

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 485**

51 Int. Cl.:

A61K 31/015 (2006.01) **A61K 8/34** (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 31/121 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008** **E 08804813 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 2190424**

54 Título: **Utilización del alcohol perílico para incrementar la reparación de tejidos**

30 Prioridad:

26.09.2007 EP 07291145

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

11.07.2013

73 Titular/es:

AISA THERAPEUTICS (100.0%)
4 RUE PIERRE FONTAINE
91058 EVRY CEDEX, FR

72 Inventor/es:

D'ALESSIO, PATRIZIA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 412 485 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización del alcohol perílico para incrementar la reparación de tejidos.

- 5 La invención se refiere a la utilización del alcohol perílico para incrementar la reparación de tejidos biológicos en indicaciones cosméticas y terapéuticas.

La reparación de tejidos incluye los procedimientos que conducen a la recuperación de una lesión, con o sin recaídas, mediante la regeneración de tejidos o la cicatrización.

- 10 La regeneración intrínseca de tejidos es el mantenimiento periódico del cuerpo, en el que millones de células producen constantemente el remodelado de los tejidos y la restauración de las funciones de los tejidos. Se inicia con las células madre. Las señales bioquímicas atraen las células madre a sitios en los que los factores de crecimiento y las citocinas han creado un ambiente para la regeneración.

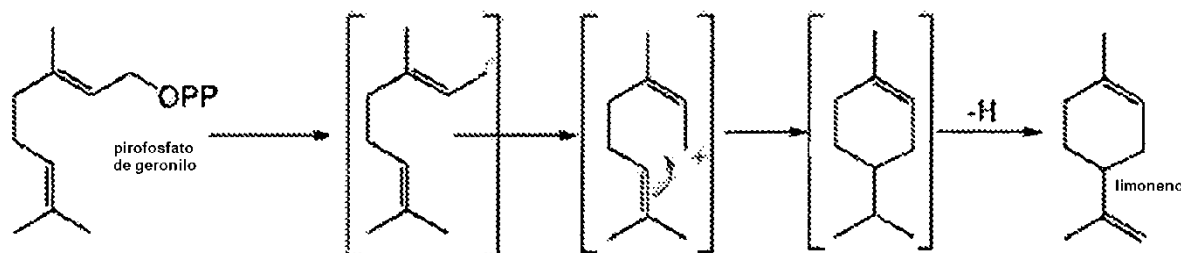
- 15 El tejido cicatrizal es diferente del tejido regenerado. Al producirse una lesión, la primera reacción del cuerpo es la hemostasis, en la que la fibrina y las citocinas inflamatorias forman un coágulo sanguíneo o andamiaje provisional. Llegan más células inflamatorias, remodelando el coágulo en tejido cicatrizal. El colágeno en el tejido cicatrizal se encuentra alineado anormalmente y presenta poca elastina. Al contrario que el tejido regenerado, el tejido cicatrizal es diferente (y menos perfecto) del tejido circundante al que sustituye.

- 20 Los terpenos son una gran y diversa clase de hidrocarburos producidos principalmente por una amplia diversidad de plantas, particularmente coníferas, aunque también algunos insectos, tales como las mariposas cola de golondrina, que emiten terpenos de su osmeterium. Son los componentes principales de la resina y de la turpentina producida a partir de resina. El nombre "terpeno" deriva del término "turpentina". Al modificar químicamente los terpenos, tal como mediante oxidación o reorganización del esqueleto de carbonos, los compuestos resultantes generalmente se denominan terpenoides. Algunos autores utilizan el término terpeno de manera que incluye todos los terpenoides. Los terpenos y terpenoides son los constituyentes principales de los aceites esenciales de muchos tipos de plantas y flores. Los aceites esenciales se utilizan ampliamente como aditivos saborizantes naturales para alimentos, como fragancias en perfumería, en aromaterapia, y en medicinas tradicionales y alternativas. Las variaciones sintéticas y derivados de terpenos y terpenoides naturales también expanden en gran medida la diversidad de aromas utilizados en perfumería y los saborizantes utilizados en aditivos alimentarios.

- 35 Los terpenos se derivan biosintéticamente a partir de unidades de isopreno, que presenta una fórmula molecular C_5H_8 . Las fórmulas moleculares básicas de los terpenos son múltiplos de la misma, $(C_5H_8)_n$, en donde n es el número de unidades de isopreno unidas. El isopreno mismo no experimenta el proceso de construcción, sino que las formas activadas, pirofosfato isopentenilo (IPP o también difosfato de isopentenilo) y pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP o también difosfato de dimetilalilo) son los componentes en la ruta biosintética. A medida que se construyen cadenas de unidades de isopreno, los terpenos resultantes se clasifican secuencialmente según el tamaño en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos.

- 45 Los monoterpenos consisten de dos unidades de isopreno y presentan la fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. Son ejemplos de monoterpenos el geraniol y el limoneno. Los monoterpenos se encuentran en las formas monocíclicas, bicíclicas y acíclicas y son hidrocarburos simples o modificados. Son una clase de moléculas isoprenoides derivadas del anabolismo del acetato por las rutas biosintéticas de la rama del ácido mevalónico de las plantas.

- 50 El D-limoneno ((4R)-1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno), un componente principal del aceite de cáscara de naranja y el prototipo de los monoterpenos en los estudios de carcinogénesis se forma mediante la ciclización del producto intermedio isopreno de 10 carbonos pirofosfato de geraniol.



- 55 Se ha demostrado que el D-limoneno y sus metabolitos derivados presentan eficacia quimioterapéutica y quimiopreventiva del cáncer en diversos sistemas de modelo preclínico.

Crowell P.L. *et al.* han identificado metabolitos plasmáticos del limoneno en sangre de siete voluntarios humanos sanos que habían ingerido 100 mg/kg de limoneno en una crema. El análisis capilar en línea de cromatografía de

gases/espectrometría de masas indicó que se encontraban presentes por lo menos cinco compuestos 4 horas después de la ingestión. Se identificaron dos picos principales como metabolitos del limoneno de rata, el ácido dihidroperílico y el ácido perílico, y se observaron dos picos menores que se identificaron como los metil-ésteres respectivos de dichos ácidos (Crowell P.L. *et al.*, 1994).

Aunque el R-limoneno y el S-limoneno son sólo inhibidores débiles de los enzimas de isoprenilación, sus metabolitos principales, el ácido perílico y el alcohol perílico, son inhibidores más potentes, con valores de IC₅₀ en el orden de pocos mM. Los metabolitos presentan una mayor actividad con el enzima geranylgeranyltransferasa de tipo I que con la farnesiltransferasa (Hardcastle I.R. *et al.*, 1999).

El D-limoneno presenta una actividad quimioterapéutica pronunciada y una toxicidad mínima en estudios preclínicos. En un ensayo clínico de fase I para evaluar la toxicidad, tras evaluar la dosis máxima tolerada (DMT) y la farmacocinética en pacientes con cáncer avanzado, se realizó una evaluación de fase II limitada en cáncer de mama. El D-limoneno es bien tolerado en los pacientes de cáncer a dosis que podrían presentar actividad clínica (Vigushin D.M. *et al.*, 1998).

Los compuestos químicos derivados de plantas utilizados en la medicina tradicional para curar enfermedades son una fuente importante para el desarrollo de nuevas moléculas farmacéuticas activas. Utilizando esta estrategia, previamente se habían identificado varios monoterpenos capaces de prevenir o tratar específicamente la senescencia de las células endoteliales vasculares humanas inducida por episodios inflamatorios repetidos (documento WO 2005/105074).

La respuesta inflamatoria es el primer mecanismo vitalmente necesario para la reparación de los tejidos dañados. Se caracteriza por sucesos inmediatos que evitan la pérdida de glóbulos rojos; una respuesta aguda para eliminar los tejidos dañados y para establecer un suministro vascular que dé soporte a la reparación y una etapa de reparación de los tejidos.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como el ibuprofeno, una molécula antiinflamatoria en el mercado, impiden el último estadio del proceso inflamatorio, es decir, la reparación de los tejidos, en virtud de que retrasan la inflamación. Los agentes antiinflamatorios cuyo efecto principal es reducir la reacción inflamatoria granulocítica también presentan una tendencia depresora de la cicatrización (Lee K.H. *et al.*, 1968).

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos que reducen la resistencia a la rotura en las heridas por incisión se ha encontrado que presentan efectos variables sobre la contracción de las heridas y la epitelización (Rao C.M. *et al.*, 1988; Kumar A. *et al.*, 1988).

Se ha informado de que el ibuprofeno reduce la resistencia a la rotura del tendón extensor reparado, la contracción de heridas y la epitelización (Dvivedi S. *et al.*, 1997; Kulick M.I. *et al.*, 1986; Dong Y-L. *et al.*, 1993).

Se ha demostrado en el contexto de la presente memoria inesperadamente que el limoneno (un compuesto de referencia) y el alcohol perílico inducen la reparación de los tejidos biológicos a pesar del efecto antiinflamatorio del limoneno anteriormente observado (documento WO 2005/105074).

En primer lugar, se ha observado en el contexto de la presente memoria inesperadamente en un modelo de inflamación de colon de rata que el efecto antiinflamatorio del limoneno no impide la reparación de los tejidos.

En segundo lugar, se ha demostrado en el contexto de la presente memoria que el limoneno y el alcohol perílico resultan beneficiosos contra trastornos de inflamación crónica de la piel tales como la dermatitis atópica.

En tercer lugar, se ha demostrado en el contexto de la presente memoria que el efecto beneficioso del limoneno y el alcohol perílico en un modelo clásico de cicatrización.

Con el fin de apreciar los efectos del limoneno sobre la reparación de tejidos, se utilizaron 30 ratas Wistar HsdBrlHan hembra en un modelo de colitis de rata. Se indujo la inflamación del colon mediante una única administración rectal de una solución ácida de 2,5,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS, Fluka, Francia) y se estudió el efecto antiinflamatorio del limoneno sobre la reparación de tejidos proporcionado por la administración oral. Se compararon las puntuaciones macroscópicas y microscópicas medias de los colones muestreados 6 días después de la inducción de la inflamación del colon. Los resultados demostraron que el limoneno, en comparación con el ibuprofeno, indujo la reparación postinflamatoria de los tejidos, a pesar de su efecto antiinflamatorio. Además, redujo el nivel circulante de TNF- α a una concentración cinco veces inferior a las concentraciones de ibuprofeno, utilizado como molécula de referencia.

En un modelo de inflamación crónica de la piel, se ha demostrado asimismo en el contexto de la presente memoria un efecto significativo del limoneno y del alcohol perílico sobre la reparación de la piel y los niveles de citocinas proinflamatorias. Se indujo la inflamación crónica de la piel en 24 ratones sin pelo hembra Skh-1 mediante aplicaciones dorsales diarias de 12-miristato-13-acetato de forbol (TPA) durante siete días (Stanley P.L. *et al.*, 1991).

5 En un segundo modelo de la piel, se estudió la influencia del limoneno y el alcohol perílico sobre el proceso de cicatrización en ratones sin pelo Skh-1 sometidos a una escarificación de la piel en cada flanco. Se administró aceite de maíz solo, limoneno en solución en aceite de maíz o alcohol perílico en solución en aceite de maíz diariamente mediante aplicación tópica en cada sitio de escarificación a la dosis de 10 mg/kg/día durante 8 días. El proceso de cicatrización de heridas proporcionó mejores resultados con aplicaciones diarias de alcohol perílico que con el limoneno y mucho mejores resultados que con el control.

10 *Utilización de alcohol perílico para incrementar la reparación de tejidos*

10 De esta manera, la presente invención se refiere a la utilización de alcohol perílico para incrementar la reparación de tejidos biológicos en indicaciones cosméticas y terapéuticas.

15 Preferentemente, la reparación de tejidos incluye la regeneración de tejidos y la cicatrización.

15 En una forma de realización, se utiliza alcohol perílico según la invención para incrementar la regeneración de tejidos biológicos *in vitro*.

20 En el contexto de la presente invención, un "tejido" se refiere a una colección de células interconectadas.

20 En el contexto de la presente invención, un "tejido biológico" se refiere a un tejido de origen humano o animal e incluye tejidos *in vivo* y cultivos de tejidos *in vitro* o *ex vivo*.

25 Entre los ejemplos de cultivos de tejidos *in vitro* o *ex vivo* se incluyen cultivos de células, tales como fibroblastos y modelos de piel *in vitro* que asocian diferentes tipos celulares presentes en la piel.

25 Entre los ejemplos de tejidos biológicos *in vivo* se incluyen la piel y las mucosas.

30 En una forma de realización, piel se refiere al cuero cabelludo.

30 En el contexto de la presente invención, una "reparación de tejidos biológicos" se refiere a la regeneración de tejidos y/o a la cicatrización de un tejido biológico que muestra lesiones y/o defectos y/o síntomas de enfermedad.

35 Entre las lesiones de tejidos biológicos se incluyen quemaduras, cortes, recaídas de quemaduras, heridas y recaídas de condiciones meteorológicas extremas, incluyendo el frío o calor excesivo.

40 Entre las enfermedades de los tejidos biológicos se incluyen enfermedades de los tejidos de la piel, tales como la dermatitis atópica, la queratitis seborreica, la epidermólisis ampollosa adquirida, la soriasis, las alteraciones de la piel en el lupus eritematoso, la dermatomiositis, el escleroderma, el acné crónico, la celulitis crónica, el prurito y la formación anormal o defectuosa de cicatrices, tal como en la diabetes.

45 Entre los defectos de los tejidos biológicos se incluyen defectos del tejido de la piel tales como granos de acné, celulitis, cicatrices, senescencia prematura de la piel inducida por el sol y los rayos UV, defectos antiestéticos de la piel debidos al proceso de envejecimiento, incluyendo cicatrices y manchas, arrugas y elementos escamosos, marcas de estiramiento, marcas de envejecimiento, senescencia prematura de la piel inducida por el sol y los rayos UV, rosácea y consecuencias antiestéticas de recaídas postraumáticas.

50 La utilización de alcohol perílico para incrementar la reparación de los tejidos biológicos puede ser cosmética o terapéutica.

50 Para dicha utilización, el alcohol perílico puede administrarse por vía sistémica o por vía tópica. Preferentemente, la vía sistémica se selecciona de entre el grupo que consiste de las vías oral, lingual, sublingual, muscular e intravenosa. Más preferentemente, la vía sistémica es la vía oral.

55 Preferentemente, un uso cosmético del alcohol perílico podría encontrarse en forma de una formulación cosmética utilizada tópicamente o en forma de un complemento alimentario utilizado oralmente.

Uso cosmético

60 En otra forma de realización, la invención se refiere al uso cosmético de alcohol perílico para incrementar la reparación de los tejidos biológicos de la piel o una mucosa en un individuo.

65 Preferentemente, la invención se refiere a la utilización de alcohol perílico oral o tópicamente para incrementar la reparación de tejidos biológicos de la piel o de una mucosa en un individuo.

Preferentemente, la invención se refiere al uso cosmético de alcohol perílico para incrementar la regeneración de tejidos de la piel o de una mucosa en un individuo.

5 La piel incluye la epidermis y la dermis. La epidermis es la capa más externa de la piel. El tipo principal de células que constituye la epidermis son los queratinocitos, los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merckels. La dermis es la capa de la piel debajo de la epidermis que consiste en tejido conectivo.

10 Entre los ejemplos de mucosas se incluyen la mucosa perioral, la mucosa bucal, la mucosa gástrica y del colon y la mucosa genital.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "individuo" se refiere a un ser humano, un animal de compañía, un animal de laboratorio o un animal de granja, más preferentemente un ave o un mamífero, tal como un roedor, un felino, un equino, un bovino, un caprino, un canino, un porcino y un primate. Preferentemente, un individuo según la invención es un ser humano, un gato o un perro.

El término "tópicamente" se refiere a aplicado en la piel o en una mucosa.

20 En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un método par aprevenir o tratar estados no patológicos de la piel o defectos de la mucosa.

Preferentemente, un método para prevenir o tratar los estados no patológicos de la piel o defectos de una mucosa según la invención comprende la aplicación de una formulación cosmética que comprende alcohol perílico, en una dosis o en dosis repetidas y a intervalos de tiempo específicos, sobre dicha piel o defecto de mucosa.

25 En el contexto de los métodos par aprevenir o tratar estados no patológicos la piel o defectos de mucosa según la invención, el régimen de administración puede ser, por ejemplo, un periodo superior a 4 semanas o superior a 8 semanas.

30 Preferentemente, en el contexto de los métodos para prevenir o tratar los estados no patológicos de la piel o defectos de mucosa según la invención, el intervalo de dosis de monoterpeno puede ser de entre 0,1 mg/kg/día y 100 mg/kg/día. Más preferentemente, el intervalo de dosis es de entre 1 mg/kg/día y 100 mg/kg/día. Todavía más preferentemente, el intervalo de dosis es de entre 10 mg/kg/día y 50 mg/kg/día.

35 Preferentemente, el uso cosmético de alcohol perílico es el incremento de la reparación de los tejidos biológicos de la piel o de una mucosa en un individuo puede encontrarse en una forma seleccionada de entre el grupo que consiste en parche, cápsula, píldora, crema, pasta (pasta dentífrica), detergente tal como champú y jabón dermatológico, jabón de baño de burbujas o sales de baño, loción acuosa, alcohólica o aceitosa, gel y aerosol bajo en ozono.

40 Preferentemente, el monoterpeno alcohol perílico se atrapa en liposomas o en cualquier otro sistema de encapsulado químico o mecánico, o dispositivo que proporcione un efecto retardado.

45 El uso cosmético de alcohol perílico preferentemente se realiza tópicamente mediante la aplicación de una formulación cosmética sobre la piel o una mucosa.

Las formulaciones cosméticas pueden incluir, aparte de alcohol perílico, otros principios activos y uno o más portadores cosméticamente aceptables.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador cosméticamente aceptable" se refiere a un portador que debe utilizarse en contacto con diferentes partes superficiales del cuerpo humano, por ejemplo la epidermis, sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida u otra reacción no deseada.

55 Dichas formulaciones cosméticas generalmente presentan la forma de loción, emulsión, crema, gel, champú o parche.

El experto en la materia será capaz de especificar los componentes suplementarios que deben añadirse a las formulaciones cosméticas según el tipo de formulación cosmética que debe obtenerse.

60 Preferentemente, la invención se refiere a la utilización de alcohol perílico para incrementar la reparación de la piel o de una mucosa sobre un defecto de la piel o de una mucosa, seleccionando preferentemente dicho defecto de entre el grupo que consiste en defectos antiestéticos de la piel, tales como celulitis, cicatrices, senescencia prematura de la piel inducida por el sol y los rayos UV, los defectos antiestéticos de la piel debidos al proceso de envejecimiento, incluyendo cicatrices y manchas, arrugas y elementos escamosos, marcas de estiramiento, marcas de envejecimiento, senescencia prematura de la piel inducida por el sol y los rayos UV y consecuencias antiestéticas de recaídas postraumáticas.

65

Uso farmacéutico

5 Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a la utilización de alcohol perílico para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la prevención o al tratamiento de una lesión de los tejidos biológicos en un individuo.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a la utilización de alcohol perílico para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la prevención o tratamiento de una enfermedad de los tejidos biológicos.

10 Preferentemente, dicha lesión o enfermedad de los tejidos biológicos es una lesión o enfermedad de la piel.

15 En una forma de realización preferida, dicha prevención o tratamiento se refiere a un ser humano, un animal de compañía, un animal de laboratorio o un animal de granja. Más preferentemente, dicha prevención, alivio o tratamiento se refiere a un individuo seleccionado de entre el grupo que consiste en un ave o un mamífero, tal como un roedor, un felino, un equino, un bovino, un caprino, un canino, un porcino y un primate. Más preferentemente, dicha prevención, alivio o tratamiento se refiere a un ser humano, un gato o un perro.

20 Preferentemente, dicha composición farmacéutica se utiliza por vía tópica o sistémica, más preferentemente por vía oral.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden alcohol perílico como principio activo y portadores farmacéuticamente aceptables.

25 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada al administrarse en un animal, o en un ser humano, según resulte apropiado.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. La utilización de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional resulte incompatible con el monoterpeno utilizado según la invención, se encuentra contemplada su utilización en las composiciones farmacéuticas, en los medicamentos o para la puesta en práctica de los métodos para la prevención o tratamiento de una lesión de los tejidos biológicos en un individuo según la invención. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones farmacéuticas.

35 En el contexto de la invención, las expresiones "prevenir", "que previene" o "prevención" se refieren a permitir que se evite una lesión de un tejido.

40 En el contexto de la invención, las expresiones "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refieren a revertir, aliviar o inhibir una lesión de un tejido.

45 En el contexto de la invención, una enfermedad de los tejidos es preferentemente una enfermedad de la piel y puede incluir enfermedades de tejidos de la piel tales como la dermatitis atópica, la queratitis seborreica, la epidermolísis ampollosa adquirida, la soriasis, alteraciones de la piel tales como el lupus eritematoso, la dermatomiositis, el escleroderma, el acné crónico, la celulitis crónica, el prurito y la formación anormal o defectuosa de las cicatrices, tal como en la diabetes.

50 En el contexto de la invención, una lesión de los tejidos es preferentemente una lesión de la piel y puede incluir quemaduras, cortes, recaídas de condiciones meteorológicas extremas, incluyendo frío o calor excesivo, recaídas y heridas por quemadura.

55 En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un alcohol perílico para la utilización en un método para la prevención o el tratamiento de una lesión o enfermedad de los tejidos biológicos en un individuo.

Preferentemente, un método para la prevención o tratamiento de una lesión o enfermedad de tejidos biológicos en un individuo según la invención comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende alcohol perílico en una dosis o en dosis repetidas y a intervalos de tiempo especificados.

60 En el contexto de los métodos para la prevención o el tratamiento de una lesión o enfermedad de tejidos biológicos en un individuo según la invención, el régimen de administración puede ser mediante una vía sistémica o tópica, preferentemente por una vía tópica.

65 En el contexto de los métodos para la prevención o el tratamiento de una lesión o enfermedad de tejidos biológicos en un individuo según la invención, el régimen de administración puede ser, por ejemplo, durante un periodo inferior a 6 semanas, o inferior a 8 semanas.

5 Preferentemente, en el contexto de los métodos para la prevención o el tratamiento de una lesión o enfermedad de tejidos biológicos en un individuo según la invención, el intervalo de dosis de monoterpeno puede ser de entre 0,1 mg/kg/día y 100 mg/kg/día. Más preferentemente, el intervalo de dosis es de entre 1 mg/kg/día y 100 mg/kg/día. Todavía más preferentemente, el intervalo de dosis es de entre 10 mg/kg/día y 50 mg/kg/día. Todavía más preferentemente, el intervalo de dosis es de entre 10 mg/kg/día y 50 mg/kg/día.

10 El uso farmacéutico del alcohol perílico preferentemente se lleva a cabo tópicamente mediante la aplicación de una formulación farmacéutica sobre la piel o una mucosa.

10 Preferentemente, una composición farmacéutica que comprende alcohol perílico para la utilización en la prevención o tratamiento de una lesión de tejidos biológicos en un individuo puede presentarse en una forma seleccionada de entre el grupo que consiste en parche, cápsula, píldora, pomada y vendas para heridas.

15 La invención se ilustra adicionalmente a partir las figuras y ejemplos siguientes.

Figuras

20 La figura 1 muestra la evolución de los pesos medios de las ratas (medias \pm ESM).

20 La figura 2 muestra los niveles séricos medios de TNF- α (pg/ml) (medias \pm ESM).

25 Prueba U de Mann-Whitney: - *P<0,05 y **P<0,01 (frente a "Control"),
- #P<0,05 (frente a "TNBS/Control").

25 La figura 3 muestra las puntuaciones macroscópicas medias de los colones de rata de los 5 grupos de tratamiento (medias \pm ESM).

30 Prueba U de Mann-Whitney: - **P<0,01 (frente a "Control"),
- #P<0,05 y ##P<0,01 (frente a "TNBS/Control"),
- ° P<0,05 (frente a "TNBS/Limoneno 100").

30 La figura 4 muestra las longitudes (cm) medias de los colones de las ratas de los 5 grupos de tratamiento.

35 (Medias # ESM) Prueba U de Mann-Whitney: - **P<0,01 (frente a "Control"),
- # P<0,05 (frente a "TNBS/Control").

35 La figura 5 muestra la evolución de los pesos medios de los ratones (medias \pm ESM).

40 La figura 6 muestra las puntuaciones macroscópicas medias de inflamación de la piel de los ratones de los 4 grupos de tratamiento.

45 La figura 7 muestra las puntuaciones microscópicas medias de inflamación de la piel de los ratones de los 4 grupos de tratamiento.

45 La figura 8 muestra los niveles séricos medios de IL-1 β (pg/ml) de los ratones de los 4 grupos de tratamiento antes del sacrificio.

50 La figura 9 muestra los niveles séricos medios de IL-6 (pg/ml) de los ratones de los 4 grupos de tratamiento antes del sacrificio.

50 La figura 10 muestra los niveles séricos medios de IFN- γ (pg/ml) de los ratones de los 4 grupos de tratamiento antes del sacrificio.

55 Ejemplos

<El limoneno debe considerarse un ejemplo de referencia>

60 **Ejemplo 1: efectos antiinflamatorios preventivos del limoneno en un modelo de colitis de rata**

Materiales y métodos

1- Animales

65 Se utilizaron treinta ratas Wistar HsdBr/Han EOPS hembra (Ganat, Francia) con un peso medio de entre 175 y 200 g.

2- Productos sometidos a ensayo

Se utilizaron limoneno ((R)-(+)-limoneno, PM=136,23, pureza=97%) e ibuprofeno ((S)-(+)-ibuprofeno, PM=206,28, pureza=100%) de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, Fallavier, Francia).

Se prepararon limoneno e ibuprofeno en aceite de maíz extemporáneamente cada día de tratamiento.

3- Efectos antiinflamatorios preventivos del limoneno sobre la inflamación de colon

Se pesaron las 30 ratas, se marcaron y se dividieron en 5 grupos de 6 (n=6):

- grupo de "control"=sin inflamación de colon y tratamiento oral diario con aceite de maíz,
- grupo de "control de TNBS"=inflamación de colon inducida y tratamiento oral diario con limoneno a una dosis de 10 mg/kg,
- grupo de "TNBS + Limoneno 100"=inflamación de colon inducida y tratamiento oral diario con Limoneno a una dosis de 100 mg/kg,
- grupo de "TNBS + Ibuprofeno"=inflamación de colon inducida y tratamiento oral diario con ibuprofeno a una dosis de 50 mg/kg.

3.1- Inducción de la inflamación de colon

Se indujo la inflamación del colon mediante una única administración rectal de una solución de ácido 2,4,6-trinitrobencén-sulfónico (TNBS, Fluka, Francia). Se disolvió TNBS en alcohol de 40° a una concentración de 50 mg/ml. Los animales se anestesiaron intraperitonealmente con 2 mg/kg de Calmivet (Vetoquinol, Lure, Francia) y 50 mg/kg de quetamina (Ketamine 1000, Virbac, Carros, Francia). Se administraron rectalmente 0,4 ml de la solución de TNBS y las ratas se mantuvieron durante por lo menos 30 minutos para evitar la liberación del TNBS.

3.2- Administración de productos (Tabla 1)

Se administró limoneno diariamente y oralmente a una dosis de 10 y 100 mg/kg durante 3 días antes y 5 días después de la inducción de la inflamación de colon.

Se administró diariamente ibuprofeno, utilizado como control, por vía oral a una dosis de 50 mg/kg durante 3 días antes y 5 días después de la inducción de la inflamación de colon.

Tabla 1: resumen de las condiciones de tratamiento

| Grupos | nº de ratas | Inducción de la inflamación de colon | | Días de tratamiento |
|---------------------|-------------|--------------------------------------|------------------|----------------------------------|
| | | Producto | Día de inducción | |
| Control | 6 | Aceite de maíz | J ₁ | J ₋₂ a J ₅ |
| Control de TNBS | 6 | TNBS | J ₁ | |
| TNBS + Limoneno 10 | 6 | TNBS | J ₁ | |
| TNBS + Limoneno 100 | 6 | TNBS | J ₁ | |
| TNS + Ibuprofeno | 6 | TNBS | J ₁ | |

4- Estadística

Se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis, posiblemente seguida de una prueba de Mann-Whitney, para comparar las diferentes variables estudiadas de los grupos tratados mediante comparación con los grupos "Control" y "TNBS/Control". Se fijó el umbral de significancia en P>0,05.

Se llevaron a cabo las estadísticas con el software Statview 5 (SAS, Institute Inc., USA).

Resultados

1- Progreso del peso de los animales

La figura 1 muestra el progreso del peso medio de los animales de los 5 grupos durante el ensayo.

La prueba de Kruskal-Wallis ($H_{(ddl=4)}=0,381$; $P=0,984$) no mostró heterogeneidad significativa entre los pesos medios de las ratas de los 5 grupos de tratamiento antes del tratamiento en J₋₂.

En J₁, antes de la administración rectal de TNBS y tras un periodo de ayuno de 48 horas (J₋₁ a J₁), la prueba de Kruskal-Wallis ($H_{(ddl=4)}=0,308$, $P=0,989$) no mostró heterogeneidad significativa entre los pesos medios de las ratas de los 5 grupos de tratamiento.

5 En J₆, la prueba de Kruskal-Wallis ($H_{(ddl=4)}=14,415$, $P=0,0061$) mostró una heterogeneidad significativa entre los pesos medios de las ratas de los 5 grupos de tratamiento. La prueba de U de Mann-Whitney demostró que los pesos medios de las ratas de los grupos "TNBS/Control", "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" eran significativamente inferiores que los de las ratas del grupo "Control". Los pesos medios de las ratas de los grupos "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" no eran significativamente diferentes de los de las ratas del grupo "TNBS/Control". Los pesos medios de las ratas de los grupos "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" no eran significativamente diferentes.

2- Puntuaciones macroscópicas de colon

15 La figura 2 y la Tabla 2 muestran las puntuaciones macroscópicas medias de los colones de los animales de los 5 grupos de tratamiento extraídos 6 días después de la inducción de la inflamación del colon.

La prueba de Kruskal-Wallis ($H_{(ddl=4)}=21,925$, $P=0,0002$) demostró una heterogeneidad significativa entre las puntuaciones macroscópicas medias de los colones de las ratas de los 5 grupos de tratamiento. La prueba U de Mann-Whitney demostró que las puntuaciones macroscópicas medias de los colones de las ratas de los grupos "TNBS/Control", "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" eran significativamente superiores a las de las ratas del grupo "Control". Las puntuaciones macroscópicas medias de los colones de las ratas de los grupos "TNBS/Limoneno 10" y "TNBS/Ibuprofeno" eran significativamente inferiores a las de las ratas de los grupos "TNBS/Control" y "TNBS/Limoneno 100" ($z=2,03$, $P=0,0427$ y $z=2,41$, $P=0,0159$, respectivamente). Las puntuaciones macroscópicas medias de los colones de las ratas de los grupos "TNBS/Limoneno 10" y "TNBS/Ibuprofeno" no eran significativamente diferentes.

Tabla 2

| Tratamiento | Control (n=6) | TNBS/Control (n=6) | TNBS/Limoneno 10 (n=6) | TNBS/Limoneno 100 (n=6) | TNBS/Ibuprofeno (n=6) |
|---|---------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Media | 0,0 | 10,7 | 6,5 | 10,7 | 4,7 |
| ± ESM | ± 0,0 | ± 2,0 | ± 1,3 | ± 2,7 | ± 2,7 |
| Prueba de Kruskal-Wallis $H_{(ddl=4)}=21,925$, $P=0,0002$ Prueba U de Mann-Whitney (frente a Control) | | $z=3,08$ $P=0,0021$ | $z=3,09$ $P=0,0020$ | $z=3,08$ $P=0,0021$ | $z=3,08$ $P=0,0021$ |
| Prueba U de Mann-Whitney (frente a TNBS/Control) | | | $z=2,50$ $P=0,0124$ | $z=0,33$ N.S. | $z=2,59$ $P=0,0097$ |

30 **3- Longitud de colon**

La figura 3 muestra las longitudes medias de los colones de los animales de los 5 grupos de tratamiento extraídos 6 días después de la inducción de la inflamación de colon.

35 La prueba de Kruskal-Wallis ($H_{(ddl=4)}=15,827$, $P=0,0033$) demostró una heterogeneidad significativa entre las longitudes medias de los colones de las ratas de los 5 grupos de tratamiento. La prueba U de Mann-Whitney demostró que las longitudes medias de los colones de las ratas de los grupos "TNBS/Control", "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" eran significativamente superiores a las de las ratas del grupo "Control". Las longitudes medias de los colones de las ratas de los grupos "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" eran significativamente inferiores a las de las ratas del grupo "TNBS/Control". Las longitudes medias de los colones de las ratas de los grupos "TNBS/Limoneno 10", "TNBS/Limoneno 100" y "TNBS/Ibuprofeno" no eran significativamente diferentes.

45 **4- Análisis histopatológico y puntuaciones microscópicas de los colones**

El análisis histopatológico de los colones de los animales de los 5 grupos de tratamiento extraídos 6 días después de la inducción de inflamación de colon se llevó a cabo en 9 cortes extendidos de un colon.

50 Los colones del grupo "Control" mostraron una pared cólica normal, sin edema, infiltrado inflamatorio, necrosis, atrofia epitelial ni displasia, correspondiente a una puntuación microscópica de 0.

Los colones del grupo "TNBS/Control" mostraron en general una pared cólica extremadamente remodelada con lesiones necróticas agudas supuradas e inflamatorias multifocales correspondientes a una puntuación microscópica de 4.

Los colonos del grupo "TNBS/Limoneno 10" mostraron en general una pared cólica remodelada con lesiones multifocales moderadas de colitis no específica ulcerosa correspondiente a una puntuación microscópica de 2.

5 Los colonos del grupo "TNBS/Limoneno 100" mostró en general una pared cólica extremadamente remodelada con lesiones inflamatorias necróticas agudas supuradas y multifocales correspondientes a una puntuación microscópica de 4.

10 Los colonos del grupo "TNBS/Ibuprofeno" mostraron en una mitad de la pared cólica una lesión bifocal moderada de colitis no específica ulcerosa correspondiente a una puntuación microscópica de 1, y para la otra mitad, una pared cólica muy remodelada con lesiones inflamatorias necróticas agudas supuradas y multifocales correspondientes a una puntuación microscópica de 4.

Ejemplo 2: efectos antiinflamatorios preventivos del limoneno y del alcohol perílico en un modelo de inflamación de la piel crónica de ratón

15 Materiales y métodos

1- Animales

20 Se utilizaron 24 ratones sin pelo Skh-1 hembra con un peso medio de entre 20 y 25 g.

Los 24 ratones se marcaron y se dividieron en 4 grupos de 6 (n=6):

- 25 - grupo "control" = ninguna inflamación inducida de la piel y tratamiento tópico diario durante 10 días con portador,
- grupo "TPA+Control" = inflamación de la piel inducida y tratamiento tópico diario durante 10 días con portador,
- grupo "TPA+Limoneno" = inflamación inducida de la piel y tratamiento tópico diario durante 10 días con limoneno 10 mg/kg/día,
- 30 - grupo "TPA+Alcohol perílico" = inflamación inducida de la piel y tratamiento tópico diario durante 10 días con alcohol perílico 10 mg/kg/día.

2- Inducción de inflamación de la piel

35 Se almacenó 12-miristato-13-acetato de forbol (TPA, PM=616,83, pureza=por lo menos 98%) antes de la utilización siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia).

40 Se aplicaron diariamente 100 µl de una solución en TPA sobre las superficies dorsales de los ratones durante siete días (de J₄ a J₁₀) a una concentración de 0,2 mg/ml.

3- Productos sometidos a ensayo y condiciones de tratamiento

45 Se utilizó limoneno ((R)-(+)-limoneno, PM=136,23, pureza=97%) de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia) y se almacenó siguiendo las instrucciones de Sigma-Fluka.

Se utilizó alcohol perílico ((S)-4-isopropenil-1-ciclohexilmetanol, (S)-p-menta-1,8-dien-7-ol, PM=152,23, pureza=98%) de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia) y se almacenó siguiendo las instrucciones de Sigma-Fluka.

50 Se prepararon limoneno y alcohol perílico en aceite de maíz extemporáneamente cada día de tratamiento.

55 El tratamiento tópico diario se inició 3 días antes de la inducción de la inflamación de la piel (=J₁) y se prolongó durante 7 días después de la inducción de la inflamación de la piel (=J₁₀). De J₄ a J₁₀, los productos sometidos a ensayo se aplicaron 30 minutos antes de la aplicación de TPA sobre la misma área de piel.

4- Muestreo del suero

60 Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de quetamina (Ketamine 1000, Virbac, Carros, Francia) y xilazina (Rompun al 2%, Bayer Healthcare, Kiel, Alemania) (2/3-1/3 v/v) a una dosis de 8 ml/kg. Se extrajo sangre (1 ml) por punción intracardiaca después del último tratamiento. Se almacenaron muestras de sangre a +4°C durante 20 a 30 minutos y después se centrifugó a 1.500 g durante 15 minutos. Se extrajeron muestras de suero, se congelaron a -20°C y se almacenaron a -80°C hasta la dosis de citocinas proinflamatorias.

5- Muestreo de piel

Se extrajeron muestras de piel dorsal, se fijaron y se almacenaron en formaldehído (Roti® - Histofix al 4%, Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) hasta el análisis histopatológico.

5 Los animales se sacrificaron mediante una dosis excesiva de anestesia tras los muestreos de sangre y de piel.

6- Dosis de citocinas proinflamatorias

10 Se midieron los niveles de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α simultáneamente por duplicado con el kit panel A 3-plex de ratón de Bio-Rad (ref. nº 171-F11080, Mames-la-Coquette, Francia) en las muestras de suero después de descongelarlas.

7- Estadística

15 Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido posiblemente de una prueba de Mann-Whitney para comparar las diferentes variables estudiadas de los grupos tratados mediante comparación de los grupos "Control" y "TPA+Control". Se fijó el umbral de significancia en $P < 0,05$.

20 Las estadísticas se llevaron a cabo con el software Statview 5 (SAS Institute Inc., USA).

Resultados

1- Progreso del peso de los animales

25 La figura 4 muestra el progreso del peso medio de los ratones de los 4 grupos durante el ensayo.

Entre J_{-1} y J_{10} , el peso medio de los ratones no mostró una diferencia significativa entre los diferentes grupos, sino una tendencia a la heterogeneidad ($H_{(ddl=3)}=6,73$, $p=0,081$).

2- Puntuaciones macroscópicas de inflamación de la piel

La figura 5 muestra las puntuaciones macroscópicas medias de inflamación de la piel.

35 Las puntuaciones macroscópicas medias de inflamación de la piel eran significativamente diferentes en los diferentes grupos ($H_{(ddl=3)}=19,83$, $p=0,0002$).

40 Las puntuaciones macroscópicas medias de inflamación de la piel de los grupos TPA+Control, TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente superiores a la del grupo de control ($z=3,00$, $p=0,0027$; $z=3,11$, $p=0,0019$; $z=3,14$, $p=0,0017$, respectivamente).

45 Las puntuaciones macroscópicas medias de inflamación de la piel de los grupos TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente inferiores a la del grupo TPA+Control ($z=2,62$, $p=0,0089$; $z=2,82$, $p=0,0049$, respectivamente).

La puntuación macroscópica media de inflamación de la piel del grupo TPA+Alcohol perílico era significativamente inferior a la del grupo TPA+Limoneno ($z=2,07$, $p=0,039$).

3- Análisis histopatológico de las muestras de piel

50 El análisis histopatológico de las muestras de piel extraídas de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento mostró los resultados siguientes:

- grupo de control: las pieles eran normales,
- 55 - grupo de TPA+Control: las pieles presentaban una apariencia claramente inflamatoria; mostraban lesiones de la piel inflamatorias no específicas con ulceración de la epidermis y con un infiltrado inflamatorio con frecuencia marcado,
- grupo de TPA+Limoneno: las pieles presentaban una apariencia inflamatoria; mostraban lesiones de la piel inflamatorias no específicas sin ulceración de la epidermis y con un infiltrado inflamatorio más o menos marcado,
- 60 - grupo de TPA+Alcohol perílico: las pieles presentaban una apariencia poco inflamatoria; mostraban lesiones de la piel inflamatorias no específicas sin ulceración de la epidermis y con un infiltrado inflamatorio raramente marcado.

4- Puntuaciones microscópicas de inflamación de la piel

La figura 6 muestra las puntuaciones microscópicas medias de inflamación de la piel de los diferentes grupos de tratamiento.

5 Las puntuaciones microscópicas medias de inflamación de la piel eran significativamente diferentes en los diferentes grupos ($H_{(ddl=3)}=17,49$, $p=0,0006$).

10 Las puntuaciones microscópicas medias de inflamación de la piel de los grupos TPA+Control, TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente superiores que la del grupo de control ($z=2,91$, $p=0,0036$ en todos los casos).

15 Las puntuaciones microscópicas medias de inflamación de la piel de los grupos TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente inferiores que la del grupo de TPA+Control ($z=2,10$, $p=0,036$; $z=2,49$, $p=0,013$, respectivamente).

Las puntuaciones microscópicas medias de inflamación de la piel de los grupos TPA+Alcohol perílico y TPA+Limoneno no eran significativamente diferentes ($z=0,97$, $p=0,33$).

20 **5- Dosificación de citocinas proinflamatorias**

5.1 IL-1 β

La figura 7 muestra los niveles séricos medios de IL-1 β de los diferentes grupos de tratamiento.

25 Los niveles séricos medios de IL-1 β de los diferentes grupos de tratamiento eran significativamente diferentes ($H_{(ddl=3)}=15,62$, $p=0,0014$) (Tabla 3).

30 Los niveles séricos medios de IL-1 β de los grupos de TPA+Control, TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente superiores a los del grupo de control ($z=3,08$, $p=0,0021$ en todos los casos).

El nivel sérico medio de IL-1 β del grupo de TPA+Alcohol perílico mostraba una tendencia a ser significativamente inferior al del grupo de TPA+Control ($z=1,92$, $p=0,055$).

35 No se demostró ninguna diferencia significativa entre los niveles séricos medios de IL-1 β de los grupos de TPA+Limoneno y de TPA+Alcohol perílico.

Tabla 3

40 Niveles séricos medios de IL-1 β (pg/ml) de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento (medias \pm ESM)

| Grupo | Control | TPA + Control | TPA + Limoneno | TPA + Alcohol perílico |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|------------------------|
| Niveles séricos de IL-1 β | 0,0 \pm 0,0 | 9,3 \pm 2,9 | 6,5 \pm 1,8 | 5,3 \pm 1,7 |

45 5.2 IL-6

La figura 8 muestra los niveles séricos medios de IL-6 de los diferentes grupos de tratamiento.

50 Los niveles séricos medios de IL-6 de los diferentes grupos de tratamiento eran significativamente diferentes ($H_{(ddl=3)}=16,42$, $p=0,0009$) (Tabla 4).

Los niveles séricos medios de IL-6 de los grupos de TPA+Control, TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente superiores al del grupo de control ($z=3,08$, $p=0,0021$ en todos los casos).

55 El nivel sérico medio de IL-6 del grupo de TPA+Alcohol perílico era significativamente inferior al del grupo de TPA+Control ($z=2,08$, $p=0,037$).

El nivel sérico medio de IL-6 del grupo de TPA+Limoneno mostraba una tendencia a ser significativamente inferior al del grupo de TPA+Control ($z=1,76$, $p=0,078$).

60 No se demostró ninguna diferencia significativa entre los niveles séricos medios de IL-6 de los grupos de TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico.

Tabla 4

Niveles séricos medios de IL-6 (pg/ml) de los diferentes grupos de tratamiento (medias ± ESM)

| Grupo | Control | TPA + Control | TPA + Limoneno | TPA + Alcohol perílico |
|-------------------------|-----------|---------------|----------------|------------------------|
| Niveles séricos de IL-6 | 0,0 ± 0,0 | 22,0 ± 5,5 | 15,3 ± 3,0 | 13,0 ± 3,8 |

5

5.3 TNF-α

La figura 9 muestra los niveles séricos medios de TNF-α de los diferentes grupos de tratamiento.

10 Los niveles séricos medios de TNF-α de los diferentes grupos de tratamiento eran significativamente diferentes ($H_{(ddl=3)}=17,08$, $p=0,0007$) (Tabla 5).

Los niveles séricos medios de TNF-α de los grupos de TPA+Control, TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico eran significativamente superiores al del grupo de control ($z=3,08$, $p=0,0021$ en todos los casos).

15

El nivel sérico medio de TNF-α del grupo de TPA+Alcohol perílico era significativamente inferior al del grupo de TPA+Control ($z=2,24$, $p=0,025$).

20

El nivel sérico medio de TNF-α del grupo de TPA+Limoneno mostró una tendencia que era significativamente inferior al del grupo de TPA+Control ($z=1,76$, $p=0,078$).

No se demostró ninguna diferencia significativa entre los niveles séricos medios de TNF-α de los grupos de TPA+Limoneno y TPA+Alcohol perílico.

25

Tabla 5

Niveles séricos medios de TNF-α (pg/ml) de los diferentes grupos de tratamiento (medias ± ESM)

| Grupo | Control | TPA + Control | TPA + Limoneno | TPA + Alcohol perílico |
|--------------------------|-----------|---------------|----------------|------------------------|
| Niveles séricos de TNF-α | 0,0 ± 0,0 | 131,9 ± 18,9 | 103,2 ± 18,0 | 80,6 ± 24,7 |

30 **6- Conclusión**

El limoneno y el alcohol perílico, administrados tópicamente en el tratamiento preventivo durante 3 días a una dosis de 10 mg/kg/día antes de la inducción de inflamación de la piel mostraron un efecto significativo sobre la inflamación de la piel, al reducir el grado de inflamación (puntuaciones macroscópica y microscópica) y al reducir la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6 y TNF-α).

35

Ejemplo 3: efectos del limoneno y del alcohol perílico sobre la cicatrización

Materiales y métodos

40

1- Animales

Se utilizaron 6 ratones sin pelo Skh-1 hembra con un peso medio de entre 20 y 25 g.

45

Se marcaron los 6 ratones y se dividieron en 3 grupos de 2:

- grupo de "control" = escarificación en cada flanco y tratamiento tópico diario durante 8 días con portador,
- grupo de "Limoneno" = escarificación en cada flanco y tratamiento tópico diario durante 8 días con limoneno 10 mg/kg/día,
- 50 - grupo de "Alcohol perílico" = escarificación en cada flanco y tratamiento tópico diario durante 8 días con alcohol perílico 10 mg/kg/día.

2- Escarificación

55

Se sometió cada ratón a escarificación de la piel en cada flanco.

3- Productos sometidos a ensayo y condiciones de tratamiento

Se utilizó limoneno ((R)-(+)-Limoneno, PM=136,23, pureza=97%) de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia) y se almacenó siguiendo las instrucciones de Sigma-Fluka.

5 Se utilizó alcohol perfílico ((S)-4-isopropenil-1-ciclohexenilmetanol; (S)-p-mentha-1,8-dien-7-ol, PM=152,23, pureza=98%) de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia) y se almacenó siguiendo las instrucciones de Sigma-Fluka.

Se preparó limoneno y alcohol perfílico en aceite de maíz extemporáneamente cada día de tratamiento.

10 El tratamiento tópico diario se inició 1 hora antes de la escarificación y se continuó durante 8 días después de la escarificación.

Resultados

15 Se llevaron a cabo observaciones y fotografías diariamente con el fin de realizar un seguimiento del proceso de cicatrización.

20 El proceso de cicatrización de heridas proporcionó mejores resultados con la aplicación tópica diaria de una solución en aceite de maíz de alcohol perfílico en comparación con limoneno y muchos mejores resultados en comparación con el aceite de maíz solo.

También se observaron menos marcas de cicatrización en los sitios de escarificación en la superficie de la piel y bajo la superficie de la misma.

25

Referencias

- Crowell PL *et al.*, "Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene", *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;35(1):31-7;
- 30 • Dong Y-L, Fleming RYD, Yan TZ, Herndon DN, Waymack JP. Effect of ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds. *Journal of Trauma.* 1993; 35(3):340-343;
- Dvivedi S, Tiwari SM, Sharma A. Effect of ibuprofen and diclofenac sodium on experimental wound healing. *Indian Journal of Experimental Biology.* 1997; 35(11):1243-1245;
- Hardcastle IR *et al.*, "Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene", *Biochem Pharmacol.* 1999 Apr 1;57(7):801-9;
- 35 • Kulick MI, Smith S, Hadler K. Oral ibuprofen: evaluation of its effect on peritendinous adhesions and the breaking strength of a tenorrhaphy. *Journal of Hand Surgery.* 1986; 11(1):110-120;
- Kumar A, Rao M, Kulkarni DR. Zinc incorporation reverses suppressant effect of ibuprofen on wound healing. *Indian Journal of Experimental Biology.* 1988; 26(6):483-485.
- Lee KH. Studies on the mechanism of action of salicylate. II. Retardation of wound healing by aspirin. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1968; 57(6):1042-1043;
- 40 • Rao CM, Kumar A, Kulkarni DR., Effects of enfenamic acid and its zinc salt on wound-healing. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology.* 1988; 32(1):61-66;
- Stanley P.L., Steiner S., Havens M., Tramposch K.M., *Skin Pharmacol.*, 4:262-271, 1991;
- 45 • Vigushin DM *et al.*, « Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee", *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42(2):111-7;

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización no terapéutica cosmética de un monoterpeno para incrementar la reparación del tejido de la piel o mucosa en un individuo, en la que dicho monoterpeno es el alcohol perílico y se utiliza para incrementar la reparación de un defecto de la piel, siendo dicho defecto de la piel seleccionado de entre el grupo que consiste en celulitis, cicatrices, senescencia prematura de la piel inducida por el sol y los rayos UV, defectos antiestéticos de la piel debidos al proceso de envejecimiento, incluyendo cicatrices y manchas, arrugas y rasgos escamosos, marcas de estiramiento, marcas de envejecimiento, senescencia prematura de la piel inducida por el sol y los rayos UV y consecuencias antiestéticas de recaídas postraumáticas.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, para incrementar la regeneración de los tejidos biológicos.
3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, siendo dicho individuo un ser humano.
- 15 4. Monoterpeno para la utilización en la prevención o el tratamiento de una lesión de tejidos biológicos en un individuo, en el que dicho monoterpeno es alcohol perílico, siendo seleccionada dicha lesión de tejidos de entre el grupo que consiste en quemaduras, cortes, recaídas de condiciones meteorológicas extremas, incluyendo frío o calor excesivo, y recaídas y heridas por quemadura.
- 20 5. Monoterpeno para la utilización para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de la piel en un individuo, en el que dicho monoterpeno induce la reparación de los tejidos, siendo dicho monoterpeno el alcohol perílico, y en el que dicha enfermedad de los tejidos es una enfermedad de la piel seleccionada de entre el grupo que consiste en dermatitis atópica, queratitis seborreica, epidermólisis ampollosa adquirida, psoriasis, alteraciones de la piel en el lupus eritematoso, dermatomiositis, escleroderma, acné crónico, celulitis crónica, pruritus y formación anormal o defectuosa de cicatrices en la diabetes.
- 25 6. Monoterpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que dicho monoterpeno se administra tópicamente.
- 30 7. Monoterpeno para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, siendo dicho individuo un ser humano.

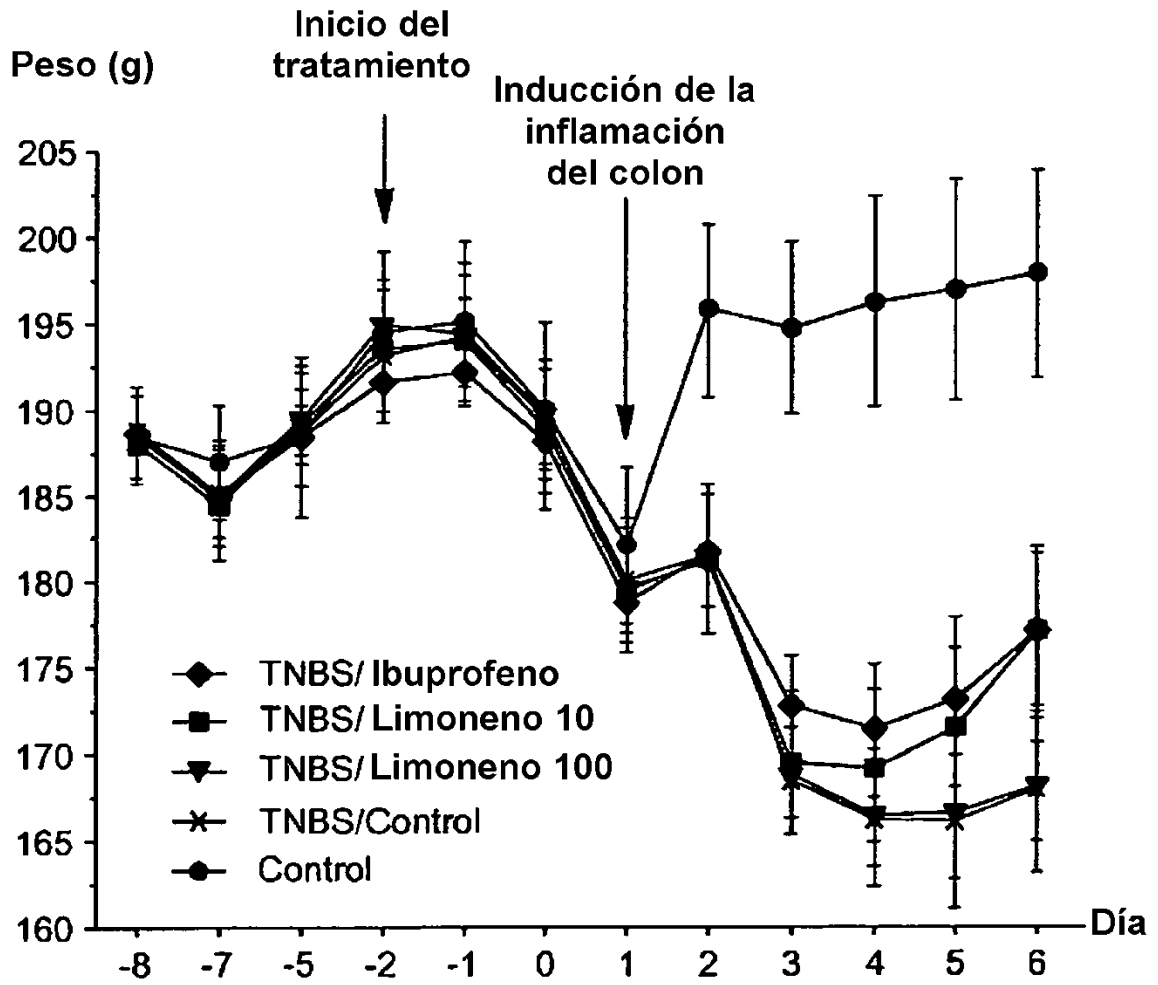


FIG.1

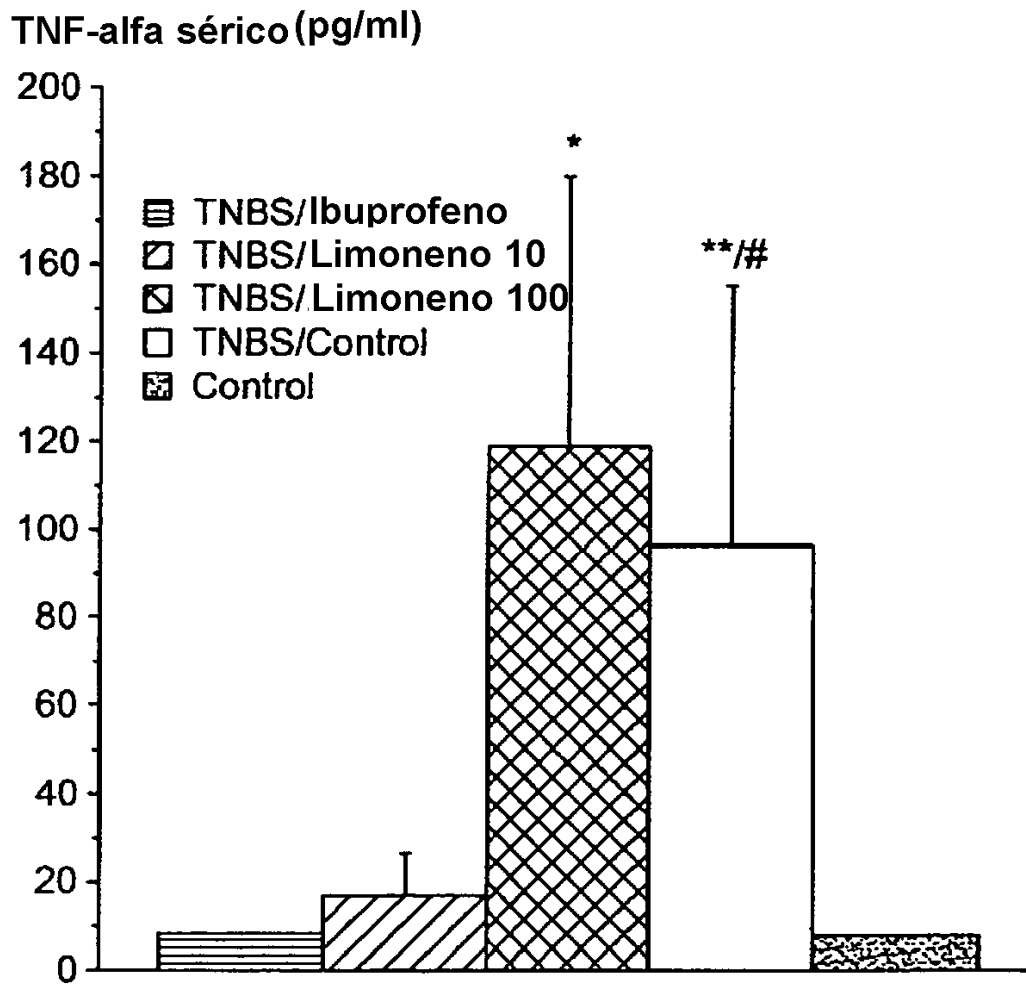


FIG.2

Puntuación macroscópica del colon

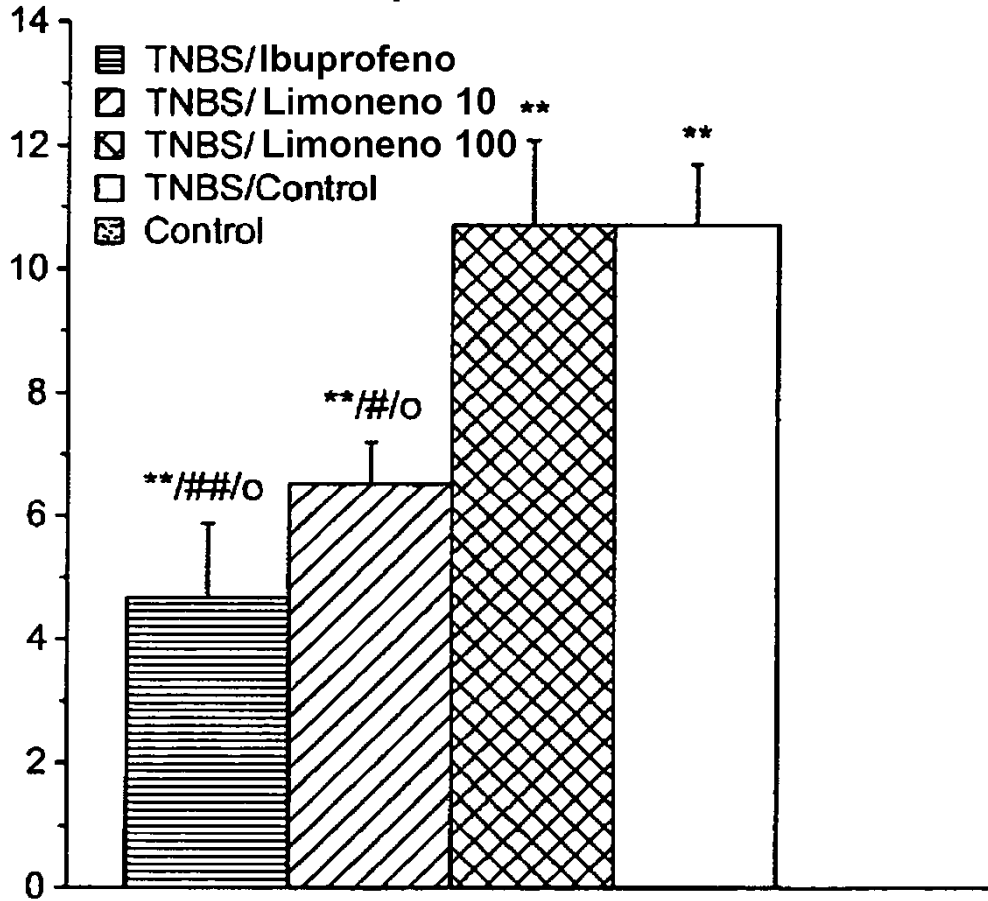


FIG.3

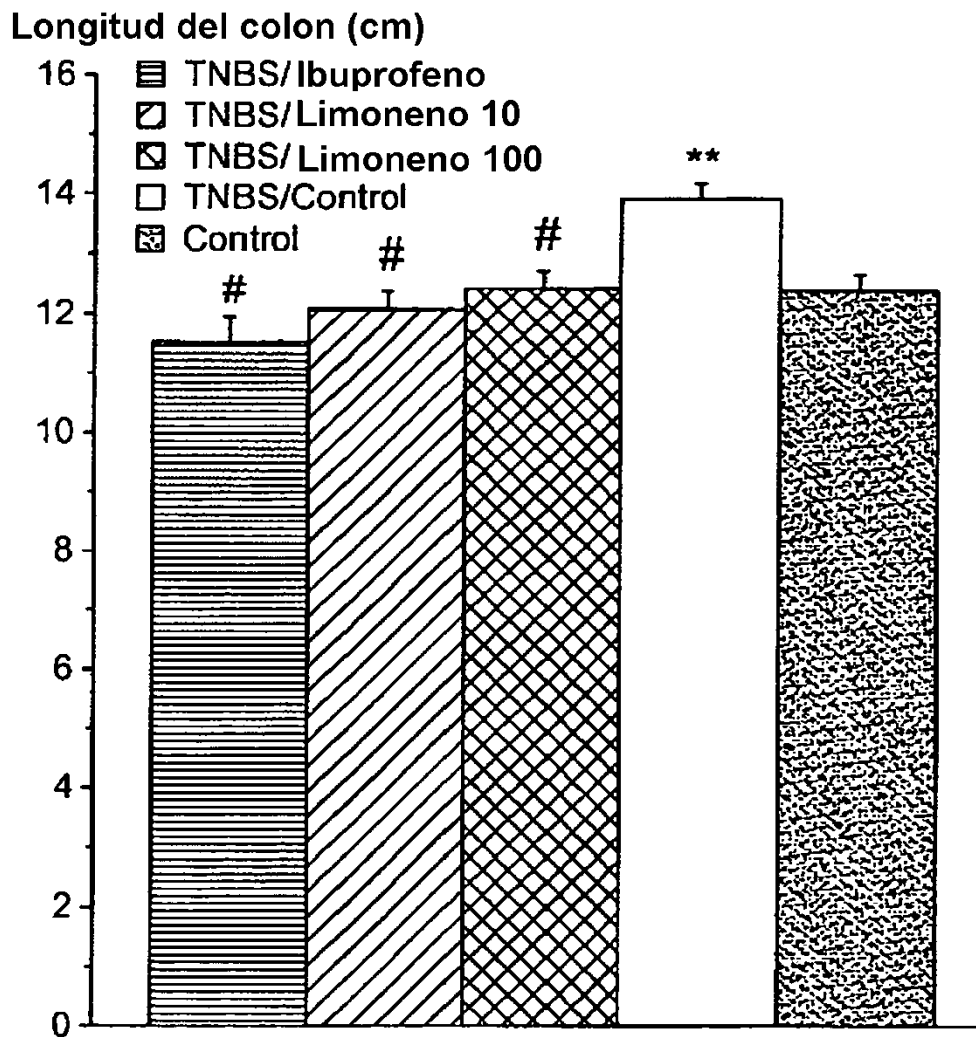


FIG.4

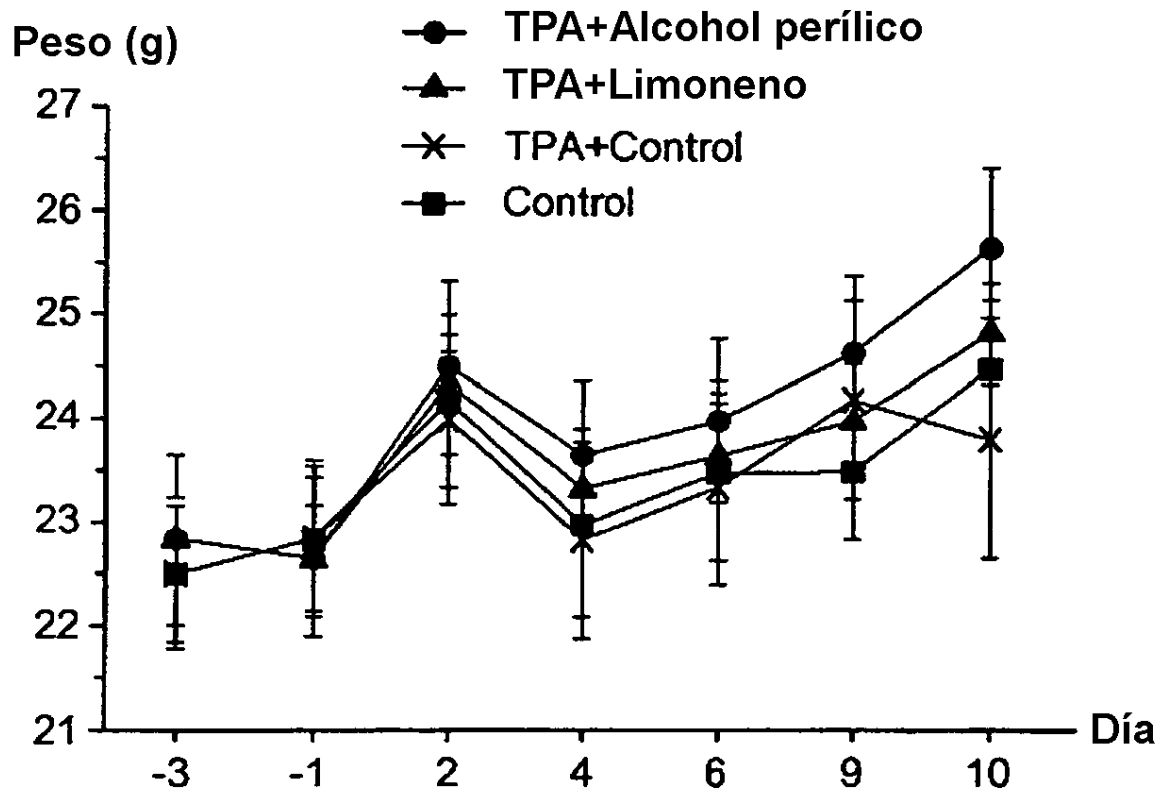


FIG.5

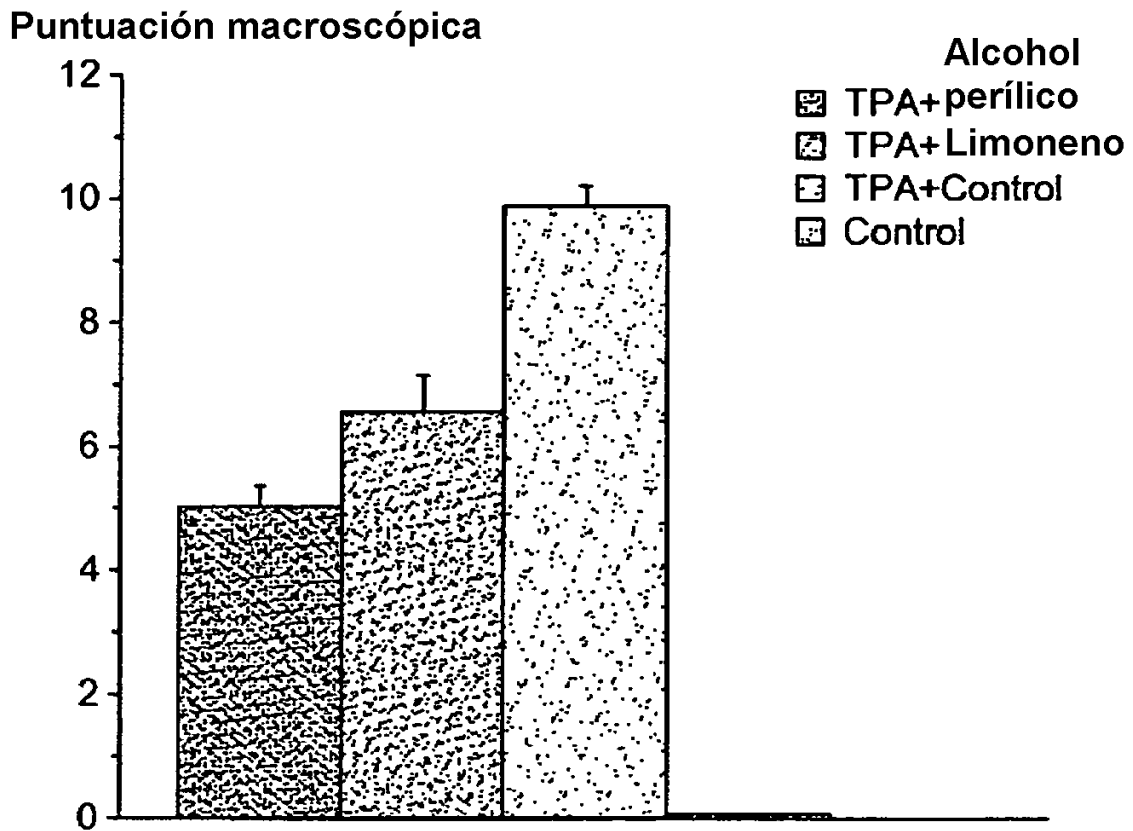


FIG.6

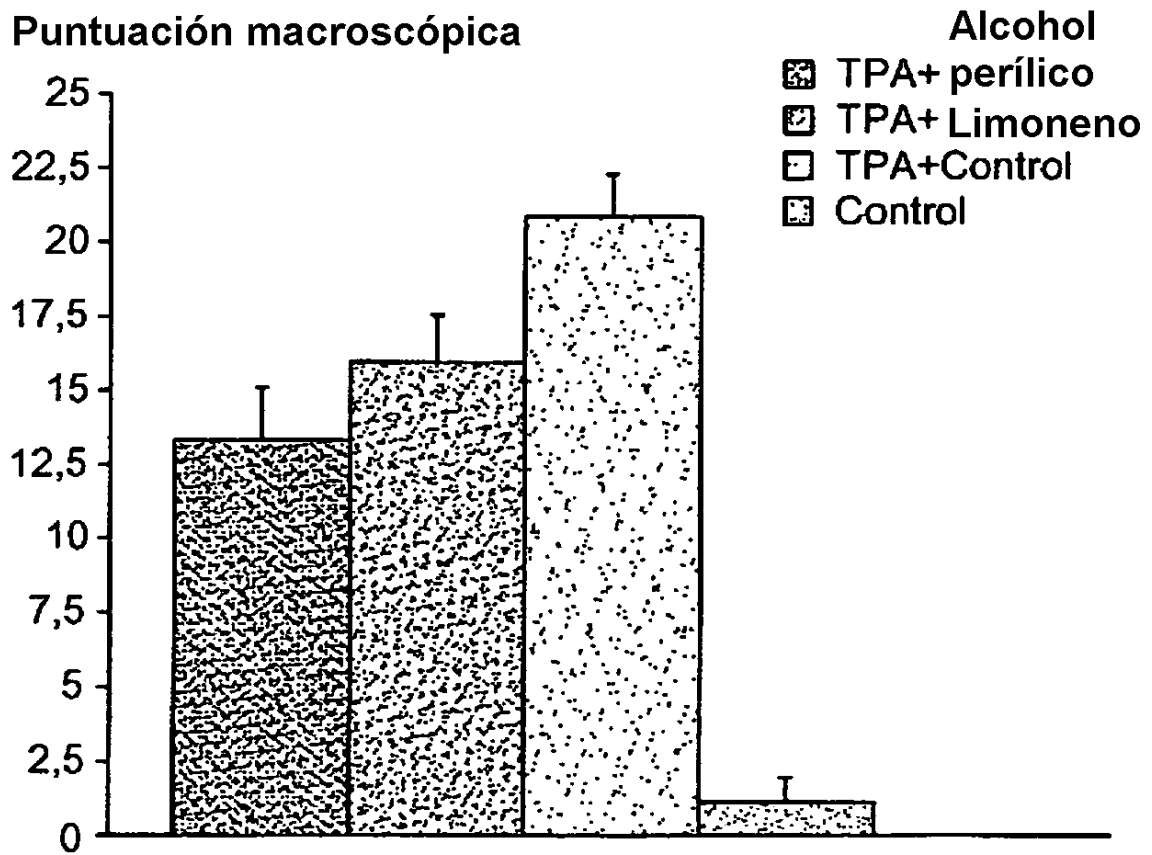


FIG.7

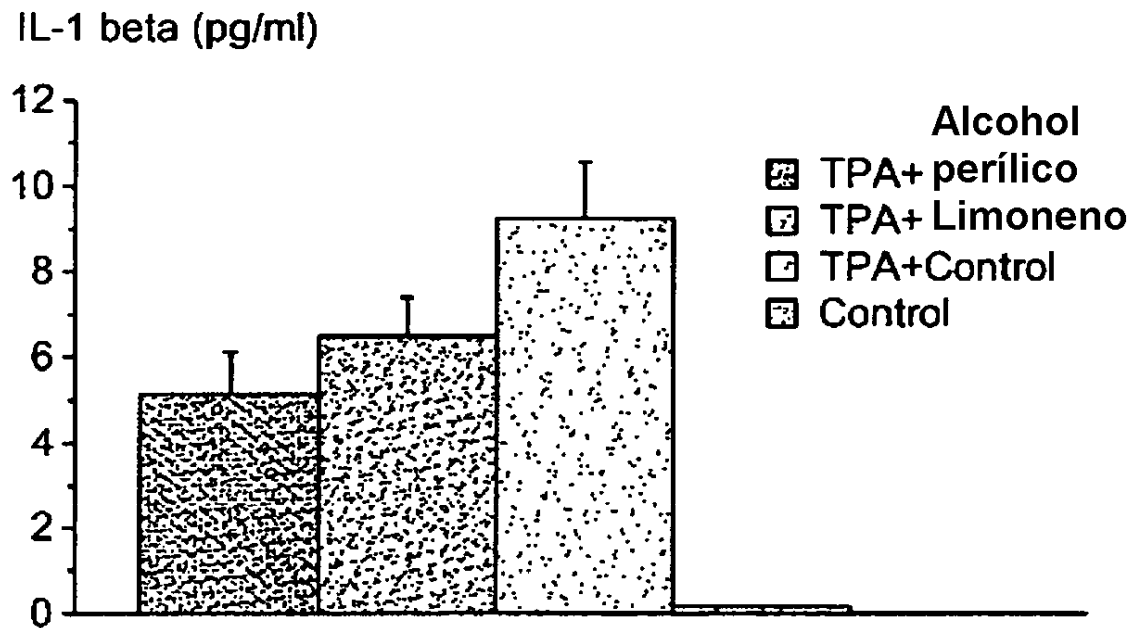


FIG.8

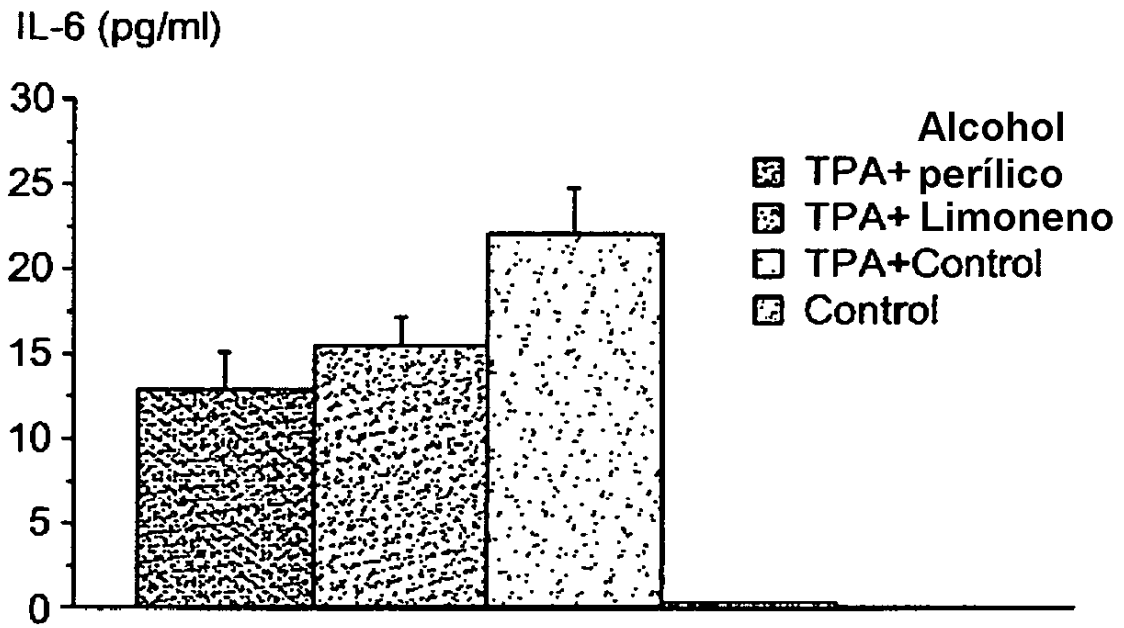


FIG.9

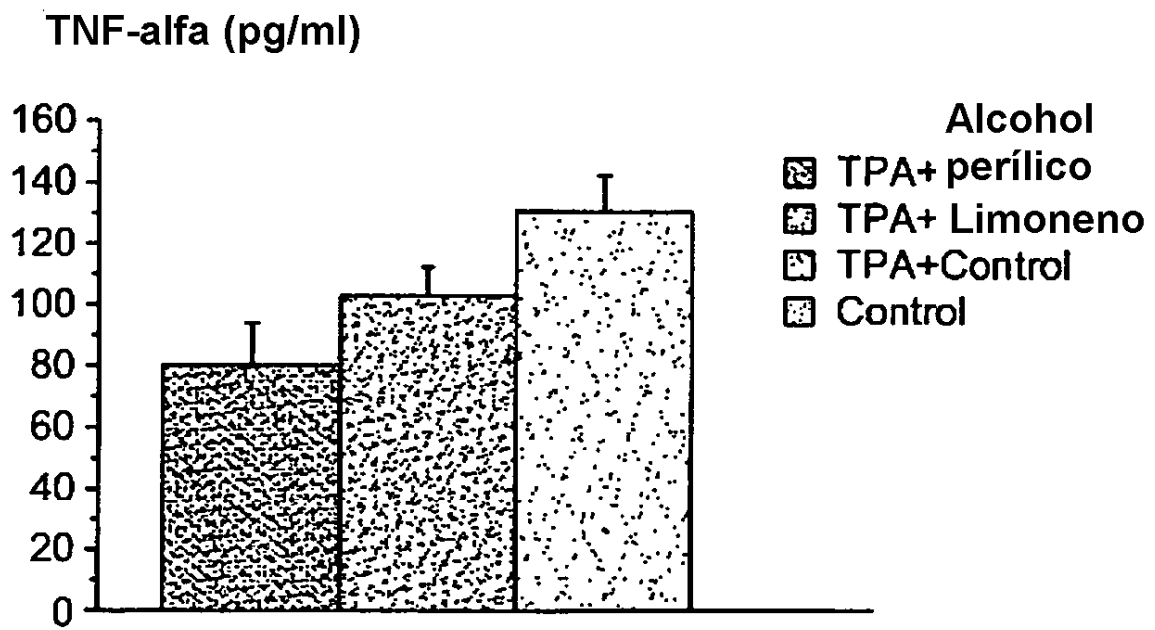


FIG.10