sign of ocular irritation represented by the corneal opacity (Gautheron and coll., 1994). The bovine corneal opacity and permeability method (BCOP) is based on the Muir method (1984, 1985). This technique is adapted from the one described by Gautheron and coll., 1992, to determine the ocular irritancy potential of diverse substances. Thanks to this method, two parameters such as corneal opacity and permeability can be measured. Thus, this method was used to predict the cosmetic products irritation (Rougier and coll., 1992), as well as the pharmaceutical and chemical products (Vanparys and coll., 1993). From 2003 to 2006, a workshop ICCVAM has evaluated 4 in vitro methods of ocular irritation, of which BCOP test. The BCOP was shown as being relevant to identify the products severely irritant or corrosive at the ocular level according to EU classification (R41).

<u>STUDY RELEVANCE</u> (CON'T)	This test was adopted by OECD (September 2009), to classify substances as "ocular corrosives and severe irritants" as defined by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (Category 1), the European Union (EU) (Category R41), and the United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (Category 1).
<u>TEST SYSTEM</u>	Bovine eyes (from cattle less than 12 months old) collected at the slaughterhouses of La Talaudière – France (42350) and carried in a stable medium (Hanks medium buffered with sodium bicarbonate), at room temperature, and used 4 hours maximum after killing the animals. This test system is adapted to evaluate the ocular irritancy potential.
<u>METHODOLOGY</u>	<u>Media and reagents preparation</u> <u>Buffered Hanks medium:</u> - Hanks medium : 0.98 g - Sodium bicarbonate (CAS N° 144-55-8) : 0.035 g - Distilled water : sufficient quantity for 100 mL - shaking until complete dissolution of the compounds, measurement of the pH and adjustment to 7.4 ± 0.2 with a 4M HCl solution. <u>Transport medium:</u> buffered Hanks medium, completed with 0.2% of Penicillin-Streptomycin solution (CAS N° 69-57-8 / CAS N° 3810-74-0). Once reconstituted, the transport medium can be preserved during 4 days at 5 ± 3 °C. <u>Nutritive medium:</u> - Eagle Minimum Essential Medium : 0.94 g - Sodium bicarbonate (CAS N° 144-55-8) : 0.22 g - Distilled water : sufficient quantity for about 90 mL - shaking until complete dissolution of the compounds, then addition of the following solutions: - Foetal Bovine Serum FBS : 1 mL - L-glutamine 200 mM (CAS N° 56-85-9) : 1 mL - Penicillin/Streptomycin solution (CAS N° 69-57-8 / CAS N° 3810-74-0) : 0.25 mL - Distilled water : sufficient quantity for 100 mL - shaking once again, then measurement of the pH and adjustment to 7.4 ± 0.2 with a 4M HCl solution. <u>Nutritive medium with phenol red (for rinsing of test items):</u> addition of 0.1% (V/V) of a solution of phenol red (CAS N° 143-74-8) to 0.2% (P/V).

METHODOLOGY
(CON'T)**Fluorescein solution :**

- Fluorescein (CAS N° 518-47-8) : 0.4 g
- DPBS⁺ : sufficient quantity for 100 mL
- validation of the trial: dilution of this solution to 1/500th (20 µL in 10 mL) in the nutritive medium (final fluorescein concentration of 8 µg/mL).

Test system preparation**Eyes selection:**

- from reception of eyes: detection of defects of the cornea (neovascularization, pigmentation, opacity, scratches) by immersing the eyes in a jar containing buffered Hanks medium and putting them under a cold light source: observation of the cornea by making revolve the eye so as to see any zone more or less refractive under the light or any stripe (scratch)
- elimination of eyes presenting defects
- elimination of the too big eyes (to avoid the formation of folds during the mounting of corneas)
- all the stages were performed by avoiding touching corneas, in order not to damage them.

Dissection and immersion of corneas:

for each selected eye:

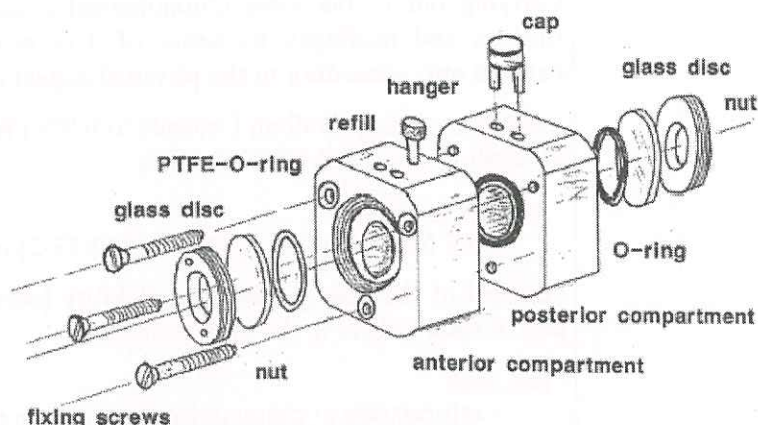
- incision on the scleral ring, using a scalpel, then dissection of the cornea, using scissors, leaving 2 or 3 mm of the scleral ring
- immersion of the corneas in buffered Hanks medium
- directly use of the corneas.

Mounting of the holders:

- deposit of each fresh cornea, epithelial side upward, on the posterior part of the specific numbered holders (see next page)
- each cornea should stick out of the joints in order to make it airtight later on
- placement of the anterior part of the holder above the corneas
- screwing on with an electric screwdriver in order to ensure the waterproofness of the system without any risk for the cornea
- identification of each cornea with the corresponding holder number.

METHODOLOGY (CONT)

BCOP corneal holder



Pre-incubation of the corneas:

- in order to eliminate the air bubbles, filling, excessively, of the anterior compartments (epithelial side) and posterior (endothelial side), with nutritive medium at room temperature
- incubation of the holders in a water-bath at 32 ± 1 °C, for at least 1 hour, in a horizontal position and immersed in three quarters of their height
- regular controls of the homogeneity of water-bath temperature
- control of the temperature of water-bath during the experimentation
- the water level of the water-bath should remain the same throughout the experiment and during each trial
- adjustment of the water level above the junction of two compartments, when the holders were in vertical position.

Measurement of the initial opacity of the corneas

- measurement using an opacitometer (OPKIT), which determines a change in light transmission between an "empty" holder (containing nutritive medium only) and a "treated" holder, and displays a numerical value of opacity
- calibration of the opacitometer, with specific calibrators, before each measurement of the corneal opacity
- values of opacity of the calibrators:
 - calibrator 1: 73 to 77
 - calibrator 2: 147 to 153
 - calibrator 3: 220 to 240
- if necessary: values adjustment with the "calibrator" button
- change of the nutritive medium of the posterior compartment and wiping of each holder
- measurement of the initial opacity (OPT0) of each cornea versus an "empty" holder (containing only nutritive medium).

METHODOLOGY
(CON'T)

Preparation and modalities of application of controls and test item

Carrying out in the same chronological order of each operation (treatments, rinsings and readings), by series of 3 corneas. **One contact timepoint was carried out, according to the physical aspect of the test item.**

- negative control: Sodium Chloride to 0.9% (W/V) (NaCl – CAS N° 7647-14-5) in sterile water (CAS N° 7732-18-5)

- positive control:

10% NaOH (W/W) (CAS N° 1310-73-2) in sterile water

- control of the homogeneity and stability (observation and measurement of the pH) of each control in the trial conditions.

- test item:

- information to characterize the test item provided by the Sponsor

- determination of the modalities of application:

. category: non-surfactant / aspect : liquid)

→ **to be tested as supplied / contact timepoint = 10 ± 1 minutes**

- measurement of the pH of the test item

- control by I.E.C. of the homogeneity (visual control) of the test item and confirmation by the Sponsor of the stability in the storage conditions

- tested as supplied

- control of the homogeneity and stability (observation and measurement of the pH) of the test item in the trial conditions.

The following stages were carried out chronologically:

- removing of the nut and the glass disk of the anterior compartment

- aspiration of the nutritive medium of the anterior compartment using a specific vacuum pump

- application of 750 ± 8 μ L of the test item and of each control directly on the cornea using a positive-displacement micropipette

- starting of the chronometer for each series, after the treatment of the 1st cornea

- incubation in a water-bath at 32 ± 1 °C, in a vertical position (screw upward) for 10 ± 1 minutes.

METHODOLOGY
(CON'T)
Rinsing (at the end of the contact timepoint)

- performed precisely at the end of the contact timepoint (chronometer alarm) by series of 3 corneas
- elimination of each control and of the test item by reversing of the supports
- rinsing 3 times with nutritive medium with phenol red at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (the corneas were rinsed more than 3 times if the phenol red was still discoloured or the test substance was still visible)
- final rinsing with nutritive medium (without phenol red)
- efficacy of the rinsing visually evaluated according to the transparency of the rinsing medium
- filling of the anterior compartment with nutritive medium at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 50 mL syringe
- incubation of the holders in a water-bath at about $32 \pm 1^\circ\text{C}$, in a horizontal position, for 2 hours $\pm$ 10 minutes.

Measurement of the corneal opacity

- replacing of the nutritive medium in the posterior compartments using a 50 mL syringe
- wiping of each holder
- measurement of the opacity OPT2 (= OPT "2 hours") of each cornea versus an "empty" holder (containing nutritive medium only).

Measurement of the corneal permeability
Addition of the fluorescein solution:

- aspiration of the medium of the anterior compartment using a vacuum pump
- deposit of 1 mL of the fluorescein solution to 4 mg/mL (0.4%), in the anterior compartment
- incubation of the holders at $32 \pm 1^\circ\text{C}$ for 90 ± 5 minutes in a vertical position.

Measurement of optical density (O.D.):

- sample of the medium contained in each posterior compartment
- deposit of each sample in tubes identified by the corneas holders numbers
- transfer of 360 μL of this sample onto microplates of 96 wells with a micropipette
- measurement of O.D. with a plates reader at 490 nm (blank = nutritive medium).

<u>METHODOLOGY</u> (CONT)	<u>Determination of the theoretical O.D.:</u> Determined for each new batch of fluorescein by establishing a standard curve connecting the O.D. to the concentration of fluorescein (1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-12-14-16-20 and 40 µg/mL). The graph being under a linear form, the calculation of the gradient permitted the calculation of theoretical O.D. for the concentration 8 µg/mL. It also permitted to determine a value of optical density beyond which the medium had to be diluted (beginning of the plate stage). Each medium of which the O.D. exceeded this value was diluted to 1/4 in the nutritive medium. The O.D. value obtained was then multiplied by 4 during the final calculations. <u>Corneas examination</u> - dismantling of each holder - observation of the cornea condition: epithelium detachment, visible modification of the cornea (oedema, colouring, ...).
<u>ANALYSIS</u> <u>OF THE DATA</u> <u>AND</u> <u>CLASSIFICATION</u>	<u>Calculation</u> - correction of the opacity and optical density values by subtracting the mean value obtained with the negative control corneas - calculation of the mean of each parameter (OPT2-OPT0 and O.D.) - calculation of the in vitro irritancy score (IVIS) from the corrected values: $IVIS = (OPT2 - OPT0) + (15 \times O.D.)$ <u>Classification</u> $IVIS \geq 55.1 \rightarrow$ corrosive or severe irritant test item $IVIS < 55.1 \rightarrow$ test item not classified corrosive or severe irritant
<u>VALIDATION</u> <u>OF THE TRIAL</u>	<u>Validity criteria of the trial</u> - initial opacity (OPT0) of the corneas: between 0 and 7 - O.D. of the negative control corneas (nutritive medium): lower than 0.100 - O.D. of the fluorescein solution: . solution to 8 µg/mL: between 1.360 and 1.520 - value of positive control: . 10% NaOH solution (10 minutes): value between 220.0 and 300.0
<u>INTERPRETATION</u> <u>OF THE RESULTS</u>	Under the experimental conditions adopted, basing on the score obtained.

INSTITUT D'EXPERTISE CLINIQUE

Head Office: route de Bibost, 69690 Bessenay – France
Phone: +33 (0) 4.74.70.93.39 - Fax: +33 (0) 4.74.70.94.98

BCOP: CHARACTERISATION, RESULTS AND CLASSIFICATION

according to the General Study Plan N° 20140032 of 27 May 2014
and to the Specific Study Plan N° 140905SSP of 3 June 2014

CHARACTERISATION OF THE TEST ITEM

Designation : **M.DUBIA, T. LEPIDOTA AND P. BOGOTENSIS BLEND 10% SOLUTION** (batch n°NB00406-2014 of 29/04/2014)
Type of product : ingredients combination
Manufacturing date : 29/04/2014
Shelf life : 29/10/2015
Aspect of the provided product : liquid very light yellow in color
pH provided by the Sponsor's Representative : 3.4
Stability under the storage conditions: confirmed by the Sponsor
Homogeneity under storage conditions: yes (checked by I.E.C.)
Qualitative composition : Myrciaria dubia fruit / Tibouchina lepidota leaf extract / Phytolacca bogotensis leaf extract

RESULTS AND CLASSIFICATION

(see, in appendix 1, the compiled data)

pH of the test item: 3.27
Homogeneity under the storage conditions: checked
Quantity applied : $750 \pm 8 \mu\text{L}$ per cornea
Contact timepoint : 10 ± 1 minutes
Aspect of the tested test item: liquid very light yellow in color
Homogeneity and stability under the trial conditions: yes

Test item	Score (10 minutes)	Classification
As supplied	0.8 ± 1.5	Not classified corrosive or severe irritant

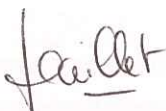
- the results of the positive control are in conformity with the awaited data (see appendix 1)
- the results of the opacity and the O.D. of the negative control are in conformity with the criteria of validity of the test (see appendix 1)
- the results of the O.D. of fluorescein solution are in conformity with the criteria of validity of the test (see appendix 1).

CONCLUSION

From the results obtained under the experimental conditions adopted, the test item designated as "M.DUBIA, T. LEPIDOTA AND P. BOGOTENSIS BLEND 10% SOLUTION (batch n°NB00406-2014 of 29/04/2014)", applied as supplied, is "not classified corrosive or severe irritant " for the isolated bovine cornea, after 10 minutes of contact .

Lyon,

27/06/14



Stéphanie MAILLET
Study Director

Q U A L I T Y A S S U R A N C E
--

The audit of the General Study Plan was performed when the Quality Assurance signed it.
The date of this audit and the transmission's dates of the report to the Study Director and to the Test Facility Management are given below:

Quality Audit
27 May 2014

Study Director
27 May 2014

Test Facility Management
27 May 2014

The process audit of this type of study is carried out at least once a semester.
The dates of this audit and the transmission's dates of the report to the Study Director and to the Test Facility Management are given below (audit report n° 0644F14):

Quality Audit
02 and 03 June 2014

Study Director
04 June 2014

Test Facility Management
04 June 2014

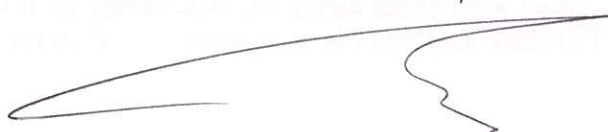
The raw data and the report were audited by the Quality Assurance.
This report is an accurate account of the procedures followed, and accurately records the original raw laboratory data generated in this study.
The date of this audit and the transmission's dates of the report to the Study Director and to the Test Facility Management are given below:

Quality Audit
26 June 2014

Study Director
26 June 2014

Test Facility Management
26 June 2014

Lyon,

27/06/2014


Etienne DALACHE
Quality Executive Manager

A M E N D M E N T (S) A N D C O M P L I A N C E T O T H E S T U D Y P L A N (S)

No amendment to the protocol was issued during the course of this study.

No incident which could have affected the quality or the interpretation of the results obtained was observed.

S T O R A G E A N D E L I M I N A T I O N O F T H E T E S T I T E M , O F T H E C O N T R O L P R O D U C T S A N D O F T H E T E S T S Y S T E M

The test item was kept at room temperature away from light, according to the Sponsor's recommendations.

A sample of the test item will be kept under lock and key in our facilities for about four months as of the date of dispatch of the final report.

From this date on, and with no contrary advice of the Sponsor, the test item will be destroyed by LABO-SERVICES company, route de la Centrale, BP 98, 69702 Givors Cedex – France.

The reagents entering into the composition of the negative and positive controls are stored in a cupboard provided for this purpose and will be destroyed by the above-mentioned company.

To be noted that all the corneas (not selected, used or not during the experiment) are frozen at -20 °C before being destroyed by SITA CENTRE EST, Gerland Plaza Bâtiment A – n° 19 rue Pierre Gilles de Gennes – 69007 Lyon – France.

D A T A R E C O R D I N G A N D A R C H I V I N G

All hand-written data were immediately transcribed in Case Report Forms (CRF) constituted, paginated and fastened before the start of the experiment.

Once the final report is signed, the Study Director will transmit, for archiving, the original documents, including the General and Specific Study Plans, the final report (and amendments if any) and all raw data, which will be kept for 5 years at the following addresses:

- . For the 2 to 6 months following dispatch of report:
I.E.C., 88, boulevard des Belges, 69006 Lyon – France
- . For the following years: in the premises of the EVERIAL company
Head office: 27, rue de la Villette, 69003 Lyon – France.

Once this period is over, the Sponsor will be contacted regarding its archives. No archive document will be destroyed without written and signed agreement from the Sponsor.

G U I D E L I N E S

Arrêté du 10 août 2004 pris pour l'application de l'article L.5131-5 du code de la santé publique relatif aux Bonnes Pratiques de Laboratoire pour les produits cosmétiques (Journal Officiel n° 218 du 18 septembre 2004), Ministère de la Santé et de la Protection sociale.

Avis aux fabricants ou aux responsables de la mise sur le marché d'un produit cosmétique relatif à l'information concernant l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine prévue à l'article R.5131-2 (4) du code de la santé publique au regard notamment des essais de sécurité devant être réalisés selon les principes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) figurant en annexe de l'arrêté du 10 août 2004. Bulletin officiel Santé – Protection Sociale – Solidarité (N° 2010/5 - 15 juin 2010).

ISO 9001:2008, Quality management systems – Requirements: X 50-131.

Muir, C.K., 1984 – A simple method to assess surfactant- induced bovine corneal opacity in vitro: preliminary findings. Toxicology letters, 22: 199-203.

OECD (2009). Guideline 437. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.

OECD Principles on Good Laboratory Practices (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17.

The Application of the GLP Principles to short and term studies, ENV/JM/MONO(99)23.

The Application of the GLP Principles to in vitro studies, ENV/JM/MONO(2004)26.

B I B L I O G R A P H I C A L R E F E R E N C E S
--

Draize, J.H., Woodward, G., Calvery, H.O., 1944 – Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology*, 82: 377-390.

Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J., 1992 – Bovine Corneal Opacity and Permeability test – an in vitro assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18: 442-449.

Gautheron, P., Giroux, J., Cottin, M., Audegond, L., Morilla, A., Mayordomoblanc, L., Tortajada, A., Haynes, G., Vericat, J., Piravano, R., Gillio Tos, E., Hagemann, C., Vanparys, P., Deknudt, G., Jaidos, G., Prinsen, M., Kalweit, S., and Spielmann, H., 1994 – Interlaboratory assessment of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay. *Toxicology in vitro*, 8: 381-392.

ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (ICEATM). NIH Publication No.: 07-4517.

ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

Muir, C.K., 1984 – A simple method to assess surfactant-induced bovine corneal opacity in vitro: preliminary findings. *Toxicology letters*, 22: 199-203.

Muir, C.K., 1985 – Opacity of bovine cornea in vitro induced by surfactants and industrial chemicals compared with ocular irritancy in vivo. *Toxicology letters*, 24: 157-162.

Rougier, A., Cottin, M., De Silva, O., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Dossou, K.G. Investigation for a new strategy towards ocular safety assessment, *Proceedings, 17th IFSCC International Congress*, Yokohama, 1992.

Vanparys, P., Deknudt, G., Sysmans, M., Teuns, G., Coussement, W., Van Cauteren, H., 1993 – Evaluation of the Bovine Corneal Opacity Permeability assay as an in vitro alternative to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicology in vitro*, 7: 471-476.

Vanparys, P. et coll., 1993 – In vitro evaluation of 50 pharmaceutical and commercially available compounds by BCOP assay – *Toxicology in vitro*, 7 (4): 471-476.

APPENDIX 1:

RESULTS

EXPERIMENTAL TECHNICIANS: Laetitia DARNAND

Caroline SING NGUYEN VAN BACH

TEST ON ISOLATED BOVINE CORNEA - SCORE CALCULATION								
CONTACT TIMEPOINT:		OPACITOMETER ELECTRICAL ZERO = 0						
10 minutes		OPACITY before treatment (OPT0)				PERMEABILITY		
Eye receipt date: 03/06/14				CONTROL	MEASURE	wavelength: 490 nm		
Date : 03/06/14		CALIBRATOR 1:		-77	73	OD:	1.430	
Use of cornea upon receipt		CALIBRATOR 2:		-155	153	(8 µg/mL solution)		
		CALIBRATOR 3:		-235	230			
STUDY N°	140905	OPACITY 2 HOURS after rinsing (OPT2)						
		CALIBRATOR 1:		-72	73			
Empty holder N°:	96	CALIBRATOR 2:		-146	150			
		CALIBRATOR 3:		-230	232			
Holder N°	TREATMENT	OPT0	OPT2	OPT2 - OPT0	corrected opacity	DO	corrected OD	SCORE OPc+15DOc
7	Negative control	5	0	-5		0.011		
17		5	0	-5		0.009		
1		5	0	-5		0.020		
Comments:		MEAN:			-5.0	0.013		
		STANDARD DEVIATION			0.0	0.006		
97	NaOH 10%	5	198	193	198.0	6.652	6.639	297.6
107		2	188	186	191.0	6.284	6.271	285.1
12		7	196	189	194.0	6.744	6.731	295.0
Comments:		MEAN:			194.3		6.547	292.5
Detachment of the epithelium and edema		STANDARD DEVIATION			3.5		0.243	6.6
42	M. DUBIA, T. LEPIDOTA AND P. BOGOTENSIS BLEND 10%	7	1	-6	-1.0	0.026	0.013	-0.8
85	I.E.C.: 140905 01154001	4	1	-3	2.0	0.023	0.010	2.1
61	as supplied	4	0	-4	1.0	0.021	0.008	1.1
Comments:		MEAN:			0.7		0.010	0.8
x		STANDARD DEVIATION			1.5		0.003	1.5

APPENDIX 2:

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH GOOD LABORATORY PRACTICES (SAFETY TESTS)



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Direction de l'inspection et des établissements

**EVALUATION DE LA CONFORMITE AUX
BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE**
selon la directive 2004/9/CE (ESSAIS DE SECURITE)
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH GOOD LABORATORY PRACTICES
according to Directive 2004/9/CE (SAFETY TESTS)

— Nom et adresse de l'installation d'essai :
Name and location of the test facility

INSTITUT D'EXPERTISE CLINIQUE - IEC
88 BOULEVARD DES BELGES
69006 LYON

Objet de l'inspection :
Purpose of the inspection

état des lieux : ☒
Test facility inspection

vérification d'étude(s) : ☒
Study audit

Date(s) d'inspection*: 22-23 novembre 2011
Date(s) of the inspection

Degré de conformité aux B.P.L. **:
Status

A

Catégorie(s) d'éléments d'essai : produits cosmétiques
Types of Test items

Domaine d'activité : irritation cutanée et oculaire, phototoxicité, irritation buccale et vaginale.
Areas of expertise

Commentaires éventuels : néant.
Observations (if applicable)

Fait à Saint-Denis (France), le :
date of the statement

Adjoint au directeur
de l'inspection et des Etablissements

13 MARS 2012

Pierre-Henri BERTOYE

* Les installations du programme d'inspection de l'Afssaps sont réinspectées en principe tous les 2 ans. The test facilities included in the Afssaps monitoring program are inspected on a two year basis.

** A : conformité aux B.P.L. (in conformity with GLP);
B : conformité partielle aux B.P.L. avec déviations mineures ne remettant pas en cause la fiabilité des études (minor deviations which do not affect the validity of studies conducted in the laboratory);
C : absence de conformité aux B.P.L. (not in conformity with GLP).

APPENDIX 3:

SPECIFIC STUDY PLAN AND AMENDMENT IF ANY



IEC
FRANCE
INSTITUT
d'EXPERTISE
CLINIQUE **SPECIAL**

IN VITRO SPECIFIC STUDY PLAN

SPECIFIC STUDY : N° 140905SSP of 3 June 2014

SPONSOR : LABORATORIOS MyN y COMPANIA LTDA

SPONSOR'S
REPRESENTATIVE : Mrs C. GAMA

IN VITRO STUDY : OCULAR PRIMARY IRRITATION (B.C.O.P.)
according to the OECD protocol n° 437
(contact timepoint: 10 minutes)

GENERAL STUDY : N° 20140032 of 27 May 2014
PLAN

TEST ITEM : M.DUBIA, T. LEPIDOTA AND P. BOGOTENSIS BLEND 10%
SOLUTION (batch n°NB00406-2014 of 29/04/2014)

I.E.C. CODE : 140905 01154001
NUMBER

TYPE OF PRODUCT : Non surfactant liquid

ASPECT : Liquid very light yellow in color

CONCENTRATION : As supplied

ESTIMATED STUDY SCHEDULE :

- Experiment starting and completion date: Tuesday 3 June 2014
- Sending of the preliminary results by e-mail: week of 9 June 2014
- Sending of the final report: week of 23 June 2014

Lyon,
03/26/14

Stéphanie MAILLET
Study Director

C.C.: Test Facility Management, Quality Assurance, Experimentators

This Specific Study Plan must be approved by the Sponsor's Representative by e-mail. Agreement e-mail is kept with the present document.

1-page document

SSP -BCOP-OCDE-02-12-10

88, Bd des Belges 69006 LYON - FRANCE

Tel: +33 (0)4 72 69 89 60 - Fax +33 (0)4 72 69 89 67 - e-mail: info@echange.com

www.iecfrance.com

FRANCE - JAPAN - SINGAPORE - KOREA - BULGARIA - SPAIN - SOUTH AFRICA - CHINA - INDIA

AUTORISATIONS DU MINISTÈRE DE LA SANTÉ

Model waterfalls, dams, and rapids are on the left side of the trail. The trail crosses the river and continues on the right side. The trail is well-maintained and is a popular spot for picnics and fishing.



IEC
FRANCE
INSTITUT
SCIENTIFIQUE
COSMETOLOGIQUE

CONFIDENCIAL

REPORTE: ESTUDIO DE SEGURIDAD IN VITRO

**IRRITACIÓN PRIMARIA OCULAR
B.C.O.P.**

ESTUDIO REALIZADO EN LA CÓRNEA BOVINA AISLADA
MEDICIÓN DE LA OPACIDAD Y PERMEABILIDAD CORNEAL BOVINA
(Según el protocolo de la OCDE No. 437 del 7 de septiembre de 2009)

ELEMENTO DE PRUEBA : M. DUBIA, T. LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS SOLUCIÓN EN
MEZCLA AL 10% (lote No. NB00406-2014 de 29/04/2014)

NÚMERO DE CÓDIGO IEC : 140905 01154001

PLAN DE ESTUDIO GENERAL : No. 20140032 de 27 de mayo de 2014

PLAN DE ESTUDIO ESPECÍFICO : No. 140905SSP de 3 de junio de 2014

INFORME : No. 140905RD de 27 de junio de 2014

CRONOGRAMA

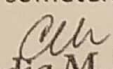
Fecha de inicio y finalización del experimento: 3 de junio de 2014

Fecha de finalización: 27 de junio de 2014

REPRESENTANTE DEL PATROCINADOR	DIRECTOR DEL ESTUDIO
Sra. C. GAMA Química Farmacéutica Laboratorios MyN y Compañía LTDA Carrera 67 No. 67A-62. BOGOTÁ - COLOMBIA	Señorita S. MAILLET Farmacéutico Licenciada en Cosmetología I.E.C. 88, boulevard des Belges 69006 LYON – FRANCIA

Documento de 22 páginas

Este documento no tiene valor contractual. Cualquier copia, incluso incompleta, debe someterse a una autorización por escrito de I.E.C.


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



Contenido

AUTENTICACIÓN.....	3
DECISIÓN.....	3
PROTOCOLO.....	5
OBJETIVO DEL ESTUDIO.....	5
TIPO DE ESTUDIO.....	5
RELEVANCIA DEL ESTUDIO.....	5
SISTEMA DE PRUEBA.....	5
METODOLOGÍA.....	6
ANÁLISIS DE LOS DATOS Y CLASIFICACIÓN.....	12
VALIDACIÓN DEL ENSAYO.....	12
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	12
CARACTERIZACIÓN, RESULTADOS Y CLASIFICACIÓN.....	13
CARACTERIZACIÓN DEL ELEMENTO DE PRUEBA.....	13
RESULTADOS Y CLASIFICACIÓN.....	13
CONCLUSIÓN.....	14
ASEGURAMIENTO DE CALIDAD.....	15
ENMIENDA(S) Y CUMPLIMIENTO DEL(LOS) PLAN(ES) DE ESTUDIO.....	16
ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN DEL ELEMENTO DE PRUEBA, DE LOS PRODUCTOS DE CONTROL Y DEL SISTEMA DE PRUEBA.....	16
REGISTRO Y ARCHIVO DE DATOS.....	16
LINEAMIENTOS.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
APÉNDICE 1 :.....	19
RESULTADOS.....	19
APÉNDICE 2 :.....	21
DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO.....	21
(PRUEBAS DE SEGURIDAD).....	21
APÉNDICE 3:.....	23
PLAN DE ESTUDIO ESPECÍFICO Y ENMIENDA, SI LO HAY.....	23


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



AUTENTICACIÓN

El tema de estudio del presente informe se llevó a cabo bajo mi responsabilidad, de conformidad con los Planes de Estudio Generales y Específicos, y de acuerdo con los Procedimientos Operativos Estándar IEC y las Buenas Prácticas de Laboratorio para productos cosméticos (*Texto en Francés*).

Todas las observaciones y datos obtenidos durante este estudio se informan en el presente documento.

He leído este informe, certifico que estos datos son un fiel reflejo de los resultados obtenidos y estoy de acuerdo con su contenido.

DECISIÓN

(grado de cumplimiento del estudio con las Buenas Prácticas de Laboratorio)

El estudio se realizó de acuerdo con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio y se **declara de conformidad con las G.L.P.** (*por su sigla en Inglés*)

Lyon,

Firma
Stephanie MAILLET
Director del Estudio

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



INSTITUT D'EXPERTISE CLINIQUE

Casa matriz: route de Bibost, 69690 Bessenay - Francia
Teléfono: +33 (0) 4.74.70.93.39 - Fax: +33 (0) 4.74.70.94.98

INFORME

PATROCINADOR:
Laboratorios MyN y Compañía LTDA

ELEMENTO DE PRUEBA:
SOLUCIÓN DE MEZCLA AL 10%, M. DUBIA, T.
LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS.
(lote No. NB00406-2014 de 29/04/2014)

ESTUDIO DE SEGURIDAD IN VITRO:

IRRITACIÓN PRIMARIA OCULAR
B.C.O.P.

ESTUDIO REALIZADO EN LA Córnea Bovina Aislada
MEDICIÓN DE LA OPACIDAD Y PERMEABILIDAD CORNEAL BOVINA
(Según el protocolo de la OCDE No. 437 del 7 de septiembre de 2009)

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



PROTOCOLO	
OBJETIVO DEL ESTUDIO	Evaluar la irritación primaria ocular de un objeto de ensayo mediante la determinación de su efecto sobre la opacidad y permeabilidad de las córneas bovinas obtenidas de ojos recién recolectados en un matadero.
TIPO DE ESTUDIO	Estudio in vitro realizado sobre córnea bovina aislada, según protocolo de la OCDE No. 437 del 7 de septiembre de 2009.
RELEVANCIA DEL ESTUDIO	La mayoría de los métodos alternativos (in vitro y/o ex vivo) al ensayo de irritación ocular de Draize en conejos (Draize et col., 1944), al fundamentarse en la citotoxicidad, no se relacionan con el indicio principal de irritación ocular que se representa en la opacidad corneal (Gautheron y coll., 1994). El método de opacidad y permeabilidad corneal bovina (BCOP <i>por su sigla en Inglés</i>) se basa en el método de Muir (1984, 1985). Esta técnica es una adaptación de la descrita por Gautheron y coll., 1992, para determinar el potencial de irritación ocular de diversas sustancias. Gracias a este método, se pueden medir dos parámetros como la opacidad y la permeabilidad de la córnea. Por lo tanto, este método se utilizó para predecir la irritación de los productos cosméticos (Rougier y coll., 1992), así como de los productos farmacéuticos y químicos (Vanparys y coll., 1993). De 2003 a 2006, un ICCVAM de taller evaluó 4 métodos in vitro de irritación ocular, de los cuales surgió prueba BCOP (sic). Se demostró que el BCOP es relevante para identificar los productos severamente irritantes o corrosivos a nivel ocular según la clasificación de la UE (R41). La OCDE adoptó esta prueba (septiembre de 2009), para clasificar sustancias como "corrosivos oculares e irritantes severos" según la definición de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA <i>por su sigla en Inglés</i>) (Categoría 1), la Unión Europea (UE) (Categoría R41), y el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS <i>por su sigla en Inglés</i>) de las Naciones Unidas (ONU) (Categoría 1).
SISTEMA DE PRUEBA	Ojos de bovino (de bovinos menores de 12 meses) recolectados en los mataderos de La Talaudiere - Francia (42350) y transportados en un medio estable (medio Hanks tamponado con bicarbonato de sodio), a temperatura ambiente y se usan 4 horas como máximo después de sacrificar a los animales. Este sistema de prueba se adaptó para evaluar el potencial de irritación ocular.

COLOMBIA
ATREIN
OTÁD
TARIO
AUGUS

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

METODOLOGÍA

Preparación de medios y reactivos

Medio de Hanks tamponado:

- Medio de Hanks : 0,98 g
- Bicarbonato de sodio (CAS 144-55-8) : 0,035 g
- Agua destilada : cantidad suficiente para 100 mL
- agitar hasta que se disuelvan completamente los componentes; medir el pH y ajustar a $7,4 \pm 0,2$ con una solución de HCl 4M.

Medio de transporte:

medio de Hanks tamponado, completado con 0,2% de solución de penicilina-estreptomicina (CAS N° 69-57-8 / CAS N° 3810-74-0). Una vez reconstituido, el medio de transporte se puede conservar durante 4 días a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

Medio nutritivo:

- Medio esencial mínimo de Eagle : 0,94 g
- Bicarbonato de sodio (CAS 144-55-8) : 0,22 g
- Agua destilada : cantidad suficiente para 90 mL
- agitar hasta la completa disolución de los compuestos, luego agregar las siguientes soluciones:
- Suero fetal bovino FBS : 1 mL
- L-glutamina 200 mM (CAS No. 56-85-9) : 1 mL
- Solución de penicilina / estreptomicina (CAS No. 69-57-8 / CAS No. 3810-74-0) : 0,25 mL
- Agua destilada : cantidad suficiente para 100 mL
- agitar una vez más, luego medir el pH y ajustar a $7,4 \pm 0,2$ con una solución de HCl 4M.

Medio nutritivo con rojo fenol (para enjuague de los elementos de prueba): adición de 0.1% (V/V) de una solución de rojo fenol (CAS N° 143-74-8) al 0.2% (P/V).

Solución de fluoresceína:

- Fluoresceína (CAS No 518-47-8) : 0,4 g
- DPBS⁺ : cantidad suficiente para 100 mL
- validación del ensayo: dilución de esta solución a 1/500 (20 µL en 10 mL) en el medio nutritivo (concentración final de fluoresceína de 8 µg/mL).

Preparación del sistema de prueba

Selección de ojos:

TA
ROJAS

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

- desde la recepción de los ojos: detección de defectos de la córnea (neovascularización, pigmentación, opacidad, rayones) sumergiendo los ojos en un frasco que contiene medio de Hanks tamponado y poniéndolos bajo una fuente de luz fría: observación de la córnea haciendo girar el ojo para ver cualquier zona con mayor o menor refracción bajo la luz o cualquier raya (rayado)
- eliminación de ojos que presentan defectos
- eliminación de los ojos demasiado grandes (para evitar la formación de pliegues durante el montaje de las córneas)
- todas las etapas se realizaron evitando tocar las córneas, para no dañarlas.

Disección e inmersión de córneas:

para cada ojo seleccionado:

- incisión en el anillo escleral, con bisturí, luego disección de la córnea, con tijeras, dejando 2 o 3 mm del anillo escleral
- inmersión de las córneas en medio de Hanks tamponado
- uso directo de las córneas.

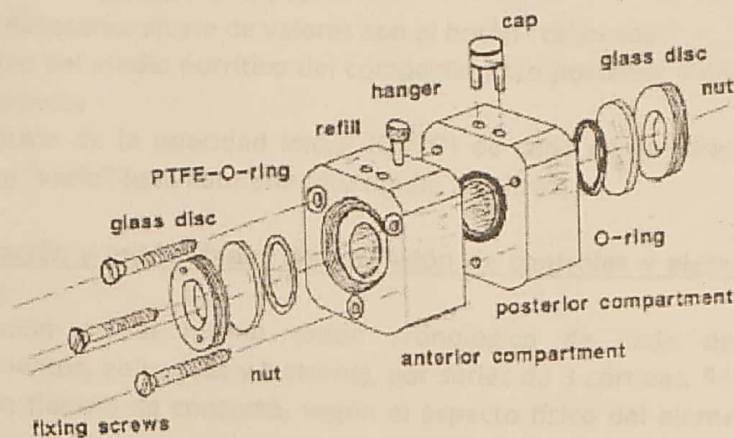
Montaje de los soportes:

- depósito de cada córnea fresca, lado epitelial hacia arriba, en la parte posterior de los soportes numerados específicos (ver página siguiente)
- cada córnea debe sobresalir de las articulaciones para que luego quede hermética
- colocación de la parte anterior del soporte por encima de las córneas
- atornillar con un destornillador eléctrico para asegurar la impermeabilidad del sistema sin ningún riesgo para la córnea
- identificación de cada córnea con el correspondiente número de soporte.

Soporte corneal BCOP

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006





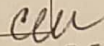
(disco de vidrio, junta tórica de PTFE, recarga, colgador, tapa, disco de vidrio, tuerca, junta tórica, compartimento posterior, compartimento anterior, tuerca, tornillos de fijación)

Pre-incubación de las córneas:

- para eliminar las burbujas de aire, llenando, en exceso, los compartimentos anterior (lado epitelial) y posterior (lado endotelial), con medio nutritivo a temperatura ambiente
- incubación de los soportes en baño María a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, durante al menos 1 hora, en posición horizontal y sumergidos en tres cuartas partes de su altura
- controles regulares de la homogeneidad de la temperatura del baño María
- control de la temperatura en baño María durante la experimentación
- el nivel del agua del baño María debe permanecer igual durante todo el experimento y durante cada prueba
- ajuste del nivel del agua por encima de la unión de dos compartimentos, cuando los soportes estaban en posición vertical.

Medida de la opacidad inicial de las córneas.

- medición con un opacitómetro (OPKIT), que determina un cambio en la transmisión de luz entre un soporte "vacío" (que contiene sólo medio nutritivo) y un soporte "tratado", y muestra un valor numérico de opacidad
- calibración del opacitómetro, con calibradores específicos, antes de cada medición de la opacidad corneal.
- valores de opacidad de los calibradores:
 - calibrador 1: 73 a 77
 - calibrador 2: 147 a 153


Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

- calibrador 3: 220 a 240
- si es necesario: ajuste de valores con el botón "calibrador"
- cambio del medio nutritivo del compartimento posterior y limpieza de cada soporte
- medición de la opacidad inicial (OPTO) de cada córnea frente a un soporte "vacío" (que contiene sólo medio nutritivo).

Elaboración y modalidades de aplicación de controles y elemento de prueba

Realización en el mismo orden cronológico de cada operación (tratamientos, enjuagues y lecturas), por series de 3 córneas. **Se llevó a cabo un tiempo de contacto, según el aspecto físico del elemento de prueba.**

- control negativo: Cloruro de sodio al 0,9% (P/V) (NaCl - CAS No. 7647-14-5) en agua estéril (CAS N° 7732-18-5)

- control positivo:

NaOH al 10% (W/W) (CAS No. 1310-73-2) en agua esterilizada

- control de la homogeneidad y estabilidad (observación y medida del pH) de cada control en condiciones de prueba.

- Elemento de prueba:

- información para caracterizar el elemento de prueba proporcionado por el patrocinador
- determinación de las modalidades de aplicación:
categoría: no tensioactivo / aspecto: líquido)
 - **a probar según suministro / tiempo de contacto = 10 ± 1 minutos**
- medición del pH del elemento de prueba
- control por I.E.C de la homogeneidad (control visual) del elemento de prueba y confirmación por parte del patrocinador de la estabilidad en las condiciones de almacenamiento
 - probado según se suministra
 - control de la homogeneidad y estabilidad (observación y medición del pH) del elemento de prueba en las condiciones de prueba.

Las siguientes etapas se llevaron a cabo cronológicamente:

- extracción de la tuerca y el disco de vidrio del compartimento anterior
- aspiración del medio nutritivo del compartimento anterior mediante una bomba de vacío específica
- aplicación de $750 \pm 8 \mu\text{L}$ del elemento de prueba y de cada control directamente en la córnea utilizando una micropipeta de desplazamiento positivo



CMM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

- inicio del cronómetro para cada serie, después del tratamiento de la 1ª córnea
- incubación en baño María a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, en posición vertical (tornillo hacia arriba) durante 10 ± 1 minutos.

Lavado (al final del tiempo de contacto)

- realizado precisamente al final del punto de tiempo de contacto (alarma de cronómetro) en series de 3 córneas
- eliminación de cada control y del elemento de prueba invirtiendo los soportes
- enjuague 3 veces con medio nutritivo con rojo de fenol a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (las córneas se enjuagaron más de 3 veces si el rojo de fenol estaba aún descolorido o la sustancia de ensayo aún era visible)
- lavado final con medio nutritivo (sin rojo fenol)
- eficacia del lavado evaluada visualmente según la transparencia del medio de lavado
- llenado del compartimento anterior con medio nutritivo a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ con una jeringa de 50 mL
- incubación de los soportes en un baño María a aproximadamente $32 \pm 1^\circ\text{C}$, en posición horizontal, durante 2 horas ± 10 minutos.

Medida de la opacidad de las córneas

- sustitución del medio nutritivo en los compartimentos posteriores con una jeringa de 50 ml
- limpieza de cada soporte
- medición de la opacidad OPT2 (= OPT "2 horas") de cada córnea frente a un soporte "vacío" (que contiene sólo medio nutritivo).

Medida de la permeabilidad corneal

Adición de la solución de fluoresceína:

- aspiración del medio del compartimento anterior mediante una bomba de vacío
- depósito de 1 mL de la solución de fluoresceína a 4 mg/mL (0,4%), en el compartimento anterior
- incubación de los soportes a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 90 ± 5 minutos en posición vertical.

Medida de densidad óptica (O.D. por su sigla en Inglés):

- muestra del medio contenido en cada compartimento posterior
- depósito de cada muestra en tubos identificados por los números de soporte de las córneas



CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

- transferencia de 360 μ L de esta muestra en microplacas de 96 wells con una micropipeta
- medición del O.D. con un lector de placas a 490 nm (blanco = medio nutritivo).

Determinación del O.D. Teórico:

Determinado para cada nuevo lote de fluoresceína mediante el establecimiento de una curva estándar que conecta el O.D. con la concentración de fluoresceína (1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-12-14-16-20 y 40 μ g / mL). Al estar el gráfico en forma lineal, el cálculo del gradiente permitió calcular el O.D. teórico para la concentración 8 μ g/mL.

También permitió determinar un valor de densidad óptica más allá del cual se debía diluir el medio (inicio de la etapa de placa). Cada medio cuya O.D. supera este valor se diluyó a 1/4 en el medio nutritivo. El valor de O.D. obtenido se multiplicó luego por 4 durante los cálculos finales.

Examen de córneas

- desmontaje de cada soporte
- observación del estado de la córnea: desprendimiento del epitelio, modificación visible de la córnea (edema, coloración...).

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

ANÁLISIS DE LOS DATOS Y CLASIFICACIÓN	<u>Cálculo</u> - corrección de los valores de opacidad y densidad óptica restando el valor medio obtenido con las córneas de control negativo - cálculo de la media de cada parámetro (OPT2-OPTO y O.D.) - cálculo de la puntuación de irritación in vitro (IVIS <i>por su sigla en Inglés</i>) a partir de los valores corregidos: $IVIS = (OPT2-OPTO) + (15 \times O.D.)$ <u>Clasificación</u> IVIS ≥ 55.1 → elemento de prueba corrosivo o irritante severo IVIS < 55.1 - → elemento de prueba no clasificado como corrosivo o irritante severo
VALIDACIÓN DEL ENSAYO	<u>Criterios de validez del ensayo</u> - opacidad inicial (OPTO) de las córneas: entre 0 y 7 - O.D. de las córneas de control negativo (medio nutritivo): inferior a 0,100 - O.D. de la solución de fluoresceína: solución a 8 µg / mL: entre 1.360 y 1.520 - valor de control positivo: - Solución de NaOH al 10% (10 minutos): valor entre 220,0 y 300,0
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	En las condiciones experimentales adoptadas, con base en la puntuación obtenida.



CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

INSTITUT D'EXPERTISE CLINIQUE

Casa matriz: route de Bibost, 69690 Bessenay - Francia
Teléfono: +33 (0) 4.74.70.93.39 - Fax: +33 (0) 4.74.70.94.98

BCOP: CARACTERIZACIÓN, RESULTADOS Y CLASIFICACIÓN

según el Plan General de Estudios No 20140032 de 27 de mayo de 2014
y al Plan de Estudios Específico No. 140905SSP de 3 de junio de 2014

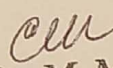
CARACTERIZACIÓN DEL ELEMENTO DE PRUEBA

Designación : M. DUBIA, T. LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS, SOLUCIÓN EN MEZCLA AL 10% (lote No. NB00406-2014 de 29/04/2014)
Tipo de producto : combinación de ingredientes
Fecha de Fabricación : 29/04/2014
Vida en Estante : 29/10/2015
Aspecto del producto proporcionado : líquido de color amarillo muy claro
pH proporcionado por el representante del patrocinador : 3.4
Estabilidad en las condiciones de almacenamiento: confirmada por el patrocinador
Homogeneidad en condiciones de almacenamiento: sí (comprobado por I.E.C.)
Composición cualitativa: Fruto de myrciaria dubia / extracto de hoja de Tibouchina lepidota / extracto de hoja de Phytolacca bogotensis

RESULTADOS Y CLASIFICACIÓN

(ver, en el apéndice 1, los datos recopilados)

pH del elemento de prueba: 3.27
Homogeneidad en condiciones de almacenamiento: comprobado
Cantidad aplicada : $750 \pm 8 \mu\text{L}$ por córnea
Hora de contacto : 10 ± 1 minutos
Aspecto del elemento de prueba probado: líquido de color amarillo muy claro
Homogeneidad y estabilidad en las condiciones de prueba: sí


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Elemento de prueba	Puntuación (10 minutos)	Clasificación
Tal como se suministra	0.8 ± 1.5	No se clasifica como corrosivo o irritante severo.

- los resultados del control positivo se ajustan a los datos esperados (ver apéndice 1)
- los resultados de la opacidad y el O.D. del control negativo se ajustan a los criterios de validez de la prueba (ver apéndice 1)
- los resultados del O.D. de la solución de fluoresceína se ajustan a los criterios de validez de la prueba (ver apéndice 1).

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en las condiciones experimentales adoptadas, el ítem de ensayo denominado "M.DUBIA, T. LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS, MEZCLA DE SOLUCIÓN AL 10% (lote No. NB00406-2014 del 29/04/2014)", aplicado tal como se suministra, "no se clasifica como corrosivo o irritante severo" para la córnea bovina aislada, después de 10 minutos de contacto.

Lyon,

Firma

Stephanie MAILLET

Director del Estudio

CM
Claudia M. Marín
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español / Español - Inglés
 Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

La auditoría del Plan General de Estudios se realizó al momento de la firma por parte de Aseguramiento de la Calidad.

La fecha de esta auditoría y las fechas de transmisión del informe al Director del Estudio y a la Administración de la instalación de pruebas se indican a continuación:

Auditoría de Calidad
27 de mayo de 2014

Director del Estudio
27 de mayo de 2014

Gestión de instalaciones de prueba
27 de mayo de 2014

La auditoría de procesos de este tipo de estudios se realiza al menos una vez al semestre.

Las fechas de esta auditoría y las fechas de transmisión del informe al Director del Estudio y a la Administración de la instalación de pruebas se indican a continuación (reporte de auditoría No. 0644F14):

Auditoría de Calidad
2 y 3 de junio de 2014

Director del Estudio
04 de junio de 2014

Gestión de instalaciones de prueba
04 de junio de 2014

Los datos iniciales y el informe se auditaron por parte de Control de Calidad.

Este informe es una descripción precisa de los procedimientos seguidos y registra con precisión los datos de laboratorio originales sin procesar generados en este estudio.

La fecha de esta auditoría y las fechas de transmisión del informe al Director del Estudio y a la Administración de la instalación de pruebas se indican a continuación:

Auditoría de Calidad
26 de junio de 2014

Director del Estudio
26 de junio de 2014

Gestión de instalaciones de prueba
26 de junio de 2014

Lyon,

Firma 27/06/2014
Etienne DALACHE
Gerente Ejecutivo de Calidad

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



ENMIENDA(S) Y CUMPLIMIENTO DEL(LOS) PLAN(ES) DE ESTUDIO

No se emitió ninguna enmienda al protocolo durante el curso de este estudio.

No se observó ninguna incidencia que pudiera haber afectado la calidad o la interpretación de los resultados obtenidos.

ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN DEL ELEMENTO DE PRUEBA, DE LOS PRODUCTOS DE CONTROL Y DEL SISTEMA DE PRUEBA

El elemento de prueba se mantuvo a temperatura ambiente lejos de la luz, de acuerdo con las recomendaciones del Patrocinador.

Una muestra del elemento de prueba se mantendrá bajo llave en nuestras instalaciones durante aproximadamente cuatro meses a partir de la fecha de envío del informe final.

A partir de esta fecha, y sin indicación contraria del Patrocinador, el elemento de prueba será destruido por la compañía LABO-SERVICES, route de la Centrale, BP 98, 69702 Givors Cedex - Francia.

Los reactivos que entran en la composición de los controles negativo y positivo se almacenan en un armario habilitado para tal fin y serán destruidos por la compañía antes mencionada.

Cabe señalar que todas las córneas (no seleccionadas, utilizadas o no durante el experimento) se congelan a -20°C antes de ser destruidas por SITA CENTER EST, Gerland Plaza Batiment A - No. 19 rue Pierre Gilles de Gennes - 69007 Lyon - Francia.

REGISTRO Y ARCHIVO DE DATOS

Todos los datos escritos a mano se transcribieron inmediatamente en Formularios de informe de casos (CRF) constituidos, paginados y remitidos antes del inicio del experimento.

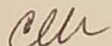
Una vez firmado el informe final, el Director del Estudio transmitirá, para su archivo, los documentos originales, incluidos los Planes de Estudios Generales y Específicos, el informe final (y enmiendas si las hubiera) y todos los datos sin procesar, que se conservarán durante 5 años en las siguientes direcciones:

Para los 2 a 6 meses siguientes al envío del informe:

IEC, 88, boulevard des Beiges, 69006 Lyon - Francia

Durante los siguientes años: en las instalaciones de la compañía EVERIAL

Casa matriz: 27, rue de la Villette, 69003 Lyon - Francia.


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Una vez finalizado este período, se contactará al Patrocinador con respecto a sus archivos. Ningún documento de archivo será destruido sin un acuerdo escrito y firmado por parte del Patrocinador.

LINEAMIENTOS

(Texto en Francés)

ISO 9001:2008, Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos: X 50-131.

Muir, CK, 1984 - Un método simple para evaluar la opacidad corneal bovina inducida por surfactantes in vitro: hallazgos preliminares. Cartas de toxicología, 22: 199-203.

OCDE (2009). Lineamiento 437. Lineamiento de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas. Método de prueba de permeabilidad y opacidad corneal bovina para identificar corrosivos oculares e irritantes severos.

Principios de la OCDE sobre buenas prácticas de laboratorio (BPL por su sigla en Español) (revisados en 1997), ENV/MC/CHEM (98) 17.

La aplicación de los principios de BPL a estudios a corto y plazo (sic), ENV/JM/MONO (99)23.

La aplicación de los principios de BPL a estudios in vitro, ENV / JM / MONO (2004) 26.


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Draize, JH, Woodward, G., Calvery, HO, 1944 - Métodos para el estudio de la irritación y toxicidad de sustancias aplicadas tópicamente a la piel y membranas mucosas. Revista de farmacología, 82: 377-390.

Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J., 1992 - Prueba de permeabilidad y opacidad corneal bovina - un ensayo in vitro de irritación ocular. Fundam. Apl. Toxicol., 18: 442-449.

Gautheron, P., Giroux, J., Cottin, M., Audegond, L., Morilla, A., Mayordomoblanco, L., Tortajada, A., Haynes, G., Vericat, J., Piravano, R., Gillio Tos, E., Hagemann, C., Vanparys, P., Deknudt, G., Jaidos, G., Prinsen, M., Kalweit, S. y Spielmann, H., 1994 - Evaluación interlaboratorio del ensayo de permeabilidad y opacidad corneal bovina (BCOP). Toxicología in vitro, 8: 381-392.

ICCVAM (2007). Protocolo de método de prueba BCOP recomendado por ICCVAM. En: Informe de evaluación del método de prueba ICCVAM: métodos de prueba de toxicidad ocular in vitro para identificar irritantes y corrosivos oculares graves. Comité Coordinador Interagencial de Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM) y Centro Interagencial de Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos (NTP) del Programa Nacional de Toxicología (ICEATM). No de publicación de NIH: 07-4517.

ICCVAM. (2006). Estado actual de los métodos de prueba in vitro para identificar corrosivos oculares e irritantes graves: Método de prueba de permeabilidad y opacidad corneal bovina No de publicación de NIH: 06-4512. Research Triangle Park: Programa Nacional de Toxicología.

Muir, CK, 1984 - Un método simple para evaluar la opacidad corneal bovina inducida por surfactantes in vitro: hallazgos preliminares. Cartas de toxicología, 22: 199-203.

Muir, CK, 1985 - Opacidad de la córnea bovina in vitro inducida por tensioactivos y productos químicos industriales en comparación con la irritación ocular in vivo. Cartas de toxicología, 24: 157-162.

Rougier, A., Cottin, M., De Silva, O., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Dossou, KG Investigación para una nueva estrategia hacia la evaluación de la seguridad ocular, Actas, 17avo Congreso Internacional de la IFSCC, Yokohama, 1992.

Vanparys, P., Deknudt, G., Sysmans, M., Teuns, G., Coussement, W., Van Cauteren, H., 1993 - Evaluación del ensayo de permeabilidad de la opacidad corneal bovina como alternativa in vitro al ojo de Draize - Prueba de irritación. Toxicología in vitro, 7: 471-476.

Vanparys, P. et coll., 1993 - Evaluación in vitro de 50 compuestos farmacéuticos y disponibles comercialmente mediante el ensayo BCOP - Toxicología in vitro, 7 (4): 471-476.


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

APÉNDICE 1 :

RESULTADOS

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



TÉCNICOS EXPERIMENTALES: Laetitia DARNAND

Caroline SING NGUYEN VAN BACH

ENSAYO EN CÓRNEA BOVINA AISLADA - CÁLCULO DE PUNTUACIÓN								
PUNTO DE CONTACTO EN EL TIEMPO:		OPACITÓMETRO ELÉCTRICO CERO = 0						
10 minutos		OPACIDAD antes del tratamiento (OPTO)					PERMEABILIDAD	
Fecha de recepción del ojo	03/06/14			CONTROL	MEDIDA		LONGITUD DE ONDA: 490 nm	
Fecha: 03/06/14		CALIBRADOR 1:		-77	73		OD:	1.430
Uso de la córnea al recibirla		CALIBRADOR 2:		-155	153		(solución de 8 µg/mL.	
		CALIBRADOR 3:		-235	230			
ESTUDIO No.	140905	OPACIDAD 2 HORAS después del lavado (OPT2)						
		CALIBRADOR 1:		-72	73			
Soporte vacío No.	96	CALIBRADOR 2:		-146	150			
		CALIBRADOR 3:		-230	232			
Soporte	TRATAMIENTO	OPTO	OPTO2	OPT2- OPTO	Opacidad corregida	DO	O.D. corregido	PUNTUACIÓN OPc + 15DOc
7	Control negativo	5	0	-5		0,011		
17		5	0	-5		0,009		
1		5	0	-5		0,020		
Comentarios:			MEDIA:		-5,0	0,013		
			DESVIACIÓN ESTÁNDAR		0,0	0,006		
97	NaOH 10%	5	1980	193	198,0	6.652	6.639	297,6
107		2	198	186	191,0	6.284	6.271	285,1
12		7	198	189	194,0	6.744	6.731	295,0
Comentarios:			MEDIA:		194,3		6.547	292,5
Desprendimiento del epitelio y edema.			DESVIACIÓN ESTÁNDAR		3,5		0,243	6,6
42	MEZCLA M. DUBIA, T. LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS I.E.C.: 140905 01154001 TAL COMO SE SUMINISTRA	7	1	-6	-1.0	0,026	0,013	-0,8
85		4	1	-3	2,0	0,023	0,010	2,1
61		4	0	-4	1,0	0,021	0,008	1,1
Comentarios			MEDIA:		0.7		0.010	0,8
x			DESVIACIÓN ESTÁNDAR		1.5		0,003	1.5

Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

APÉNDICE 2 :

DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE BUENAS PRÁCTICAS DE
LABORATORIO

(PRUEBAS DE SEGURIDAD)

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

INSTITUTO EXPERTO CRIMINAL - IEC
18 BOULEVARD DES BELLES
92000 NANTERRE

Fecha de expedición: 16 de agosto de 2006

Fecha de conformidad: 16 de agosto de 2006

Tipo de documento de prueba:

Área de competencia:

Obligaciones del aplicador:

Fecha de la declaración:
16 de agosto de 2006

Firma del aplicador:
(Firmado)

Las declaraciones de prueba incluidas en el presente cumplimiento de Anexo se inspeccionan cada dos años:

A. de conformidad con el IEC

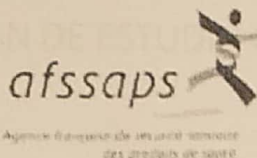
B. de conformidad con el IEC y la ley de los estados evaluados en el laboratorio

C. de conformidad con el IEC

18, Boulevard des Belles, 92000 Nanterre - Francia - 92 500 5000 - 92 500 5000 - 92 500 5000



CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

(Texte en Français)

**EVALUACIÓN DE LA CONFORMITE AUX
BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE**
selon la directive 2004/9/CE (ESSAIS DE SECURITE)
DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO
según la Directiva 2004/9 / CE (PRUEBAS DE SEGURIDAD)

Nombre y ubicación de la instalación de prueba

INSTITUT D'EXPERTISE CLINIQUE – IEC
88 BOULEVARD DES BELGES
69006 LYON

Propósito de la inspección

Inspección de instalaciones de Auditoría del estudio
prueba

Fecha (s) de inspección*: 22-23 de noviembre de 2011

Grado de conformidad aux BPL. **
Estado

A

Tipos de elementos de prueba

Áreas de experiencia:

Observaciones (si aplica)

fecha de la declaración 13 DE MARZO DE 2012	Pierre-Henri BERTOYE (Firmado)
--	-----------------------------------

Las instalaciones de prueba incluidas en el programa de seguimiento de Afssaps se inspeccionan cada dos años.

A: de conformidad con GLP (BPL)

B: desviaciones menores que no afectan la validez de los estudios realizados en el laboratorio;

C: no conforme con GLP (BPL).

143/147. bd Anatole France - F93285 Saint-Denis cedex tél +33 (0)1 55873000 www.afssaps.fr

CM
Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

• APÉNDICE 3:

PLAN DE ESTUDIO ESPECÍFICO Y ENMIENDA, SI LO HAY


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006



PLAN DE ESTUDIO ESPECÍFICO IN VITRO

PLAN DE ESTUDIO ESPECÍFICO : No. 140905SSP de 3 de junio de 2014

PATROCINADOR : LABORATORIOS M y N COMPAÑIA LTDA

REPRESENTANTE DEL PATROCINADOR : Sra. C. GAMA

ESTUDIO IN VITRO : IRRITACIÓN PRIMARIA OCULAR (BCOP) según
Protocolo de la OCDE No. 437 (tiempo de contacto: 10 minutos)

PLAN DE ESTUDIO GENERAL : No. 20140032 de 27 de mayo de 2014

ELEMENTO DE PRUEBA : M. DUBIA, T. LEPIDOTA Y P. BOGOTENSIS
SOLUCIÓN EN MEZCLA AL 10% (lote No. NB00406-2014 de 29/04/2014)

CÓDIGO I.E.C. NÚMERO : 140905 01154001

TIPO DE PRODUCTO : Líquido no tensioactivo

ASPECTO : Líquido de color amarillo muy claro

CONCENTRACIÓN : Tal como se suministra

CRONOGRAMA ESTIMADO DEL ESTUDIO

- Fecha de inicio y culminación del experimento; martes 3 de junio de 2014
- Envío de los resultados preliminares por correo electrónico: semana del 9 de junio de 2014
- Envío del informe final: semana del 23 de junio de 2014

Lyon

Firma

Stephanie MAILLET

Director del Estudio

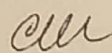
CC : Gestión de Instalaciones de Prueba. Aseguramiento de Calidad. Experimentadores

Este Plan de Estudios Específico debe ser aprobado por el Representante del Patrocinador por correo electrónico.

El correo electrónico de acuerdo se conserva con el presente documento.

Documento de 1 página

SSP -BCOP-OCDE-02-12-10


Claudia M. Marín
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español / Español - Inglés
Certificado No. 0217 de agosto 16 de 2006

Notaria

30
TREINTA

Notaria Treinta de Bogotá

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO

Ante la Notaria Treinta del Circulo de Bogotá D.C.
Compareció:

MARIN HERNANDEZ CLAUDIA MARITZA

quien exhibió: C.C. 52339204

y declaró que la firma que aparece en el presente documento es la suya y que el contenido del mismo es cierto.



Verifique estos datos en:
www.notariaenlinea.com

CZY68GW37ERSVKZH

hecg

CESAR AUGUSTO ROJAS

(E) BOGOTA D.C.

ellu

FIRMA

sz22dzqw2qazzqzq

Bogotá D.C. 30/02/2020 E.C.

a las 9:02:01 a.m.

NOTARIO 30

REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA TREINTA
BOGOTA D.C.
NOTARIO (E)
CESAR AUGUSTO ROJAS



Cota- Cundinamarca Enero 12 del 2021

CERTIFICA QUE:

LA APROBACION PARA OBTENCION DE NSCO Y/O DE DISPONIBILIDAD PARA LA COMERCIALIZACION DEL PRODUCTO TERMINADO POR:

1. DESARROLLO CON PRUEBAS ORGANOLEPTICAS, DE TESTEO Y DE ESTABILIDAD ACELERADA DE ACUERDO CON PROCEDIMIENTO INTERNO PROC-DES-002.
2. EFICACIA BASADO EN LAS PRUEBAS DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS DE LOS ACTIVOS ACORDE A DECISIÓN 516 DEL INVIMA O ESTUDIOS IN-VIVO O IN-VITRO REALIZADOS POR INSTITUTOS ACREDITADOS SOBRE LA FORMULACION FINAL.
3. PRUEBAS DE SEGURIDAD REALIZADA IN-VIVO POR LOS MEDICOS EN TESTEO O ESTUDIOS IN-VIVO O IN-VITRO DE ACUERDO A PROCEDIMIENTOS INTERNACIONALES EN INSTITUTOS ACREDITADOS.

PRODUCTO DE LA EMPRESA ÉPIDERMIQUE S.A. IDENTIFICADA CON NIT, 900.275.763 – 6.

- **EPICAPIL CHAMPÚ ANTICAIDA TUBO COLAPSIBLE x 250 mL**

FIRMA RESPONSABLE:

MARTHA JANNETH NEIRA
DIRECTORA TÉCNICA
QUÍMICA FARMACEÚTICA
T.P. 04009471812870841

Anexo # 1.

Publicidad Año 2.020.

Página WEB

<https://www.epidermique.com/categoria/cuidado-capilar-y-tratamiento/>

¡TE ESPERAN PROMOCIONES QUE TE SORPRENDERÁN!



[INICIO](#)

[TIENDA ONLINE](#)

[PRODUCTO](#)

ÉPIDERMIQUE

[CLUB ÉPIDERMIQUE](#)

[BLOG](#)

[CONTACTO](#)



CAPILAR



[Epicapil](#)

[Todos](#)



INICIO

TIENDA ONLINE

PRODUCTO

ÉPIDERMIQUE

CLUB ÉPIDERMIQUE

BLOG

CONTACTO



CUIDADO CAPILAR Y TRATAMIENTO

MOSTRANDO TODOS LOS RESULTADOS 4

ORDENAR POR LOS ÚLTIMOS ▾

BUSCAR PRODUCTO

Buscar



FILTRAR PRECIO

\$0 ————— \$130500

CATEGORÍAS

ANTIEDAD CORPORAL

ANTIEDAD FACIAL



EPICAPIL CHAMPÚ
ANTICAÍDA SIN SAL –
SIN SULFATOS



EPICAPIL CHAMPÚ
SEBORREGULADOR
CAPILAR SIN SAL – SIN
SULFATOS



EPICAPIL LOCIÓN
ANTICAÍDA CAPILAR



EPICAPIL
TRATAMIENTO
CAPILAR ANTIEDAD
INTENSIVO SIN SAL –
SIN SULFATOS

PRODUCTOS



EPICAPIL CHAMPÚ ANTICAÍDA SIN SAL – SIN SULFATOS

Composición: Extracto de algas rico en citrull – arginina + taurina, Methiopeptide®, Phytoney CTG®, Hidrovance™, nicotinamida, ginkgo biloba, extracto de guayaba, complejo de extractos vegetales, biotina y pantenol.
Modo de empleo: Humedecer el cuero cabelludo y aplicar una porción generosa del champú, masajeando en forma circular por 2 ó 3 minutos, luego enjuagar con abundante agua. Ideal complementar con Epicapil Loción Anticaída para mejores resultados.

Cómpralo con nuestros aliados



SKU: 013

CATEGORÍAS: CAPILAR, CUIDADO CAPILAR Y TRATAMIENTO, EPICAPIL, EPICAPIL CAPILAR

ETIQUETA: EPICAPIL



EPICAPIL CHAMPÚ ANTICAÍDA SIN SAL – SIN SULFATOS

Composición: Extracto de algas rico en citrull – arginina + taurina, Methiopeptide®, Phytoney CTG®, Hidrovance™, nicotinamida, ginkgo biloba, extracto de guayaba, complejo de extractos vegetales, biotina y pantenol.

Modo de empleo: Humedecer el cuero cabelludo y aplicar una porción generosa del champú, masajeando en forma circular por 2 ó 3 minutos, luego enjuagar con abundante agua. Ideal complementar con Epicapil Loción Anticaída para mejores resultados.

Descripción

Información adicional

Previene y funciona como coadyuvante en los tratamientos anticaída del cabello gracias a los aminoácidos del extracto de algas chondrus crispus y del péptido del Methiopeptide™ que han demostrado en sus estudios in-vitro y ex-vivo la habilidad de proteger el folículo piloso del estrés oxidativo, estimulando el crecimiento del cabello y mejorando la homeóstasis del cabello, sinergizando su acción con la biotina, nicotinamida y del pantenol como factores vitamínicos nutrientes y del Phytoney CTG®, mezcla de exóticos extractos que actúa sobre la epidermis como renovador celular, humectante y antioxidante natural. Epicapil champú está formulado en una base de emulsificantes suaves, sin sulfatos y sin sal para dar brillo y acondicionamiento

ÉPIDERMIQUE

CONTACTO

Dirección: Calle 135 #52A-35

E-mail: info@epidermique.com

Telf: (57) (1) 746 27 30

Inspirados en la Innovación científica puesta
al servicio de nuestro grupo de especialistas
y al beneficio de la salud de la piel.
¡Épidermique una marca orgullosamente
colombiana!

[Política de protección de datos](#)
[Política de SGS Y SGSST](#)

SUSCRIBIRSE

Correo Electrónico

ENVIAR



REDES SOCIALES:

FACEBOOK:



TWITER:



Explorar

⚙ Configuración



Épidermique SA

19 Tweets

ÉPIDERMIQUE



Seguir

Épidermique SA

@Epidermique_Lab

Nuestro laboratorio dermatológico está inspirado en la innovación científica al servicio de los dermatólogos y al beneficio de la salud de la piel del paciente.

📍 Bogotá, Colombia 🌐 epidermique.com

📅 Se unió en septiembre de 2017

234 Siguiendo 24 Seguidores

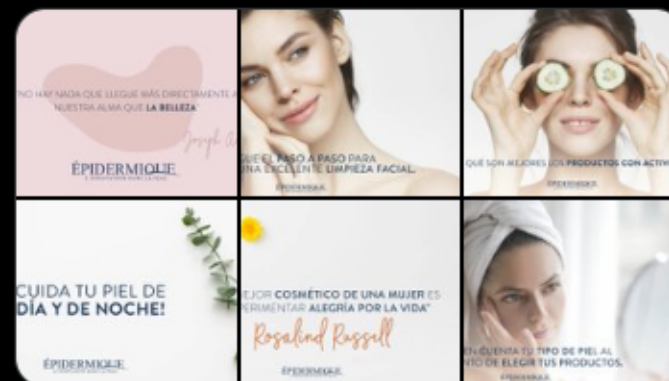


Buscar en Twitter

¿Eres nuevo en Twitter?

Regístrate ahora para obtener tu propia cronología personalizada.

Regístrate



Tal vez te guste

INSTAGRAM:



epidermique_...



182 **6.5...** **1.2...**
Publi... Segu... Segu...

Épidermique
Salud/belleza
Inspirados en la Innovación científica puesta al servicio de nuestro grupo de especialistas y al beneficio de la salud de la piel.
Ver traducción
www.epidermique.com/
Bogotá, Colombia

Seguir

Men...

Cont...



Cortes

Productos

Preguntas

Clientes



epidermique_lab



DESCUBRE LA LÍNEA
epicapil
UNO DE ELLOS TE OFRECE
PREVENCIÓN EN TRATAMIENTO
ANTICAÍDA, CON EFECTO
ACONDICIONADOR.

ÉPIDERMIQUE
L'INNOVATION DANS LA PEAU



91 Me gusta



91 Me gusta
epidermique_lab Nuestra línea Epicapil es especializada en tratamientos para el cuidado y mantenimiento de tu cuero cabelludo.

Con los diferentes productos podrás revitalizar y fortalecer tu cabello desde la raíz, previniendo la caída y estimulando el crecimiento.

En @epidermique_lab nos preocupamos por tu piel, por eso contamos con diferentes líneas de productos que se especializan en su cuidado y protección teniendo en cuenta las necesidades de cada tipo de piel.

Encuentra el producto ideal para ti en www.epidermique.com

•
•
•

#Epidermique #Cabello #Epicapil
#dermatología #yomequedoencasa
#cuidadocapilar #capilar
#dermatologosbogota #colombia #lovers

Ver los 5 comentarios
15 de agosto de 2020 • Ver traducción



LINKEDIN:



Empleos ▼

Epidermique

Todo el mundo



Unirse ahora

Iniciar sesión

ÉPIDERMIQUE



Epidermique

Cosmética

Inspirados en Innovación científica puesta al servicio del dermatólogo y al beneficio de la salud de la piel...



Ver los
20 empleados



Páginas similares



PHARMASKIN S.A.S

Cosmética



DERMATODO

Industria farmacéutica

BOGOTA, BOGOTA



SkinPharma, S.A.

Cosmética

Guatemala City, Guatemala



epidermique sa

-

Mostrar más páginas similares

Publicidad Año 2.019.



Champú anticaída sin sal – sin sulfatos

Indicación: Previene y funciona como coadyuvante en los tratamientos anticaída del cabello gracias a los aminoácidos del extracto de algas chondrus crispus y del péptido del Methiopeptide™ que han demostrado en sus estudios in-vitro y ex-vivo la habilidad de proteger el folículo piloso del estrés oxidativo, estimulando el crecimiento del cabello y mejorando la homeóstasis del cabello, sinergizando su acción con la biotina, nicotinamida y del pantenol como factores vitamínicos nutrientes y del Phytoney CTG®, mezcla de exóticos extractos que actúa sobre la epidermis como renovador celular, humectante y antioxidante natural. Epicapil champú está formulado en una base de emulsificantes suaves, sin sulfatos y sin sal para dar brillo y acondicionamiento

Composición: Extracto de algas rico en citrull – arginina + taurina, Methiopeptide®, Phytoney CTG®, Hidrovance™, nicotinamida, ginkgo biloba, extracto de guayaba, complejo de extractos vegetales, biotina y pantenol.

Modo de empleo: Humedecer el cuero cabelludo y aplicar una porción generosa del champú, masajeando en forma circular por 2 ó 3 minutos, luego enjuagar con abundante agua. Ideal complementar con Epicapil Loción Anticaída para mejores resultados.

do Capilar
amiento

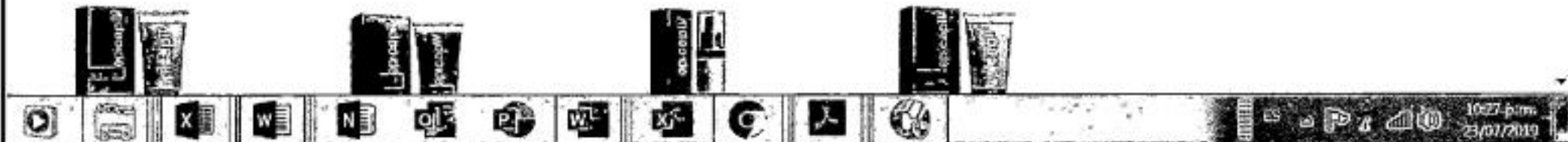
epicapil
SOIN DES CHEVEUX



Champú anticaída sin sal – sin sulfatos

Indicación: Prevención y coadyuvante en tratamientos anticaída. Efecto acondicionador. Prolongación de la fase anágena, rejuvenecimiento del folículo piloso, mayor masa capilar, aumento de la...

VER MÁS



Champú anticaída sin sal – sin sulfatos

Indicación: Prevención y coadyuvante en tratamientos anticaída. Efecto acondicionador. Prolongación de la fase anágena, rejuvenecimiento del folículo piloso, mayor masa capilar, aumento de la circulación sanguínea, aporte de nutrientes y antioxidantes. Efecto antiinflamatorio por control del TNF- α y control de las microinflamaciones secuenciales.

Composición: Extracto de algas rico en citrull + arginina + taurina, Methiopeptide®, Phytoney CTG®, Hidrovance™, nicotinamida, ginkgo biloba, extracto de guayaba, complejo de extractos vegetales, biotina y pantenol.

Modo de empleo: Humedecer el cuero cabelludo y aplicar una porción generosa del champú, masajeando en forma circular por 2 ó 3 minutos; luego enjuagar con abundante agua. Durante el primer mes de tratamiento se sugiere lavar el cabello todos los días con Epicapil Champú Anticaída y los siguientes 2 a 3 meses tres veces por semana. Ideal complementar con Epicapil Loción Anticaída para mejores resultados.

Anexo # 2

Tiendas Dermatológicas.

TIENDAS DERMATOLOGICAS.

Cómpralo con nuestros aliados



JUZGADO ONCE CIVIL DEL CIRCUITO

Bogotá, D.C., trece (13) de julio de dos mil veintiuno (2021)

REF.: 11001310301120190042600

Teniendo en cuenta que la parte accionada dio cumplimiento a lo ordenado en auto de 16 de junio pasado, sería del caso correr traslado para que las partes aleguen de conclusión, sin embargo, previo a cerrar la etapa probatoria, se hace necesario requerir a la Superintendencia de Industria y Comercio para que informe el estado de la averiguación preliminar adelantada contra de la sociedad Epidermique S.A., con radicación 21-41572—0 trámite 87.

Por Secretaría remítanse las comunicaciones de rigor a través del correo electrónico **c.cccamacho@sic.gov.co** y **contactenos@sic.gov.co**

Allegada lo anterior, ingrésese el expediente nuevamente al Despacho para continuar con el trámite que corresponda.

NOTIFÍQUESE y CÚMPLASE,



MARÍA EUGENIA SANTA GARCÍA

Jueza

JUZGADO ONCE CIVIL DEL CIRCUITO
Bogotá, D. C.

NOTIFICACIÓN POR ESTADO: La providencia anterior es notificada por anotación en **ESTADO N° 099** hoy **14 de julio de 2021**.

LUÍS ORLANDO BUSTOS DOMÍNGUEZ
Secretario

JASS 11-2019-426

uzgado 11 Civil Circuito - Bogota - Bogota D.C.

Acuso recibido, Att. Doris L. Mora Escribiente Juzgado Once (11) Civil del Circuito d...

Mar 18/05/2021 2:46 PM

- ☐ El remitente del mensaje ha solicitado confirmación de lectura. Para enviar una confirmación, haga clic aquí.

F Francelly Yulian
a Valencia Maldonado <francelly.valencia@rutaalmar.com>

Mar 18/05/2021

2:40 PM

Para: Juzgado 11 Civil Circuito - Bogota - Bogota

MEMORIAL REMITIENDO C...

141 KB



Bogotá, 09 de abril de 2021.

Señores

Juzgado 11 civil del circuito de Bogota**Referencia:** Expropiación**Referencia:** Proceso Declarativo Especial – Expropiación.**Radicación No :** 11001310301120210009400**Demandante:** AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA – ANI.**Demandado:** EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA.**Asunto: Memorial Informando pago de depósito judicial para entrega anticipada****FRANCELLY VALENCIA MALDONADO**

Profesional Predial Jurídico

Concesión Ruta al Mar S.A.

francelly.valencia@rutaalmar.com

Teléfono: (4) 7921920 – 323 527 17 27

Centro logístico industrial San Jerónimo Bodega 8

Calle B Montería-Córdoba

Horario de atención Lunes a Viernes 7:00 am – 12:00

y 1:00 a 5:30 pm

www.rutaalmar.comwww.elcondor.com

Bogotá, 09 de abril de 2021.

Señores

Juzgado 11 civil del circuito de Bogota

Referencia: Expropiación

Referencia: Proceso Declarativo Especial – Expropiación.

Radicación No : 11001310301120210009400

Demandante: AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA – ANI.

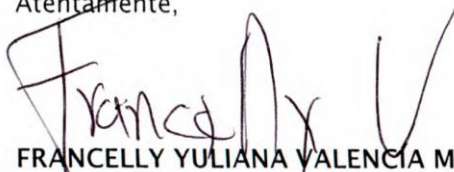
Demandado: EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA.

Asunto: Memorial Informando pago de deposito judicial para entrega anticipada

FRANCELLY YULIANA VALENCIA MALDONADO, abogada titulada, portadora de la tarjeta profesional No. 254.066 del C.S.J, y cédula de ciudadanía No.1.039.457.288 de Sabaneta (Ant), en mi calidad de Apoderada Judicial de la AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA –ANI, comedidamente me permito informar a su despacho que ya fue realizada la consignación a órdenes del juzgado del 100% del avalúo comercial en la cuenta bancaria designada, a fin de que se decrete la entrega anticipada del bien en los términos del Artículo 28 de la ley 1742 de 2014, toda vez que el proceso de adquisición predial actualmente se adelanta sobre una franja de terreno de propiedad del demandado en virtud del contrato de Concesión bajo esquema de APP N° 016 del 14 de octubre de 2015 “Construcción, Mejoramiento, Operación y Mantenimiento y Reversión del sistema vial para la conexión de los Departamentos Antioquia – Bolívar”, proyecto denominado CONEXIÓN ANTIOQUIA - BOLÍVAR, el cual fue declarado de utilidad pública mediante la Resolución No. 1826 del 28 de octubre de 2015 modificada por la resolución 1139 de 2018.

Para corroborar lo afirmado me permito allegar copia del comprobante de pago

Atentamente,



FRANCELLY YULIANA VALENCIA MALDONADO

T.P.No. 254.066 del C.S. de la Judicatura.

C.C. No. 1.039.457.288 de Sabaneta (Ant).

Fiduciaria

Bancolombia



Notificación de Aplicación de Pagos

INFORMACIÓN DEL ORDENANTE

NUMERO DE ORDEN	3866	FECHA DE PAGO	14/05/2021
FECHA ACTUAL	14/05/2021	ENTIDAD DE ORIGEN	BANCOLOMBIA
NOMBRE DEL CLIENTE	P.A. CONCESION RUTA AL MAR	MONEDA	COP
IDENTIFICACIÓN	10134	VALOR TOTAL	\$ 32,492,526
CUENTA A DEBITAR	24580301874		
TIPO DE CUENTA	AHORROS		

INFORMACIÓN DE BENEFICIARIO(S)

Identificación beneficiario	Tipo ID	Nombre del beneficiario	Numero de Cuenta	Tipo de cuenta	Entidad destino	Valor total	Estado pago
800037800	NIT	BANCO AGRARIO			Pse	\$32,484,526	Transacción Abonada Otros Bancos**
800037800	NIT	BANCO AGRARIO			Pse	\$8,000	Transacción Abonada Otros Bancos**

Transacción Exitosa** Pago realizado a la cuenta del beneficiario.
Transacción Abonada Otros Bancos** Transacción pendiente por aplicar en entidad receptora
Disponible en Sucursal Bancolombia** Cheque disponible para el beneficiario en sucursal
Transacción Rechazada ** Transacción rechazada por la entidad receptora
Recuerde que los pagos ACH son sujetos por verificación en la entidad receptora.

- Favoritos
- Elementos eliminados
- Elementos enviados
- Agregar favorito
- Carpetas
- Bandeja de entrada2
- Borradores2
- Elementos enviados
- Pospuesto
- Elementos eliminados
- Correo no deseado5
- Archivo
- Notas
- Circulares
- Elementos infectados
- Historial de conversaci...
- Infected Items
- Suscripciones de RSS
- Carpeta nueva
- Archivo local:Juzgado ...
- Grupos

Memorial Informando fijación de edicto 11001310301120210009400

1

Juzgado 11 Civil Circuito - Bogota - Bogota D.C.

Mar 22/06/2021 5:02 PM

Para: Francelly Yuliana Valencia Maldonado

Acuso recibido

Atentamente:
Rubén Dario Vallejo Hernández
Asistente Judicial

...

Responder

Reenviar

El remitente del mensaje ha solicitado confirmación de lectura. Para enviar una confirmación, [haga clic aquí](#).

F

Francelly Yuliana Valencia Maldonado <francelly.valencia@rutaalmar.com>

Mar 22/06/2021 4:45 PM

Para: Juzgado 11 Civil Circuito - Bogota - Bogota D.C.

MEMORIAL REMITIENDO...

2 MB

22 de junio de 2021

Señores
Juzgado 11 civil del circuito de Bogotá

Referencia: Proceso Declarativo Especial – Expropiación

Radicación No : 11001310301120210009400

Demandante: AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA – ANI.

Demandado: EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA.

Asunto: Memorial Informando fijación de edicto

FRANCELLY VALENCIA MALDONADO

Profesional Predial Jurídico

Concesión Ruta al Mar S.A.

francelly.valencia@rutaalmar.com

Teléfono: (4) 7921920 – 323 527 17 27

Centro logístico industrial San Jeronimo Bodega 8 Calle B

Montería-Córdoba

Horario de atención Lunes a Viernes 7:00 am – 12:00 y 1:00 a 5:30 pm

www.rutaalmar.com

www.elcondor.com

Construcciones EL CONDOR S.A.

Ingeniería de Infraestructura e Inversiones

CONCESIÓN Ruta al Mar

La información contenida en este mensaje y sus anexos están dirigidos exclusivamente a sus destinatarios y puede contener información privilegiada o confidencial. Si usted no es el destinatario real, o ha recibido por error esta comunicación, bórrela o destrúyala. Está prohibida su retención, grabación, utilización o divulgación con cualquier propósito puesto que su uso no autorizado acarreará las sanciones y medidas legales a que haya lugar. CONSTRUCCIONES EL CÓNDOR S.A. no se hace responsable por la presencia en este mensaje o en sus anexos, de algún virus que pueda generar o genere daños en sus equipos, programas o afecte su información.

"La información contenida en este mensaje es propiedad de Construcciones El Condor S.A. y puede contener información expresamente protegida por ley. Si recibió el presente mensaje es porque sus datos se encuentran en las bases de datos de Construcciones El Condor, recolectados dentro de alguna de las actividades principales. Sus datos personales son tratados y protegidos de acuerdo a nuestras Políticas de Tratamiento Datos Personales que puede consultar en nuestra pagina web www.elcondor.com. Si usted no es el destinatario o no desea seguir recibiendo información de Construcciones El Condor, puede ejercer sus derechos frente al tratamiento de datos, tal como se señala en nuestra política de tratamiento de datos."

22 de junio de 2021

Señores

Juzgado 11 civil del circuito de Bogotá

Referencia: Proceso Declarativo Especial – Expropiación
--

Radicación No : 11001310301120210009400

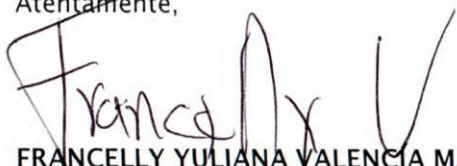
Demandante: AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA – ANI.

Demandado: EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA.

Asunto: Memorial Informando fijación de edicto

FRANCELLY YULIANA VALENCIA MALDONADO, abogada titulada, portadora de la tarjeta profesional No. 254.066 del C.S.J, y cédula de ciudadanía No.1.039.457.288 de Sabaneta (Ant), en mi calidad de Apoderada Judicial de la AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA –ANI, comedidamente me permito aportar a su despacho constancia de la fijación de emplazamiento en lugar visible del bien objeto de expropiación, en atención a lo establecido en el # 5 del artículo 399 del CGP, y a que no ha sido posible lograr que empresas de correo certificado autorizadas para efectos de notificación judicial se desplacen hasta el lugar de ubicación del inmueble, por ser un predio rural alejado de la cabecera municipal o centro poblado, tal como consta en respuestas que se adjuntan, por lo tanto esta suscrita precedió a llevar personalmente los edictos hasta el predio.

Atentamente,



FRANCELLY YULIANA VALENCIA MALDONADO

T.P. No. 254.066 del C.S. de la Judicatura.

C.C. No. 1.039.457.288 de Sabaneta (Ant).

EDICTO
JUZGADO 11 CIVIL DEL CIRCUITO DE BOGOTA POR MEDIO DEL PRESENTE

EMPLAZA A:
EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA, PERSONAS
QUE SE CREAN CON DERECHO A INTERVENIR
EN EL PRESENTE PROCESO, PARA QUE CONCURRAN AL MISMO
Y SE NOTIFIQUEN DEL AUTO ADMISORIO DE DEMANDA

NATURALEZA DEL PROCESO:
DECLARATIVO VERBAL ESPECIAL DE EXPROPIACION RAD 11001310301120210009400

DEMANDANTE:
AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA - ANI

APODERADO:
Dra. FRANCELLY YULIANA VALENCIA MALDONADO

DEMANDADOS:
EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA

Se previene a los emplazados en el sentido de que si no comparecen dentro de los quince (15) días siguientes a esta publicación, se les designará curador ad litem, con quien se surtirá la notificación, en la forma indicada en la notificación prevista en los artículos 108 Y 283 del CGP y el artículo 10 del decreto 806 de 2020, se fijara en lugar de acceso al inmueble objeto de expropiación en atención a lo establecido en el # 5 del artículo 399 del CGP.

EDICTO
JUZGADO 11 CIVIL DEL CIRCUITO DE BOGOTÁ POR MEDIO DEL PRESENTE

EMPLAZA A:
EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA, PERSONAS
QUE SE CREAN CON DERECHO A INTERVENIR
EN EL PRESENTE PROCESO PARA QUE CONCURRAN AL MISMO
Y SE NOTIFIQUEN DEL AUTO ADMISORIO DE DEMANDA.

NATURALEZA DEL PROCESO:
DECLARATIVO VERBAL ESPECIAL DE EXPROPIACIÓN RAD. 1100131030112021003900

DEMANDANTE:
AGENCIA NACIONAL DE INFRAESTRUCTURA - ANI

APODERADO:
Dra. FRANCELLY YULIANA VALENCIA MALDONADO

DEMANDADOS:
EUGENIO BERRIO BERRIO Y ANA ISABEL JULIO ESALA

Se previene a los emplazados en el sentido de que si no comparecen dentro de los cuatro (4) días hábiles siguientes a esta publicación, se les designará curador ad litem, con quien se surtirá la notificación en la forma indicada en la notificación prevista en los artículos 101 y 200 del CDP y el artículo 10 del decreto 806 de 2020, se fijará en lugar de acceso al emplazado el objeto de comparecer en atención a lo establecido en el artículo 292 del CDP.





Contacto

Código postal | www.4-72.com.co

Servicios Postales | Superintende

Registro PQR

←

→

↻

mintic.gov.co/portal/inicio/Atencion-y-Servicio-a-la-Ciudadania/Informes-de-PQRSD/125804:Registro-PQR

🔍

☆

R

⋮

GOV.CO



El futuro digital
es de todos

MinTIC

Inicio

Transparencia

Atención y Servicio a la Ciudadanía

Participa

Ministerio

Iniciativas

Normativa

Sala de prensa

Inicio

>

Atención y Servicio a la Ciudadani...

>

Informes de PQRSD

>

Registro PQR

Registro PQR

PQRSD

Radicar

Buscar

Encuesta de Satisfacción

Informes de Gestión

[Solicitud de información pública con identidad reservada aquí](#)

Registro Solicitud:

Su solicitud número **211048413** se ha registrado correctamente.
Para consultar el estado de su requerimiento debe incluir este número.

Puede consultar el estado de la solicitud en el siguiente enlace:
[Estado de la solicitud:](#)
Gracias por registrar su PQRSD





8:22 AM
21/Jun/2021



Francelly Yuliana Valencia Maldonado

De: Servicio al Cliente <servicioalcliente@4-72.com.co>
Enviado el: Tuesday, June 22, 2021 10:45 AM
Para: Francelly Yuliana Valencia Maldonado
Asunto: Re: peticion de información correo certificado en zonas rurales

Buen día,

Reciba un cordial saludo por parte de la oficina de Servicio al Cliente de Servicios Postales Nacionales S.A, empresa que opera bajo la marca de “El servicio de envíos de Colombia”.

En atención a su solicitud, me permito informar que 4-72 por ser la empresa oficial de correos de Colombia está obligada a llegar a todo el territorio nacional a través del Servicio Postal Universal (SPU), llegamos a 1.425 destinos nacionales cubriendo todos los departamentos, municipios, veredas y corregimientos.

En caso de las veredas y/o corregimientos, los envíos quedan disponibles bajo el servicio de “Lista de Correo”, esto es que el destinatario debe acercarse a uno de nuestros expendios o puntos de atención cercano para la correspondiente entrega de los envíos.

Cualquier inquietud con gusto será atendida.

¿Conoces tu Código Postal?

[Encuétralo aquí](#)

Johann Martinez

Asesor Servicio al Cliente

servicioalcliente@4-72.com.co

4722005 - 01 8000 111 210

Dig 25G N° 95A - 55. Bogotá, Colombia

Atención al público: Lunes a viernes de 8:00 am. A 5:00 pm. – sábados: 8:00 am a 12:00 m.

Entrega de envíos: Lunes a viernes de 8:00 am. A 4:30 pm. Sábados 8:00 am. A 11:30 am

Código Postal: 110911



Conoce más de nosotros en www.4-72.com.co

La información contenida en este E-mail es confidencial y solo puede ser utilizada por el individuo o la compañía a la cual está dirigido. Si no es el receptor autorizado, cualquier retención, difusión, distribución o copia de este mensaje es prohibida y será sancionada por la ley. Si por error recibe este mensaje, favor reenviarlo al remitente y borrar el mensaje recibido inmediatamente. Este mensaje y sus archivos adjuntos van dirigidos exclusivamente a su destinatario, pudiendo contener información confidencial. No está permitida su reproducción o distribución sin la autorización expresa de 4-72. Si usted no es el destinatario final por favor elimínelo e Infórmenos por esta vía. De acuerdo con la Ley Estatutaria 1581 de Protección de datos, el titular presta su consentimiento para que sus datos, facilitados voluntariamente, pasen a formar parte de una base de datos, cuyo responsable es 4-72, siendo tratados con la finalidad gestionar su solicitud y en base a la política de tratamiento que puede consultar en: www.4-72.com.co. Puede usted ejercer los derechos de consulta y reclamo sobre sus datos mediante escrito dirigido a 4-72 en la siguiente dirección: servicioalcliente@4-72.com.co

Servicios Postales Nacionales S.A., **4-72**, empresa oficial de correos de Colombia, orientada a ofrecer a todos los ciudadanos un servicio postal de calidad, competitivo y de alcance universal. 4-72 corresponde a la ubicación geográfica de Colombia en el mapa global: 4 grados latitud Norte, 72 grados latitud Oeste. Disponemos de un amplio portafolio de mensajería especializada, correo y Servicios Postales de Pago. También nos corresponde producir y poner en circulación las emisiones filatélicas en nombre de la nación y desarrollamos el Código Postal para Colombia, bajo el liderazgo del Ministerio TIC.

La información contenida en este E-mail es confidencial y solo puede ser utilizada por el individuo o la compañía a la cual está dirigido. Si no es el receptor autorizado, cualquier retención, difusión, distribución o copia de este mensaje es prohibida y será sancionada por la ley. Si por error recibe este mensaje, favor reenviarlo al remitente y borrar el mensaje recibido inmediatamente

Cuidemos el ambiente. No imprimas este correo si no es necesario.

Fecha: 21/6/2021 8:05:39

Asunto: petición de información correo certificado en zonas rurales

De: 'Francelly Yuliana Valencia Maldonado' <francelly.valencia@rutaalmar.com>

Para: Servicioalcliente@4-72.com.co

Buenos días

Por medio de la presente, me gustaría consultar si su empresa de mensajería presta el servicio de correo certificado para notificaciones judiciales en zonas rurales del país

De ser positiva su respuesta, me podrían informar si teniendo en cuenta la situación de orden publico y emergencia sanitaria actual se presentan retrasos para su gestión

Muchas gracias, quedo atenta

FRANCELLY VALENCIA MALDONADO

Profesional Predial Juridico

Concesión Ruta al Mar S.A.

francelly.valencia@rutaalmar.com

Teléfono: (4) 7921920 – 323 527 17 27

Centro logístico industrial San Jeronimo Bodega 8 Calle B
Monteria-Córdoba

Horario de atención Lunes a Viernes 7:00 am – 12:00 y
1:00 a 5:30 pm



www.rutaalmar.com

www.elcondor.com

La información contenida en este mensaje y sus anexos están dirigidos exclusivamente a sus destinatarios y puede contener información privilegiada o confidencial. Si usted no es el destinatario real, o ha recibido por error esta comunicación, bórrela o destrúyala. Está prohibida su retención, grabación, utilización o divulgación con cualquier propósito puesto que su uso no autorizado acarreará las sanciones y medidas legales a que haya lugar. CONSTRUCCIONES EL CÓNDOR S.A. no se hace responsable por la presencia en este mensaje o en sus anexos, de algún virus que pueda generar o genere daños en sus equipos, programas o afecte su información.

"La información contenida en este mensaje es propiedad de Construcciones El Condor S.A. y puede contener información expresamente protegida por ley. Si recibió el presente mensaje es porque sus datos se encuentran en las bases de datos de Construcciones El Condor, recolectados dentro de alguna de las actividades principales. Sus datos personales son tratados y protegidos de acuerdo a nuestras Políticas de Tratamiento Datos Personales que puede consultar en nuestra pagina web www.elcondor.com . Si usted no es el destinatario o no desea seguir recibiendo información de Construcciones El Condor, puede ejercer sus derechos frente al tratamiento de datos, tal como se señala en nuestra política de tratamiento de datos."

Este mensaje y sus archivos adjuntos van dirigidos exclusivamente a su destinatario, pudiendo contener información confidencial. No está permitida su reproducción o distribución sin la autorización expresa de 4-72. Si usted no es el destinatario final por favor elimínelo e Infórmenos por esta vía. De acuerdo con la Ley Estatutaria 1581 de Protección de datos, el titular presta su consentimiento para que sus datos, facilitados voluntariamente, pasen a formar parte de una base de datos, cuyo responsable es 4-72, siendo tratados con la finalidad gestionar su solicitud y en base a la política de tratamiento que puede consultar en: www.4-72.com.co. Puede usted ejercer los derechos de consulta y reclamo sobre sus datos mediante escrito dirigido a 4-72 en la siguiente dirección: servicioalcliente@4-72.com.co.

Este mensaje y sus archivos adjuntos van dirigidos exclusivamente a su destinatario, pudiendo contener información confidencial. No está permitida su reproducción o distribución sin la autorización expresa de 4-72. Si usted no es el destinatario final por favor elimínelo e Infórmenos por esta vía. De acuerdo con la Ley Estatutaria 1581 de Protección de datos, el titular presta su consentimiento para que sus datos, facilitados voluntariamente, pasen a formar parte de una base de datos, cuyo responsable es 4-72, siendo tratados con la finalidad gestionar su solicitud y en base a la política de tratamiento que puede consultar en: www.4-72.com.co. Puede usted ejercer los derechos de consulta y reclamo sobre sus datos mediante escrito dirigido a 4-72 en la siguiente dirección: servicioalcliente@4-72.com.co.

Francelly Yuliana Valencia Maldonado

De: Soluciones Digitales <solucionesdigitales@servientrega.com>
Enviado el: Monday, June 21, 2021 8:44 AM
Para: Francelly Yuliana Valencia Maldonado
Asunto: RE: peticion de información correo certificado en zonas rurales

Cordial saludo, contamos con la opción digital, con la que puedes enviar correo electrónico certificado y cuenta con la misma validez jurídica.

Por favor haz click en el enlace al final del texto donde encontrarás todo acerca del funcionamiento de nuestra solución E-entrega a través de un listado de 5 videos explicativos.

Cumplimos con la ley 527 de 1999, por lo que los correos que envíes desde nuestra plataforma cuentan con total validez legal para evidenciar la entrega del mensaje ante cualquier juez o super intendencia.

Tenemos paquetes desde 10 hasta 200 correos electrónicos certificados, en caso de que superes en el mes los 200 correos, puedes recargar la cantidad en el momento en que lo desees. Además estos cuentan con 20 MB de capacidad para archivos adjuntos y tienen vigencia de 2 meses en caso de que no alcances a utilizarlos todos en el mismo mes. Si requieres más de 600 correos al mes, háznoslo saber a través de este correo y con gusto un asesor se comunicará contigo para presentarte una oferta corporativa.

Cada correo cuenta con su propia trazabilidad y ID del mensaje que es el equivalente a una guía. Dentro de la misma plataforma puedes conocer la trazabilidad de cada envío, la cual incluye con su respectiva fecha y hora:

- Estampa de tiempo del envío de la notificación hora legal colombiana.
- Acuse de recibo: equivalente a entrega del mensaje en la bandeja de entrada del destinatario.
- Apertura de la notificación: apertura del correo
- Lectura del mensaje
- Apertura de archivos adjuntos
- No fue posible la entrega y la razón

A continuación te compartimos los precios de cada uno de nuestros paquetes, ten en cuenta que estos precios no incluyen IVA. Desde nuestra página web puedes adquirir cualquier de los paquetes y pagar con tarjeta de crédito, débito o incluso pagar en efectivo a través de Efecty.

[Haz click aquí para conocer todo acerca de E-entrega](#)

[Haz click aquí para adquirir tu paquete de correos.](#)

Cualquier inquietud adicional que tengas por favor no dudes en escribirnos por este mismo medio.

Cordialmente



Soluciones Digitales
Multisolución
Dirección General
Bogotá D.C., Colombia
Av 6 # 34ª - 11
solucionesdigitales@servientrega.com

De: Francelly Yuliana Valencia Maldonado <francelly.valencia@rutaalmar.com>

Enviado el: lunes, 21 de junio de 2021 08:05

Para: Soluciones Digitales <solucionesdigitales@servientrega.com>

Asunto: petición de información correo certificado en zonas rurales

Buenos días

Por medio de la presente, me gustaría consultar si su empresa de mensajería presta el servicio de correo certificado para notificaciones judiciales en zonas rurales del país

De ser positiva su respuesta, me podrían informar si teniendo en cuenta la situación de orden publico y emergencia sanitaria actual se presentan retrasos para su gestión

Muchas gracias, quedo atenta

FRANCELLY VALENCIA MALDONADO

Profesional Predial Jurídico

Concesión Ruta al Mar S.A.

francelly.valencia@rutaalmar.com

Teléfono: (4) 7921920 – 323 527 17 27

Centro logístico industrial San Jeronimo Bodega 8 Calle B

Monteria-Córdoba

Horario de atención Lunes a Viernes 7:00 am – 12:00 y

1:00 a 5:30 pm

www.rutaalmar.com

www.elcondor.com



La información contenida en este mensaje y sus anexos están dirigidos exclusivamente a sus destinatarios y puede contener información privilegiada o confidencial. Si usted no es el destinatario real, o ha recibido por error esta comunicación, bórrala o destrúyala. Está prohibida su retención, grabación, utilización o divulgación con cualquier propósito puesto que su uso no autorizado acarreará las sanciones y medidas legales a que haya lugar. CONSTRUCCIONES EL CONDOR S.A. no se hace responsable por la presencia en este mensaje o en sus anexos, de algún virus que pueda generar o genere daños en sus equipos, programas o afecte su información.

"La información contenida en este mensaje es propiedad de Construcciones El Condor S.A. y puede contener información expresamente protegida por ley. Si recibió el presente mensaje es porque sus datos se encuentran en las bases de datos de Construcciones El Condor, recolectados dentro de alguna de las actividades principales. Sus datos personales son tratados y protegidos de acuerdo a nuestras Políticas de Tratamiento Datos Personales que puede consultar en nuestra pagina web www.elcondor.com. Si usted no es el destinatario o no desea seguir recibiendo información de Construcciones El Condor, puede ejercer sus derechos frente al tratamiento de datos, tal como se señala en nuestra política de tratamiento de datos."

This email has been scanned by the Symantec Email Security.cloud service.

For more information please visit <http://www.symanteccloud.com>

This email has been scanned by the Symantec Email Security.cloud service.

For more information please visit <http://www.symanteccloud.com>

POR NÚMERO DE PROCESO

Digite el número de proceso

110013103011 20210009400

Este número de proceso tiene varios demandantes y/o varios demandados

¿Consultar dependencia subordinada?

SI No

Elija el estado

SELECCIONE..

Elija la fecha inicial

Elija la fecha Final

Consultar

Número Registros 1

	Número Título	Documento	Nombres	Apellidos	Estado del Título	Fecha Emisión	Fecha Pago	Valor
VER DETALLE	400100008045713	8301259969	AGENCIA NACIONAL DE	INFRAESTRUCTURA ANI	IMPRESO ENTREGADO	18/05/2021	NO APLICA	\$ 32.484.526,00

Total Valor \$ 32.484.526,00

Imprimir

Detalle del Título

NÚMERO TÍTULO	400100008045713
NÚMERO PROCESO	11001310301120210009400
FECHA ELABORACIÓN	18/05/2021
FECHA PAGO	NO APLICA
CUENTA JUDICIAL	110012031011
CONCEPTO	DEPÓSITOS JUDICIALES
VALOR	\$ 32.484.526,00
ESTADO DEL TÍTULO	IMPRESO ENTREGADO
OFICINA PAGADORA	SIN INFORMACIÓN
NÚMERO TÍTULO ANTERIOR	SIN INFORMACIÓN
CUENTA JUDICIAL TÍTULO ANTERIOR	SIN INFORMACIÓN
NOMBRE CUENTA JUDICIAL TÍTULO ANTERIOR	SIN INFORMACIÓN
NÚMERO NUEVO TÍTULO	SIN INFORMACIÓN
CUENTA JUDICIAL DE NUEVO TÍTULO	SIN INFORMACIÓN
NOMBRE CUENTA JUDICIAL DE NUEVO TÍTULO	SIN INFORMACIÓN
FECHA AUTORIZACIÓN	SIN INFORMACIÓN
TIPO IDENTIFICACIÓN DEMANDANTE	NIT (NRO.IDENTIF. TRIBUTARIA)
NÚMERO IDENTIFICACIÓN DEMANDANTE	8301259969
NOMBRES DEMANDANTE	AGENCIA NACIONAL DE
APELLIDOS DEMANDANTE	INFRAESTRUCTURA ANI
TIPO IDENTIFICACIÓN DEMANDADO	CEDULA DE CIUDADANIA
NÚMERO IDENTIFICACIÓN DEMANDADO	784834
NOMBRES DEMANDADO	EUGENIO
APELLIDOS DEMANDADO	BERRIO BERRIO
TIPO IDENTIFICACIÓN BENEFICIARIO	SIN INFORMACIÓN
NÚMERO IDENTIFICACIÓN BENEFICIARIO	SIN INFORMACIÓN
NOMBRES BENEFICIARIO	SIN INFORMACIÓN
APELLIDOS BENEFICIARIO	SIN INFORMACIÓN
NO. OFICIO	SIN INFORMACIÓN
TIPO IDENTIFICACIÓN CONSIGNANTE	NIT (NRO.IDENTIF. TRIBUTARIA)
NÚMERO IDENTIFICACIÓN CONSIGNANTE	8001502800
NOMBRES CONSIGNANTE	FIDUCIARIA BANCOLOMB
APELLIDOS CONSIGNANTE	SIN INFORMACIÓN

Imprimir

Consulta General de Títulos



No se han encontrado títulos asociados a los filtros o el juzgado seleccionado

IP: 190.217.24.4
Fecha: 29/06/2021 09:42:44 a.m.

Elija la consulta a realizar

POR NUMERO DE IDENTIFICACIÓN DEMANDADO ▼

Seleccione el tipo de documento

CEDULA ▼

Digite el número de identificación del demandado

64920823

¿Consultar dependencia subordinada?

☐ Si
☒ No

☐ Elija el estado

SELECCIONE.. ▼

☐ Elija la fecha inicial

Elija la fecha Final

Consultar

Consulta General de Títulos

 No se han encontrado títulos asociados a los filtros o el juzgado seleccionado

IP: 190.217.24.4
Fecha: 29/06/2021 09:44:38 a.m.

Elija la consulta a realizar

POR NUMERO DE IDENTIFICACIÓN DEMANDADO

Seleccione el tipo de documento

CEDULA

Digite el número de identificación del demandado

984834

¿Consultar dependencia subordinada?

☐ Si ☒ No

☐ Elija el estado

SELECCIONE..

☐ Elija la fecha inicial

Elija la fecha Final

Consultar

JUZGADO ONCE CIVIL DEL CIRCUITO

Bogotá, D.C., trece (13) de julio de dos mil veintiuno (2021)

REF.: 11001310301120210009400

En atención a que la parte demandante dio cumplimiento a lo ordenado en el numeral tercero del auto que admitió la demanda, en consonancia con lo dispuesto en el numeral cuarto del artículo 399 del Código General del Proceso, el Despacho decreta la entrega anticipada del bien objeto de expropiación, de un área de 5531.78M2, la cual se encuentra debidamente delimitada dentro de la abscisa inicial K015+877,13 l y la abscisa K016+076,63 l, margen Izquierda, que es segregado de un predio de mayor extensión denominado “LOTE # 1”, ubicado en jurisdicción del municipio de Santiago de Tolú, Departamento de Sucre, identificado con el folio de matrícula inmobiliaria No **340-40378** de la Oficina de Registro de Instrumentos Públicos de Sincelejo, y con cédula catastral 708200001000000010579000000000.

Con fundamento en los artículos 37 y siguientes *ejusdem*, toda vez que el predio se encuentra fuera de la sede de este Despacho, se comisiona a los **Juzgados Promiscuos Municipales de Santiago de Tolú - Reparto**, para efectos de lo anterior.

Así mismo, se requiere a la parte actora para que, si es del caso, lleve los respectivos traslados y copia del auto que admitió la demanda, a efectos de notificar personalmente a los demandados, tal como lo faculta el inciso tercero de la precitada norma.

Por Secretaría **librese** el Despacho Comisorio respectivo.

Por otro lado, se agrega a autos la constancia de fijación de emplazamiento en el predio objeto de expropiación, conforme lo señala el numeral 5° del artículo 399 *ibídem*.

En aplicación del artículo 10 del Decreto 806 del 2020, por Secretaría inclúyanse los datos pertinentes en el Registro Nacional de Emplazados, en relación con los demandados y personas indeterminadas.

Una vez surtidos los términos señalados en el artículo 108 del estatuto general del proceso, ingrésese el expediente nuevamente al Despacho para efectos de nombrar curador *ad litem* que represente los intereses de los emplazados.

Acreditada la inscripción de la demanda en el folio de matrícula e integrado el contradictorio, se continuará con el trámite que corresponda.

NOTIFÍQUESE y CÚMPLASE,



MARÍA EUGENIA SANTA GARCÍA
Jueza

JUZGADO ONCE CIVIL DEL CIRCUITO Bogotá, D. C. NOTIFICACIÓN POR ESTADO: La providencia anterior es notificada por anotación en ESTADO N° 099 hoy 14 de julio de 2021. LUÍS ORLANDO BUSTOS DOMÍNGUEZ Secretario JASS 11-2021-094

JUZGADO ONCE CIVIL DEL CIRCUITO

Bogotá D.C., doce (12) de julio de dos mil veintiuno (2021)

Exp. N°.11001310301120210022600

De conformidad con lo establecido en el artículo 90 del Código General del Proceso, se INADMITE la anterior demanda para que, dentro del término de cinco (5) días y so pena de rechazo, se subsane lo siguiente:

1.) Adécuese las pretensiones de la demanda, presentándolas de forma clara, separándolas para cada uno de los perjuicios reclamados, así como por las personas que los depreca, teniendo en cuenta las normas procesales para efectos de la acumulación de pretensiones, de tal forma que no sean repetitivas y/o excluyentes, tal como lo prevé el numeral 4º del artículo 82 *ibídem*. No incluya hechos ni fundamentos de derecho, así como aquellas que no sean compatibles con la acción. Numeral 4º artículo 82 C.G.P., indicando el tipo de responsabilidad que depreca.

2.) Alléguese poder especial, como mensaje de datos de la poderdante, dirigido al juez del conocimiento, conforme el artículo 5 Decreto 806 de 2020, asimismo, donde se indique el objeto de la demanda, de tal forma que no dé lugar a confundirlo con otro. Lo anterior de conformidad con lo señalado en el artículo 74 C.G.P.

3.) Respecto al demandante Julián Roberto Ruiz Almeciga, deberá aclararse, tanto en el poder como en la demanda, la calidad en la que actúa, esto es, en nombre propio o como heredero determinado y, en tal sentido, adecuar las pretensiones impetradas, de ser del caso, deberá, demás dar cumplimiento a lo establecido en el artículo 87 *ejusdem*, esto es, indicar en la demanda si se ha iniciado juicio de sucesión, en tal sentido deberá adecuarla conforme lo establece el referido articulado, indicando si existen otros herederos determinados y acreditando su calidad de tal.

4.) Indíquese el domicilio de los extremos de la *litis*, asimismo, señale el nombre, tipo y número de identificación y domicilio de los representantes legales de las entidades demandadas. Numeral 2º artículo 82 *ibídem*.

5.) En atención a que se solicita la indemnización de perjuicios, preséntese juramento estimatorio en la forma establecida en el artículo 206 del Código General del Proceso. Numeral 7º artículo 82 *ídem*, téngase en cuenta que no debe incluir perjuicios extrapatrimoniales en el mismo.

6.) Alléguese documental que acredite en legal forma el parentesco de los demandantes que, para tal efecto, allegaron partidas de bautizo, con el fin de acreditar su legitimación en la causa por activa. Numeral 11 artículo 82 *ejusdem*.

7.) Adecúense los hechos de la demanda, para lo cual deberá indicar la base, periodo y operación matemática que respalda las sumas deprecadas por lucro cesante. Numeral 5º del artículo 82 *ibídem*.

8.) Señálese dirección física y electrónica donde los demandantes recibirán notificaciones personales. Numeral 10 artículo 82 *ibídem*.

De acuerdo con lo anterior, deberá integrar en debida forma la demanda.

NOTIFÍQUESE y CÚMPLASE,

MARÍA EUGENIA SANTA GARCÍA

Jueza

JUZGADO ONCE CIVIL DEL CIRCUITO
Bogotá, D. C.

NOTIFICACIÓN POR ESTADO: La providencia anterior es notificada por anotación en ESTADO N° **099** hoy **14 de julio de 2021**.

LUÍS ORLANDO BUSTOS DOMÍNGUEZ
Secretario

JACP