

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 690**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 36/54** (2006.01)  
**A61K 36/53** (2006.01)  
**A61P 17/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2007.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61K 31/045** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2011 PCT/FR2011/050410**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104489**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011 E 11713497 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2538932**

54 Título: **Utilización de aceite esencial de orégano o de palo de rosa para el tratamiento de queratosis actínicas**

30 Prioridad:

**26.03.2010 US 282752 P**  
**26.02.2010 FR 1000801**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2018**

73 Titular/es:

**L'ORÉAL (33.3%)**  
**14, rue Royale**  
**75008 Paris, FR;**  
**INSTITUT CURIE (33.3%) y**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MARROT, LAURENT y**  
**SOEUR, JÉRÉMIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 658 690 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 de aceite esencial de orégano o de palo de rosa para el tratamiento de queratosis actínicas

5 La presente invención se encuentra en el ámbito de la prevención y del tratamiento dirigido de las queratosis actínicas.

También se admite que exposiciones solares crónicas inducen lesiones dermatológicas de tipos queratosis actínicas y un fotoenvejecimiento de la piel (Ortonne, J. P. 2002).

10 En el plano dermatológico, las queratosis aparecen como zonas de displasia epitelial que se encuentran en las regiones del cuerpo frecuentemente expuestas al sol, y están asociadas al fotoenvejecimiento. La mayoría de estas queratosis, revierten espontáneamente (Ortonne, J. P. 2002). Además, las queratosis tienen un aspecto antiestético que puede llevar a los sujetos afectados a demandar su tratamiento con vistas a su eliminación, por una preocupación estética.

15 En la piel, se ha mostrado que las queratosis actínicas estaban constituidas a menudo por queratinocitos portadores de mutación en el gen p53 (Taguchi, M. et al. 1994). El gen que codifica la proteína p53 es dañado habitualmente por los UV y, en ciertos casos, experimenta mutaciones, concretamente mutaciones de CC a TT. Las células mutadas de este modo pueden perder la respuesta específica a los UV controlada por la proteína p53: la reparación es entonces menos eficaz y la presencia de daños al ADN ya no conlleva parada de la proliferación: la replicación puede desarrollarse en presencia de lesiones, aumentando de este modo el riesgo de errores (mutaciones) y conllevando, con el tiempo, una fuerte inestabilidad genética. Como las células mutadas entran menos fácilmente en el proceso de apoptosis, terminan por manifestar una ventaja de crecimiento con respecto a las células normales.

20 Este proceso de expansión clonal de células anormales crea parches precancerosos en los órganos afectados.

30 Para estudiar estos mecanismos, es posible utilizar queratinocitos que portan mutaciones en el gen p53. Éste es el caso de la línea HaCat que fue descrita inicialmente por Fusenig et al. (Fusenig, N. E. et al. 1998) y que hoy en día se emplea muy frecuentemente en diferentes laboratorios de investigación en dermatología. De este modo por ejemplo, células HaCat se integraron en un modelo organotípico de piel en presencia de queratinocitos normales: en dicho sistema, fue posible imitar los efectos promotores de la exposición solar, demostrando la capacidad de los UVB para estimular la expansión clonal de las células HaCat (Mudgil, A. V. et al. 2003) mutadas en p53. Más recientemente, se ha notificado que células HaCat expuestas a los UVA y reimplantadas en ratones podían estar en el origen de tumores cutáneos (Wischermann, K. et al. 2008). Existe, por lo tanto, una necesidad de productos que inducen una citotoxicidad significativamente más intensa en células HaCat con respecto a queratinocitos humanos normales (o a líneas queratinocíticas no mutadas en p53) serían potencialmente capaces de tratar las queratosis actínicas. Es por esta razón que los trabajos descritos a continuación consistieron en comparar y comprender el efecto citotóxico de aceites esenciales sobre queratinocitos humanos normales, sobre queratinocitos HaCat (portadores de una mutación en p53) y sobre queratinocitos inmortalizados derivados de carcinoma.

40 La inducción de una muerte celular por apoptosis, preferentemente en células que presentan trastornos de proliferación y de diferenciación, al tiempo que conservan la integridad de las células sanas constituiría un tratamiento eficaz contra las lesiones de tipo queratosis actínicas.

45 La apoptosis es un proceso complejo que puede tener diversos orígenes, pero hoy en día se ha establecido que la mitocondria desempeña en ella un papel importante. Diferentes señales moleculares, como por ejemplo el equilibrio Bcl2/Bax con el posible concurso de p53, son capaces de modificar la permeabilidad de la membrana mitocondrial y de favorecer la liberación de citocromo C en el citosol. Este proceso puede iniciar la activación de la vía de las caspasas, enzimas a cargo de la degradación de ciertos compuestos intracelulares, que conduce de forma irreversible a la apoptosis (Gogvadze et al., 2008). Por otro lado, también se ha demostrado que la permeabilización de la membrana mitocondrial permitía el vertido de diferentes moléculas mitocondriales pro-oxidantes en el citosol, que permiten la inducción de la apoptosis.

55 Los aceites esenciales (AE) y sus productos derivados, gozan actualmente de un éxito importante entre los consumidores. Esta predilección específicamente por los productos de origen natural (agroalimentaria, cosmetología, farmacología...) o derivados del concepto de "lo natural", es la consecuencia de una demanda general de productos derivados de una producción de tipo desarrollo sostenible (química verde, agricultura biológica). Este interés por "lo natural" y sus productos de medicina alternativa (aromaterapia, fitoterapia) también encuentra su origen en las limitaciones que presentan los tratamientos de la medicina convencional (resistencias virales, bacterianas, tratamiento contra el cáncer...). La ausencia de efectos secundarios demasiado importantes, en el marco de tratamientos aromaterapéuticos bien enmarcados y razonados es una baza fundamental para la utilización de los aceites esenciales.

65 Los aceites esenciales son productos volátiles complejos que poseen un olor potente, característico de la parte de la planta utilizada para su fabricación. De aproximadamente 800.000 especies vegetales catalogadas, solamente las

plantas aromáticas se utilizan para la obtención de aceites esenciales. Se trata de plantas que poseen suficientes células que sintetizan y que secretan estas moléculas aromáticas, es decir aproximadamente 3000 plantas de interés biológico. Aproximadamente 300 aceites esenciales representan la mayor parte de los aceites esenciales comercializados.

5 Los aceites esenciales corresponden a una mezcla compleja de metabolitos secundarios (moléculas no esenciales para la supervivencia de la planta) sintetizados y secretados por órganos especializados: los pelos glandulares epidérmicos, las bolsas y canales glandulares (esquizógenos o esquizolisígenos). Estos metabolitos secundarios están representados por una muy grande diversidad de moléculas químicas. Las más habituales son los terpenos  
10 (mono-, sesqui y diterpeno: C10, C15 y C20 respectivamente) y otras moléculas aromáticas (moléculas cíclicas).

Todas las funciones químicas están presentes en los aceites esenciales: aldehídos, cetonas, alcoholes, peróxidos, lactonas, éteres, ésteres...

15 Los aceites esenciales se obtienen después de la hidrodestilación del material vegetal de la planta aromática. Hoy en día se utilizan diferentes métodos de extracción, entre los cuales se pueden mencionar la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y la extracción con disolventes.

20 Los aceites esenciales poseen un potencial cosmético y terapéutico reconocido, y se utilizan principalmente por sus actividades bactericidas, virucidas, antioxidantes, antiinflamatorias, pero también por su carácter odorante, susceptible de generar una sensación de bienestar. Son posibles varios modos de utilización de los aceites esenciales: inhalación, ingestión o aplicación cutánea. Los aceites esenciales puros no se aplican casi nunca directamente sobre la piel, ya que a menudo son irritantes, sino diluidos en otros aceites vegetales (aceite de oliva, de girasol...). Se realiza una aplicación cutánea en el marco de masajes, de tratamientos locales (infecciones) o  
25 incluso durante la utilización de perfumes (constituyentes principales).

Además de sus intereses cosméticos, los aceites esenciales se utilizan también en el marco de ciertos tratamientos antibióticos, por su capacidad para aumentar su eficacia, o incluso para luchar contra infecciones de las vías respiratorias. De la misma forma, una proporción no despreciable (aproximadamente el 35 %) de los pacientes europeos aquejados de cáncer, cuyos tratamientos convencionales no fueron capaces de lograr la curación, recurrieron a métodos complementarios y alternativos a la medicina convencional (Molassiotis, A. et al. 2005), como la aromaterapia. Ciertos estudios demuestran propiedades anticancerosas y/o antiproliferativas de los aceites esenciales frente a ciertas líneas cancerosas. De este modo, trabajos recientes demostraron actividades potencialmente anticarcinógenas o antiproliferativas de ciertos aceites esenciales sobre líneas de células leucémicas (Kumar, A. et al. 2008), (Verma, M. et al. 2008), líneas de cáncer del colon (Sharma, P. R. et al. 2008), células de  
30 cáncer de mama (Díaz, C. et al. 2008), células de melanoma (Loizzo, M. R. et al. 2008).

Otros trabajos mostraron también una actividad antiproliferativa de ciertos compuestos aislados de los aceites esenciales, como alfa santalol sobre una línea de carcinoma epidermoide (Kaur, M et al. 2005), o incluso la del terpinene-4-ol del aceite esencial de árbol del té sobre células de melanomas (Calabrini, A. et al. 2004).  
40

En lo que respecta a los queratinocitos, se ha estudiado la citotoxicidad de ciertos AE frente a la línea queratinocítica HaCat mutada en p53 (Koba K. et al. 2009) o a la línea queratinocítica SVK14 (Itharat, A. et al. 2004).

45 En el foro de internet "Skin Cancer Forum - wild oregano oil- skin cancer testimonials" ([http://www.topicalinfo.org/forum/topic.asp?TOPIC\\_ID=308](http://www.topicalinfo.org/forum/topic.asp?TOPIC_ID=308)), un internauta anónimo divulga el tratamiento de una lesión que se supone que es un cáncer basocelular con aceite esencial de orégano silvestre. En el sitio de internet publicitario de los productos Hedd Wyn Essentials, un internauta indica un pretendido efecto terapéutico de un aceite esencial de orégano sobre un cáncer de tipo SCC. No se divulga si este cáncer se deriva de una queratosis, ni si las  
50 células están mutadas en p53.

La invención se refiere a una composición que comprende un aceite esencial extraído de plantas de la especie *Origanum compactum*, para una utilización en un ser humano en el tratamiento dirigido de queratosis actínicas desprovistas de células tumorales, caracterizándose dichas queratosis por células portadoras de mutaciones en el  
55 gen p53.

La invención se refiere, más particularmente, al aceite esencial extraído de las diferentes partes (raíces, tallos, corteza, hojas) de plantas de *Origanum compactum*.

60 En efecto, de forma sorprendente, los inventores de la presente invención demostraron que aceites esenciales de composiciones moleculares muy diferentes, a saber el aceite esencial de orégano compacto (*Origanum compactum*, familia de las Lamiáceas) y el aceite esencial de palo de rosa (*Aniba rosaeodora*, familia de las Lauráceas), pueden inducir la muerte celular por apoptosis de forma dirigida en queratinocitos humanos cancerosos precancerosos (mutados en p53) con respecto a los queratinocitos normales.

Al ser las composiciones de estos dos aceites esenciales muy diferentes desde un punto de vista químico, y también de los constituyentes mayoritarios, los efectos obtenidos para estos dos aceites esenciales pueden considerarse, por lo tanto, como representativos de los efectos obtenidos con cualquier aceite esencial o sus constituyentes.

5 El tratamiento tiene la ventaja, además, de no generar inflamación, no siendo la apoptosis un proceso proinflamatorio.

10 La invención se refiere, más específicamente, a diferentes composiciones que comprenden un aceite esencial de *Origanum compactum* en la prevención o el tratamiento de las queratosis actínicas, preferentemente para ser humano.

15 En el marco de la invención, las queratosis a tratar son benignas, desprovistas de células tumorales concretamente no están en fase de transformación. En esta situación en efecto, un médico no recomendaría la escisión de las queratosis por razones terapéuticas, dado el importante porcentaje de queratosis que desaparecen de forma natural con el tiempo, sin entrar en fase de transformación. Las queratosis consideradas son, preferentemente, de pequeño tamaño, y no presentan ningún peligro de cancerización a corto o medio plazo.

20 Por queratosis (o queratodermia o hiperqueratosis) se entiende una hiperplasia de la capa córnea (*Stratum corneum*) epidérmica. Por queratosis actínica o queratosis solar, se hace referencia a una queratosis inducida por la exposición a la radiación solar. En el marco de la presente invención, las queratosis son queratosis actínicas. Por queratosis se entiende lesiones desprovistas de células tumorales.

25 Las queratosis y las queratosis actínicas consideradas pueden estar constituidas por o comprender mayoritariamente des células mutadas en p53.

Debido a su aspecto antiestético, existe en efecto una fuerte necesidad de prevención y/o de tratamiento de las queratosis, por razones únicamente cosméticas y no terapéuticas.

30 De acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un aceite esencial de *Origanum compactum*, para una aplicación cosmética en la prevención o el tratamiento de queratosis. Las queratosis consideradas están concretamente desprovistas de células tumorales.

35 Por prevención de las queratosis, se entiende concretamente la obtención de un efecto preventivo tal que las queratosis no se desarrollen, o que las ya existentes no se desarrollen más.

Por tratamiento de las queratosis, se entiende concretamente un efecto tal que las queratosis ya existentes, detengan su crecimiento y reviertan, incluso desaparezcan totalmente.

40 La prevención o el tratamiento de las queratosis son particularmente apropiados en el caso de pieles que hayan estado sometidas a fuertes exposiciones a los UV o exposiciones repetidas a los UV. En dicha aplicación, la presente invención prevé concretamente la utilización como cuidado para después del sol. La prevención también puede referirse a la aplicación sobre pieles antes de una exposición solar, concretamente antes de fuertes exposiciones, para prevenir el desarrollo de queratosis, después de la verificación previa, sin embargo, de la no fototoxicidad de las composiciones o aceites esenciales utilizados. La prevención o el tratamiento de las queratosis, en una aplicación cosmética de acuerdo con la invención, es también particularmente apropiado en el caso de queratosis en fase de desarrollo, es decir que las queratosis están ya presentes en la piel y que crecen. En dicha aplicación, la utilización de acuerdo con la invención permite detener el crecimiento de las queratosis y reducir su tamaño, hasta la completa desaparición finalmente.

50 Una de las ventajas principales de las aplicaciones cosméticas descritas, reside en la acción dirigida de los aceites esenciales. En efecto, el aceite esencial presenta, en una ventana de concentración, una acción dirigida contra células precancerosas (mutadas en p53 que imitan a células derivadas de queratosis actínica), que pueden ser hiperproliferativas; las células normales resultan, a su vez, poco afectadas por la citotoxicidad. Es posible, por lo tanto, tratar el conjunto de la piel de un individuo sin ningún efecto perjudicial para los queratinocitos normales. Esta cualidad es particularmente apreciable en el marco de una aplicación cosmética. Debe observarse que los inventores son, en efecto, los primeros en haber realizado un estudio comparado de los impactos de los aceites esenciales sobre queratinocitos mutados en p53 y sobre queratinocitos normales. No se había obtenido ningún dato relativo a dicha comparación de citotoxicidad antes de la presente invención. La acción dirigida de los aceites esenciales y de sus constituyentes no había sido, por lo tanto, puesta de relieve nunca antes de la invención. En vista de lo anterior, la presente invención permite, por lo tanto, una prevención o un tratamiento dirigido de las queratosis portadoras de mutaciones en el gen p53, es decir una toxicidad menor de este tratamiento frente a células normales, concretamente queratinocitos normales, que rodean a la queratosis.

65 Por citotoxicidad dirigida en el sentido de la invención, se entiende que la propiedad de citotoxicidad se induce preferentemente en las células hiperproliferativas y/o mutadas en p53 (por ejemplo HaCat y A431) con respecto a las células no hiperproliferativas, no mutadas en p53 (por ejemplo HEK001 y NHEK894), es decir que los índices de

toxicidad son al menos 1,5 veces más elevados en las células mutadas que en las células no mutadas, preferentemente al menos 2 veces más elevados. Preferentemente, la viabilidad de las células no hiperproliferativas, no mutadas sigue siendo del orden del 40 % al menos, incluso del 50 %, preferentemente del 60 %. Los inventores han puesto de manifiesto, en efecto, la existencia de intervalos de concentraciones a las que podía obtenerse dicha citotoxicidad dirigida, respetando las células sanas.

Debido a la acción dirigida del aceite esencial de *Origanum compactum*, las composiciones para el tratamiento cosmético preventivo de acuerdo con la invención no son peligrosas para las células sanas no mutadas en p53. Por consiguiente, el tratamiento puede repetirse, por ejemplo, antes o después de cada exposición al sol.

En las composiciones de acuerdo con la presente invención, el aceite esencial considerado constituye el principio activo de la composición, o uno de los principios activos, debido a que los inventores pusieron de manifiesto la citotoxicidad dirigida del aceite esencial de *Origanum compactum* contra queratinocitos mutados representativos de queratinocitos derivados de queratosis. De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, el aceite esencial contiene al menos uno de los constituyentes de los aceites esenciales de *Origanum compactum* o de *Aniba rosaeodora*, preferentemente ésta comprende al menos el 10 %, o al menos el 15 o el 20 % en masa de linalol, de carvacrol o de timol. Preferentemente se trata de una composición que comprende un aceite esencial o una mezcla de aceites, tal que el aceite esencial o la mezcla comprende dichas proporciones de linalol, de carvacrol o de timol. La divulgación también se refiere a composiciones en las que dichos porcentajes corresponden a porcentajes cromatográficos.

En efecto, en la sección experimental, se estudió más particularmente la citotoxicidad de dos aceites esenciales, el aceite esencial de orégano compacto (*Origanum compactum*, familia de las Lamiáceas) y el aceite esencial de palo de rosa (*Aniba rosaeodora*, familia de las Lauráceas), sobre células epidérmicas humanas: la línea queratinocítica HaCat (mutada en p53 e inmortalizada espontáneamente), la línea A431 (derivada de un carcinoma espinocelular, mutada en p53) así como sobre queratinocitos epidérmicos primarios normales humanos.

El aceite esencial de orégano compacto se compone mayoritariamente de dos monofenoles (terpenoides): timol y carvacrol. Este aceite esencial está recomendado en el marco de tratamiento de colitis, de trastornos pulmonares.

Este aceite permite luchar contra la fatiga pero es, sobre todo, un potente bactericida de amplio espectro.

El aceite esencial de palo de rosa se compone en un 80 % de linalol. Sus propiedades se utilizan para tratar las pieles irritadas, fatigadas y arrugadas. También es antiinfeccioso (menos potente que el aceite esencial de orégano), inmunoestimulante y tiende a mejorar los comportamientos depresivos. Es muy poco irritante y poco tóxico.

La presente invención se refiere, preferentemente, a composiciones que contienen aceite esencial de *Origanum compactum*.

Aunque la actividad citotóxica de un constituyente aislado sea menor que la de un aceite esencial completo, de acuerdo con otra realización de la divulgación, la utilización se refiere, más específicamente, a al menos un constituyente de un aceite esencial, preferentemente al menos uno de los constituyentes de los aceites esenciales de *Origanum compactum* o de *Aniba rosaeodora*.

Los diferentes constituyentes de los aceites esenciales son bien conocidos por el experto en la materia y pueden obtenerse de las compañías que comercializan dichos aceites esenciales. En lo que respecta a los aceites esenciales de *Origanum compactum* y de *Aniba rosaeodora*, el ejemplo 1 de la presente solicitud proporciona una caracterización analítica de los diferentes constituyentes detectados.

Se prefiere más particularmente, en el marco de la presente divulgación, que el constituyente de un aceite esencial, del que se hace uso no sea el óxido de linalol, incluso preferentemente, no sea un óxido.

Preferentemente, el componente utilizado es un alcohol o un fenol, de manera más particularmente preferida un terpenol o alcohol terpénico, tal como linalol, terpineol, nerol, geraniol, citronelol, o mentanol, o un terpenoide tal como citral, mentol, carvacrol o timol, otros terpenos también previstos son P-cimeno, terpineno, mirceno y beta cariofileno. Son constituyentes más particularmente preferidos linalol, carvacrol y timol.

De acuerdo con otros aspectos de las utilidades cosméticas tal como se han descrito anteriormente, el constituyente se selecciona entre 1,8-cineol, terpinoleno, linalol, alfa-terpineol, geraniol, alfa-copaeno, alfa y beta-selineno, benzoato de bencilo, alfa-tujeno, alfa pineno, mirceno, alfa-felandreno, alfa-terpineno, paracimeno, beta-felandreno, gamma-terpineno, timol, carvacrol y beta-cariofileno. Se trata, en efecto, de los constituyentes de uno u otro de los dos aceites esenciales de orégano y de palo de rosa, cuya proporción en la parte volátil del aceite es superior al 0,5 % (en porcentajes cromatográficos).

De acuerdo con otro aspecto de las aplicaciones cosméticas, se hace uso de un aceite esencial que comprende al menos el 0,5 % en masa o en porcentajes cromatográficos, preferentemente al menos el 1 %, incluso el 5 %, de al

menos uno de los siguientes componentes: 1,8-cineol, terpinoleno, linalol, alfa-terpineol, geraniol, alfa-copaeno, alfa y beta-selineno, benzoato de bencilo, alfa-tujeno, alfa pineno, mirceno, alfa-felandreno, alfa-terpineno, paracimeno, beta-felandreno, gamma-terpineno, timol, carvacrol y beta-cariofileno. Preferentemente, se trata de un porcentaje cromatográfico, que se aplica a la parte volátil del aceite esencial.

De manera preferida, se hace uso en las composiciones de la invención, de al menos un constituyente de aceite esencial seleccionado entre los siguientes componentes: linalol, timol y carvacrol. Se trata en efecto, para linalol, del compuesto mayoritario del aceite esencial de palo de rosa, y para timol y carvacrol, de los dos compuestos mayoritarios del aceite esencial de orégano.

De acuerdo con una realización, la divulgación también se refiere a la utilización de un aceite esencial que tiene al menos uno de los siguientes constituyentes: linalol, timol y carvacrol. Preferentemente, al menos uno de estos componentes está presente en una proporción superior al 0,5 %, preferentemente superior al 1 %, 5 % incluso 10 %, 15 % o 20 % en masa. Como alternativa, puede tratarse de porcentajes cromatográficos. Dicho aceite esencial es, por ejemplo, el aceite esencial de tomillo, de serpol o de ajedrea (proporción importante de timol o carvacrol) o el aceite esencial de albahaca, de tomillo (con linalol, *Thymus vulgaris linaloliferum*), de lavanda o de palo de Shiu (también llamado palo de Hô).

La presente divulgación se refiere, más particularmente, a la utilización cosmética de composiciones que comprenden al menos el 10 %, preferentemente al menos el 15 % o al menos el 20 % de uno de los siguientes constituyentes: linalol, carvacrol y timol. Otras composiciones también previstas son tales que el contenido acumulado de linalol, carvacrol y timol es superior al 10 %, preferentemente superior al 15 %, incluso superior al 20 % en masa. Como alternativa, puede tratarse de porcentajes cromatográficos.

De acuerdo con otra realización de la divulgación, el componente del que se hace uso en las aplicaciones cosméticas, se selecciona entre alfa pineno, canfeno, mirceno, alfa terpineno, paracimeno, trans-ocimeno, gamma-terpineno, linalol, terpinen-4-ol, beta-cariofileno, alfa-humuleno y óxido de cariofileno. Se trata, en efecto, de los componentes que son comunes a los dos aceites esenciales particularmente preferidos en el marco de la presente invención, a saber el aceite esencial de orégano y el aceite esencial de palo de rosa.

De acuerdo con otra realización, la divulgación también se refiere a la utilización de un aceite esencial que comprende al menos uno de los siguientes componentes: alfa pineno, canfeno, mirceno, alfa terpineno, paracimeno, trans-ocimeno, gamma-terpineno, linalol, terpinen-4-ol, beta-cariofileno, alfa-humuleno y óxido de cariofileno. Preferentemente, al menos uno de estos componentes está presente en proporción superior al 0,5 %, preferentemente superior al 1 %, 5 % incluso 10 %, 15 % o 20 % en masa. Como alternativa, puede tratarse de porcentajes cromatográficos.

De acuerdo con otra realización de la divulgación, se hace uso de un aceite esencial o de un constituyente de un aceite esencial, que sea capaz de generar una situación pro-oxidante endógena, que se produce específicamente en queratinocitos mutados en p53. Aceites esenciales que tienen esta propiedad son, concretamente, el aceite esencial de orégano compacto y el aceite esencial de palo de rosa. Resultados en este sentido se presentan en el ejemplo 2 de la parte experimental. El análisis molecular detallado en la sección experimental muestra que estos aceites esenciales provocan una desestabilización de la membrana mitocondrial y una liberación de especies reactivas de oxígeno, en el origen de la citotoxicidad dirigida a las células mutadas en p53.

En los ejemplos, también se definen ensayos sencillos para poner de manifiesto la generación de una situación prooxidante, concretamente mediante detección de la producción del anión superóxido mitocondrial.

El aceite esencial de acuerdo con la invención, puede extraerse de las raíces, de los tallos, de la corteza o de las hojas de dicha planta. Actualmente se conocen técnicas bien dominadas para la extracción de los aceites esenciales, concretamente la extracción en frío que consiste en someter a la sustancia vegetal a una fuerte presión con ayuda de una prensa hidráulica, el arrastre por vapor, que consiste en formar vapor de agua que atraviesa las plantas y se lleva con él las moléculas aromáticas, y la destilación en seco. El aceite esencial obtenido mediante destilación es una esencia vegetal modificada mediante un fenómeno de oxidación y de hidrólisis. Una temperatura controlada y una presión baja son esenciales para conservar una calidad aromática y una composición química lo más cercanas posible a la esencia vegetal que se busca extraer. La mayor parte de los aceites esenciales se obtienen mediante destilación y arrastre con vapor de agua (hidrodestilación).

Otras técnicas de extracción son bien conocidas y el experto en la materia sabrá, en función de la planta en cuestión, qué técnica es la más apropiada. También sabrá, qué técnica es la más apropiada en función de la parte de la planta que se va a utilizar para la extracción de aceite esencial.

Por supuesto, preferentemente se hace uso de técnicas que permiten la mejor pureza y que garantizan la ausencia de disolventes en el producto extraído obtenido (aceite esencial o constituyente de aceite esencial).

- En el marco de las diversas composiciones para aplicaciones cosméticas de acuerdo con la presente invención, se hace uso preferentemente de un aceite esencial en combinación con otros compuestos. Los otros compuestos pueden ser, concretamente, aceites vegetales. Entre los aceites vegetales más particularmente preferidos en combinación con los aceites esenciales de acuerdo con la invención, o sus constituyentes, se puede citar el aceite de pepitas de uva, el aceite de almendra dulce, pero también el aceite de avellana, el aceite de macadamia, el aceite de girasol y el aceite de oliva. De acuerdo con realizaciones particulares, el aceite esencial puede utilizarse en combinación con un filtro solar, o en combinación con una solución hidratante o un aceite vegetal, o bien con ambos.
- También puede tratarse de una combinación de al menos dos aceites esenciales distintos, por ejemplo un aceite esencial extraído de *Origanum compactum* y un aceite esencial extraído de una planta de la familia de las Lauráceas.
- También puede tratarse de una combinación que comprende un aceite esencial de una planta con un constituyente de este mismo aceite esencial, lo que conduce a modificar las proporciones naturales de los diferentes constituyentes de dicho aceite esencial. Puede tratarse, por ejemplo, del aceite esencial de *Origanum compactum* en asociación con timol o carvacrol.
- Como alternativa, puede tratarse de una combinación que comprende un aceite esencial de una planta del género *Origanum* con un constituyente proveniente de otro aceite esencial, extraído de una planta diferente, concretamente aceite esencial de *Origanum compactum* en asociación con linalol.
- También puede tratarse de dos constituyentes distintos, que provienen de aceites esenciales que no se encuentran juntos de forma natural dentro de cualquier aceite esencial, o bien que no se encuentran de forma natural en estas proporciones dentro de cualquier aceite esencial.
- Otros compuestos adicionales pueden seleccionarse en función de la textura deseada y del modo de aplicación deseado, para los aceites esenciales o sus constituyentes en las aplicaciones cosméticas de acuerdo con la invención.
- Por otro lado, en la presente invención, los inventores han puesto de manifiesto la existencia de un intervalo específico de concentración de aceite esencial o de constituyente de aceite esencial, para el que la citotoxicidad está específicamente dirigida a las células mutadas en p53, en oposición a las células normales y más particularmente aún a los queratinocitos mutados en p53 con respecto a los queratinocitos normales. Las utilidades en terapia previstas en el marco de la presente invención son, preferentemente, utilidades en el intervalo de concentración que permite una citotoxicidad dirigida a las células hiperproliferativas y/o mutadas en p53 y que garantiza una viabilidad de al menos el 40 %, incluso de al menos el 50 o el 60 % de las células normales no mutadas. La implementación de los protocolos detallados en los ejemplos 2 y 3 de la sección experimental permite al experto en la materia determinar los intervalos de concentración adecuados para cualquier aceite esencial o uno de sus componentes.
- En el caso de un cultivo *in vitro*, los inventores han demostrado (véase el ejemplo 4) que dichos intervalos de concentración son: del 0,0125 % al 0,0175 % para el aceite esencial de orégano y del 0,035 % al 0,045 % para el aceite esencial de palo de rosa, para obtener una citotoxicidad dirigida en las células mutadas en p53.
- En función de estos datos, el experto en la materia sabrá adaptar la composición de acuerdo con la invención para obtener un intervalo de concentración comparable. Puede adaptar concretamente la composición de acuerdo con la invención en forma de parche para garantizar una puesta en contacto prolongada. También es previsible recomendar aplicaciones repetidas, por ejemplo cada 24 h durante una semana, o durante un mes, o más.
- Las diversas utilidades cosméticas en el sentido de la invención incluyen utilidades en condiciones tales que inducen una citotoxicidad preferencial en los queratinocitos derivados de o que imitan una lesión de tipo queratosis actínica, concretamente mutados en p53, con respecto a los queratinocitos normales o no hiperproliferativos.
- En el marco de esta invención, las utilidades mencionadas están previstas principalmente para aplicaciones tópicas, cutáneas. Ésta es, en efecto, la vía de administración que garantiza no solamente la mejor eficacia, sino también un mejor direccionamiento a las células a tratar. Una formulación en forma de parche es particularmente preferida. Otras vías de administración son previsible, tales como ingestión e inhalación.
- Una composición para una utilización en el marco de la presente invención comprende una concentración de aceite esencial o de constituyente de aceite esencial de aproximadamente el 0,03 % al 0,15 %, preferentemente de aproximadamente el 0,03 % al 0,1 % de aceite esencial de orégano, o de aproximadamente el 0,06 % al 0,15 % de aceite esencial de palo de rosa, para una aplicación cutánea.
- En el caso de las aplicaciones preventivas, las composiciones de acuerdo con la invención pueden formularse en forma de leche, por ejemplo como leche solar, en forma de pomada o bien en forma de aceite.

Preferentemente, el aceite esencial seleccionado, se formulará en combinación con un aceite vegetal, concretamente para permitir su dilución y disminuir de este modo su eventual efecto irritante. Por otro lado, habiendo puesto los inventores de manifiesto el direccionamiento específico del efecto citotóxico de los aceites esenciales o de sus constituyentes, concretamente los constituyentes mayoritarios, contra células hiperproliferativas tales como las células mutadas en p53, la presente divulgación también se refiere a cualquier utilización cosmética de un aceite esencial o de uno de sus constituyentes, preferentemente mayoritario, en el tratamiento o la prevención dirigida de zonas antiestéticas de la piel debidas a la hiperproliferación de células de la dermis o de la epidermis, por ejemplo debidas a la hiperproliferación de melanocitos, concretamente en el marco de nevos, o bien de las zonas antiestéticas en el marco de cicatrices.

Un sujeto susceptible de ser tratado con los métodos cosméticos de acuerdo con la invención es un ser humano, hombre o mujer, sea cual sea su edad. Preferentemente, se trata de un adulto, pero la invención no está limitada a los adultos y comprende también el tratamiento de adolescentes, preferentemente de más de 15 años, para las diversas aplicaciones cosméticas previstas.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación también se refiere a diversos métodos cosméticos, concretamente métodos cosméticos de prevención o de tratamiento de las queratosis actínicas, que comprenden la aplicación sobre la piel de al menos un aceite esencial o de uno de sus constituyentes. Dichos métodos son puramente cosméticos y solamente pretenden modificar el aspecto estético de la piel. Dichas queratosis pueden estar desprovistas de células tumorales.

Las diversas realizaciones preferidas en el marco de estos métodos cosméticos son idénticas a las realizaciones detalladas anteriormente en relación con las diversas utilizaciones para aplicaciones cosméticas.

En el marco de la presente invención, las diversas aplicaciones descritas anteriormente, preventivas o de tratamiento de las queratosis también están previstas con un fin no solamente estético cosmético, sino también a título profiláctico, si la evolución de la queratosis hacia una lesión precancerosa se sospecha o está prevista, por ejemplo debido a precedentes familiares o en el mismo sujeto. En este caso, puede estar previsto tratar una queratosis por razones no solamente cosméticas sino también médicas, y más teniendo en cuenta que esta queratosis no es un tumor y no posee ninguna célula tumoral.

En este caso, la presente invención también se refiere a aplicaciones terapéuticas de las composiciones descritas anteriormente, que comprenden un aceite esencial de *Origanum compactum*.

Más particularmente, de acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un aceite esencial de *Origanum compactum*, para una utilización terapéutica en la prevención, o el tratamiento dirigido de queratosis, preferentemente en seres humanos. Dichas queratosis incluyen queratosis actínicas, desprovistas de células tumorales, caracterizándose dichas queratosis por células portadoras de mutaciones en el gen p53.

Aunque la actividad citotóxica de un constituyente aislado sea menor que la de un aceite esencial completo, la divulgación se refiere concretamente a una composición que comprende un constituyente del aceite esencial de *Origanum compactum* o de *Aniba rosaeodora*, para una utilización terapéutica en la prevención, o el tratamiento dirigido de queratosis. Este constituyente no es preferentemente un óxido, concretamente no un óxido de linalol.

Concretamente, como ya se ha mencionado, la presente invención se refiere, más especialmente a composiciones que comprenden un aceite esencial extraído de plantas de *Origanum compactum*.

Como para las diferentes aplicaciones ya descritas, la composición que comprende el aceite esencial de *Origanum compactum*, se utiliza preferentemente en combinación con otros compuestos, concretamente excipientes terapéuticamente aceptables o aceites vegetales. Compuestos adicionales particularmente preferidos ya se han descrito con los otros aspectos de la invención y son aplicables a las utilizaciones terapéuticas. Para las diversas intenciones terapéuticas de la presente invención, la aplicación tópica de la composición también está prevista como en las aplicaciones con intención puramente cosmética.

De acuerdo con la presente invención, las queratosis son queratosis actínicas.

Los intervalos de concentraciones preferidas de aceite esencial o de constituyente de aceite esencial, también son los que garantizan una citotoxicidad dirigida al tiempo que preservan la viabilidad de las células sanas no mutadas, como ya se ha descrito para los otros aspectos de la invención.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención son preferentemente tales que pueden utilizarse para inducir una citotoxicidad preferencial en los queratinocitos derivados de o que imitan una lesión de tipo queratosis actínica mutados en p53 con respecto a los queratinocitos normales y/o no hiperproliferativos.

Leyenda de las figuras:

- Figura 1: la figura 1 representa la medida de la viabilidad celular (ensayo MTT) en células A431, HaCat y NHEK tratadas 4 h con el AE de orégano. La línea doble (=) corresponde a la dosis letal al 50 % (DL50).
- Figura 2: la figura 2 representa la medida de la viabilidad celular (ensayo MTT) en células A431, HaCat y NHEK tratadas 4 h con el AE de palo de rosa. La línea doble (=) corresponde a la dosis letal al 50 % (DL50).
- Figura 3: la figura 3 representa la medida de la viabilidad celular (ensayo MTT) en células A431, HaCat y NHEK tratadas 20 h con el AE de orégano. La línea doble (=) corresponde a la dosis letal al 50 % (DL50).
- Figura 4: la figura 4 representa la medida de la viabilidad celular (ensayo MTT) en células A431, HaCat y NHEK tratadas 20 h con el AE de palo de rosa. La línea doble (=) corresponde a la dosis letal al 50 % (DL50).
- Figura 5: la figura 5 representa la medida de la apoptosis (ensayo AV/PI), en las células A431, HaCat y NHEK, después de 12 h de tratamiento con los AE de orégano y de palo de rosa.
- Figura 6: la figura 6 representa la medida de la fluorescencia (actividad caspasa) por citometría de flujo. Las células no marcadas, las células marcadas no tratadas, y las células tratadas (con AE) y marcadas, están etiquetadas.
- Figura 7: la figura 7 representa la medida de la fluorescencia (actividad caspasa) por microscopía de fluorescencia.
- Figura 8: la figura 8 ilustra la cuantificación del número de células A431 y HEK 001 (queratinocitos no mutados) que han sufrido una caída del potencial membranario mitocondrial después de 6 h de tratamiento con los AE de orégano y de palo de rosa.
- Figura 9: la figura 9 ilustra la detección del estrés oxidativo inducido después de 4 h de incubación con los AE de orégano y de palo de rosa, en las células A431, HaCat y NHEK 894, mediante la medida (citometría de flujo) de la fluorescencia de la sonda DHR 123.
- Figura 10: la figura 10 representa la medida de la apoptosis (ensayo AV/PI), en las células A431 y HEK001 (queratinocitos inmortalizados no mutados), después de 12 h de tratamiento con los siguientes constituyentes de aceites esenciales: linalol, carvacrol y timol.

Sección experimental:

Ejemplo 1: Estudio analítico de los aceites esenciales (AE) de orégano y de palo de rosa.

La elección de estudiar el AE de orégano se determinó mediante los trabajos del laboratorio del Dr Averbeck que han demostrado una actividad antigenotóxica de este AE en la levadura (Bakkali, F. et al. 2006). El AE de palo de rosa se seleccionó en relación con sus propiedades beneficiosas para la piel.

El presente ejemplo se refiere a la caracterización de la parte volátil de 2 AE biológicos adquiridos en el mercado: un aceite esencial de palo de rosa y un aceite esencial de orégano. La metodología aplicada pone en juego, un análisis GC-MS, en 2 columnas de polaridades diferentes (columna apolar OV1 y columna polar VF WAX).

*Material y método*

1. Material

Los análisis se realizaron en aparatos Agilent con 2 tipos de columnas:

- Columna capilar apolar: Columna capilar HP-1 longitud: 50 m, diámetro interno: 0,2 mm, película: 0,33 µm.
- Columna capilar polar: Columna capilar VF WAX, longitud 60 m, diámetro interno 0,25 mm, película: 0,25 µm.

Es importante subrayar que todos los porcentajes obtenidos son porcentajes cromatográficos y no porcentajes reales de compuestos presentes en la fase volátil. Para cuantificar exactamente los constituyentes, sería preciso utilizar un patrón interno para librarse de las variaciones debidas al instrumental.

2. Identificación de los ingredientes a partir de una cromatografía en fase gaseosa en 2 columnas de polaridades diferentes, acoplada a un detector espectrómetro de masa (GC/MS).

La identificación de las moléculas se realiza con ayuda de bibliotecas de espectros de masa específicos para los perfumes.

La sensibilidad de los aparatos permitió cuantificar compuestos para los cuales el porcentaje relativo es superior o igual al 0,001 %.

La presentación de los resultados y la cuantificación se realizan, en GC/FID en columna apolar, la cuantificación de los constituyentes coeluidos se realiza en columna polar.

3. Muestras analizadas

- AE de palo de rosa

5 - AE de orégano

Resultados:

*Aceite esencial de palo de rosa:*

- 10 En vista de los resultados, parece que:
- Se identifica con certidumbre el 99,12 % del área total del cromatograma.
- 15 - Se identificaron y cuantificaron 62 moléculas.
- La tabla 1 de composición (en porcentajes cromatográficos) establecida para el AE de palo de rosa se encuentra a continuación:

20

PALO DE ROSA		Tabla 1: Composición en % GC	PALO DE ROSA		Composición en % GC
6 METHYL 5 HEPTENE 2 ONE	0,12	MYRCENE	0,05		
LINALOYL OXYDE = LIMETOL	0,33	HERBOXIDE (isómero) = DESOXYDE	0,02		
BETA PINENE	0,14	GERANIAL	0,05		
BENZYL ALCOOL	0,01	METHYL ANISOATE	0,02		
ALPHA TERPINENE	0,02	GERANYL ACETATE	0,02		
PARACYMENE	0,08	ALPHA COPAENE	1,15		
LIMONENE	0,46	BETA ELEMENE	0,13		
1,8 CINEOLE	0,57	ALPHA GURJUNENE	0,15		
CIS BETA OCYMENE	0,03	TRANS BETA CARYOPHYLLENE	0,04		
5 DIMETHYL 2,2 TETRAHYDROFURANE = CTROXYDE	0,05	ALPHA GUAIENE	0,05		
TRANS BETA OCIMENE	0,09	ALPHA HUMULENE	0,02		
GAMMA TERPINENE	0,02	ALLO AROMADENDRENE	0,06		
CIS LINALOL OXYDE	1,9	GAMMA MUUROLENE	0,04		
TRANS LINALOL OXYDE	1,28	SELINA4,11 DIENE	0,14		
TERPINOLENE	0,52	BETA SELINENE	0,82		
LINALOL	78,93	ALPHA SELINENE	0,77		
HOTRIENOL	0,2	GAMMA CADINENE	0,12		
ALPHA FENCHOL	0,02	DELTA CADINENE	0,28		
MYRCENOL	0,06	TRANS NEROLIDOL	0,27		
CIS OCIMENOL	0,14	SPATHULENOL	0,11		
NEROL OXYDE	0,03	CARYOPHYLLENE OXYDE	0,07		
TRANS OCIMENOL	0,16	alcohol sesquit C15H24O HP1: 1637	0,23		
EPOXY LINALOL 1 = CIS LINALOL OXYDE (PYRANOÍDE)	0,15	alcohol sesquit C15H24O HP1: 1646	0,15		
EPOXY LINALOL 2 = TRANS LINALOL OXYDE (PYRANOÍDE)	0,25	7 EPI ALPHA EUDESMOL	0,12		
		alcohol sesquit C15H24O HP1: 1689	0,27		
BORNEOL	0,06	alcohol sesquit C15H24O HP1: 1697	0,29		
TERPINENE 4 OL	0,2	alcohol sesquit C15H24O HP1: 1701	0,4		
ALPHA TERPINEOL	4,52	BENZYL BENZOATE	0,6		
GAMMA TERPINEOL	0,04	TOTAL (%)	99,12		
NEROL	0,38				
NERAL	0,04				
GERANIOL	1,47				

- El compuesto mayoritario del AE es el linalol (78,93 %).
  - Los compuestos presentes en mayor cantidad en el AE, después del linalol, son alfa terpineol (4,52 %), óxido de linalol cis (1,90 %), geraniol (1,47 %), óxido de linalol trans (1,28 %) y alfa copaeno (1,15 %).
- 5 - El compuesto minoritario es el alcohol bencílico (0,01 %).

Los porcentajes en masa de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de palo de rosa son los siguientes:

- Linalol: 78,93 %
- 10 - Alfa terpineol: 4,91 %.

*Aceite esencial de orégano:*

En vista de los resultados, parece que:

- 15 - Se identifica con certidumbre el 97,69 % del área total del cromatograma.
- Se identificaron y cuantificaron 20 moléculas.
- La tabla 2 de composición (en porcentajes cromatográficos) establecida para el AE de orégano se encuentra a continuación:

20

Tabla 2:

ORÉGANO	COMPOSICIÓN EN % GC	ORÉGANO	COMPOSICIÓN EN % GC
Thujene alpha	0,87	Terpinene gamma	15,45
Pinene alpha	0,64	Sabinene trans hydrate	0,19
Camphene	0,12	Linalol	1,66
1 octen-3-ol	0,23	Terpinenol 4	0,61
Octanone 3	0,17	Thymol	20,23
Myrcene	1,86	Carvacrol	38,61
Phellandrene alpha	0,23	Caryophyllene beta	1,88
Terpinene alpha	1,47	Humulene alpha	0,1
Paracymene	12,65	Caryophyllene oxyde	0,09
Phellandrene beta	0,56	TOTAL (%)	97,69
Ocimene trans	0,07		

- Los compuestos mayoritarios del AE son carvacrol (38,61 %), timol (20,23 %), gamma terpineno (15,45 %) y paracimeno (12,65 %).
- 25 - El compuesto minoritario es ocimeno trans (0,07 %).
- Existen 12 moléculas comunes entre el AE de orégano y el AE de palo de rosa: alfa pineno, canfeno, mirceno, alfa terpineno, paracimeno, ocimeno trans, gamma terpineno, linalol, terpinenol 4, beta cariofileno, alfa humuleno, óxido de cariofileno. Estos compuestos son principalmente terpenos.

30 Los porcentajes en masa de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de orégano son los siguientes:

- Paracimeno: 12,27 %
- Gamma terpineno: 16,10 %,
- Timol: 18,65 %
- 35 - Carvacrol: 31,83 %.

Conclusiones:

40 La composición química precisa de cada AE se determinó mediante análisis en cromatografía en fase gaseosa (véase las tablas 1 y 2). La observación de la composición química de cada AE revela una diferencia cualitativa muy clara si se considera el número de compuestos mayoritarios. Aunque el AE de palo de rosa presenta un mayor número de moléculas químicas diferentes (aproximadamente 62), posee un compuesto muy mayoritario: el linalol, presente en más del 78 % de la fracción analizada. Por el contrario, el AE de orégano, en sus 20 moléculas censadas, muestra cuatro moléculas mayoritarias: carvacrol (38 %), timol (20 %), gamma terpineno (15 %) y paracimeno (12 %). A este respecto, el AE de palo de rosa se denomina «monomolecular» y el AE de orégano se denomina «polimolecular». Hay que señalar también que el AE de orégano está compuesto principalmente por mono-fenol (carvacrol y timol) mientras que el AE de palo de rosa está constituido mayoritariamente por alcohol terpénico (linalol).

50 Ejemplo 2:

En el presente trabajo, se ha estudiado más particularmente la citotoxicidad de dos AE: el AE de orégano compacto (*Origanum compactum*, familia de las Lamiáceas) y el AE de palo de rosa (*Aniba rosaedora*, familia de las

Lauráceas) sobre células epidérmicas humanas: la línea queratinocítica HaCat (mutada en p53 e inmortalizada espontáneamente), la línea A431 (derivada de un carcinoma espinocelular) así como sobre queratinocitos epidérmicos primarios normales humanos.

5 Estos tres modelos permitieron evaluar los efectos biológicos potenciales de estos dos AE sobre células epidérmicas normales, mutadas en p53 (que pueden ser asimiladas como precancerosas) y cancerosas, representando el conjunto en cierta medida, las diferentes situaciones entre piel sana y piel que presenta un riesgo de cáncer no melanoma y/o piel derivada de queratosis.

10 Medida de la viabilidad celular:

Los inventores compararon el efecto citotóxico de los aceites esenciales sobre queratinocitos normales, mutados precancerosos (HaCat) y mutados cancerosos (A431).

15 La viabilidad celular se determina mediante el ensayo MTT después de un tratamiento de 4 h y 20 h con diferentes concentraciones de AE. Este ensayo (MTT) se basa en la actividad enzimática mitocondrial de la succinato deshidrogenasa. Cada punto de viabilidad está representado mediante tres experimentos independientes (NHEK: queratinocitos humanos normales «*Normal Human Epidermal Keratinocyte*»).

20 Las figuras 1 y 2 indican que:

- el AE de orégano es más citotóxico que el AE de palo de rosa, independientemente del tiempo (comparación entre las 4 h y 20 h de tratamiento) y de la línea celular utilizada.
- las células normales (NHEK) son más resistentes que las células cancerosas (A431) y mutadas precancerosas (HaCat), después de 4 h de tratamiento.
- el perfil de citotoxicidad es idéntico entre las células A431 y HaCat, después de 4 h de tratamiento (con los AE de orégano y de palo de rosa).

30 Las figuras 3 y 4 confirman que esta diferencia de toxicidad entre las células A431/HaCat y las células NHEK está conservada después de 20 h de tratamiento, aunque a este tiempo se observa una diferencia de sensibilidad entre las células HaCat y A431.

35 Estos resultados ponen de manifiesto una toxicidad dirigida de los AE para las células cancerosas y mutadas precancerosas con respecto a las células normales, a concentraciones de 150 nl/ml y 400 nl/ml de AE de orégano y de palo de rosa respectivamente.

Detección de la apoptosis:

40 La apoptosis se define mediante la inducción de acontecimientos bioquímicos característicos que causan una muerte celular programada. Estos acontecimientos característicos son, por ejemplo, la translocación de un fosfolípido membranario particular (fosfatidilserina) de la membrana plasmática interna o incluso la activación de ciertas proteasas (caspasas) implicadas en este proceso de degradación de las proteínas que causa la muerte celular.

45 Los resultados de viabilidad celular pusieron de manifiesto una concentración para cada AE, en la que se revela la diferencia de sensibilidad de las células cancerosas y mutadas precancerosas con respecto a las células normales: 150 nl/ml para el AE de orégano y 400 nl/ml para el AE de palo de rosa. Estas concentraciones se utilizarán en el marco de un tratamiento de 16 h (también se realizaron 4 h y 12 h).

50 La figura 5 pone de manifiesto después de 12 h de tratamiento:

- una viabilidad significativamente más elevada de las células normales (NHEK; viabilidad >70 %) con respecto a las líneas cancerosa A431 y mutada precancerosa HaCat (índice de viabilidad < 15 % en las líneas A431 y HaCat).
- una fuerte inducción de la apoptosis en la línea cancerosa A431 (plus del 60 % de células anexina V positivas).
- una apoptosis tardía o necrosis en las células mutadas precancerosas HaCat.

60 Estos resultados confirman una sensibilidad más elevada a la toxicidad de los AE de las células mutadas precancerosas HaCat y cancerosas A431 con respecto a los queratinocitos normales NHEK. También ponen de manifiesto una inducción de muerte celular por apoptosis. Para confirmar la inducción de una muerte celular por apoptosis por los AE, se realiza un segundo ensayo basado en la detección de la actividad de las caspasas, una familia de proteínas específicas del mecanismo de la apoptosis, sobre las células tratadas con los AE. La activación de las caspasas es un fenómeno más precoz que la translocación de la fosfatidilserina detectada anteriormente por la anexina V. El principio del ensayo se basa en la utilización de un sustrato de estas enzimas acoplado a un fluorógeno. Las células en apoptosis, en las que las caspasas están activadas, degradarán el sustrato y emiten

fluorescencia. Las células no apoptóticas no emiten fluorescencia. La medida de fluorescencia se realiza mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, después de 4 h de tratamiento con los AE.

5 La figura 6 pone de manifiesto un desplazamiento hacia la derecha (por lo tanto un aumento de la intensidad de fluorescencia) de la curva que representa las células tratadas por los AE con respecto a la curva que representa las células marcadas pero no tratadas, en las células A431 y HaCat únicamente. Este aumento de fluorescencia, que se confirma mediante microscopía de fluorescencia (figura 7), traduce una activación de las caspasas y confirma:

- 10
- la inducción de la apoptosis en las células cancerosas, y HaCat por los dos AE, a las concentraciones utilizadas.
  - que esta inducción se observa únicamente en las células A431 y HaCat; las células normales son, por lo tanto, más resistentes que las células cancerosas y mutadas precancerosas para un mismo tratamiento con los AE de orégano y de palo de rosa.

15 Efecto de los AE sobre la mitocondria

Después del tratamiento con los AE de orégano y de palo de rosa, el análisis de la integridad de la membrana mitocondrial de los queratinocitos mutados cancerosos A431 y de los queratinocitos no mutados se realiza por citometría de flujo (seguida por la fluorescencia ligada a la acumulación de TMRM en la membrana mitocondrial íntegra). Se constata en la figura 8 que en el ámbito de concentraciones seleccionado, tiene, efectivamente, un efecto desestabilizante de la mitocondria ligado al tratamiento con los AE, pero este efecto es particularmente marcado en las células A431 con respecto a los queratinocitos no mutados. Este impacto sobre la mitocondria está muy probablemente asociado al desarrollo del proceso apoptótico (causa y/o consecuencia).

20

25 Generación intracelular de especies reactivas de oxígeno sucesiva al tratamiento con los AE.

Una de las consecuencias de la desestabilización mitocondrial es la liberación de moléculas prooxidantes en el citosol, pudiendo detectarse este fenómeno en citometría de flujo con la sonda DHR123 que emite fluorescencia en caso de estrés oxidativo. La figura 9 muestra la evolución del número de células fluorescentes (por lo tanto, sujetas a una generación de especies reactivas de oxígeno detectables por la DHR123) después de diferentes tratamientos con los AE. Se constata que, a las concentraciones utilizadas, los queratinocitos normales no resultan afectados mientras que un aumento dependiente de la dosis del estado prooxidante intracelular es detectable en las células mutadas HaCat o A431. De este modo, los AE son capaces de producir un estrés oxidativo significativo y específico en los queratinocitos mutados precancerosos o cancerosos, estando este estrés probablemente fuertemente implicado en la citotoxicidad dirigida descrita por las figuras 1 a 4.

30

35

Conclusiones

Los datos presentados en este documento demuestran una sensibilidad a la citotoxicidad de los AE de orégano y de palo de rosa significativamente más elevada en queratinocitos humanos cancerosos y mutados precancerosos con respecto a los queratinocitos normales.

40

El análisis de los mecanismos en juego permitió demostrar que esta diferencia de sensibilidad se explicaba por la inducción de una muerte por apoptosis en las células cancerosas y mutadas precancerosas, mientras que las células normales presentaban índices de viabilidad celular superiores al 70 % para una misma concentración de AE.

45

El análisis molecular demuestra que esta toxicidad específica con los AE implica modificaciones de la integridad mitocondrial y la generación de un estrés oxidativo endógeno. Es, por lo tanto, previsible dirigirse a queratinocitos mutados precancerosos (en particular en las queratosis o en zonas de la piel dañadas por los UV) con el AE y de este modo eliminarlos específicamente.

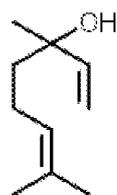
50

Ejemplo 3:

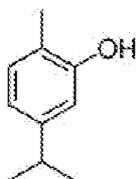
Medida de la actividad proapoptótica de los compuestos aislados mayoritarios de los aceites esenciales de orégano y de palo de rosa.

55

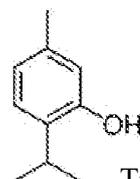
El AE de palo de rosa está compuesto por una molécula mayoritaria (a más del 80 %): linalol (alcohol terpénico). El AE de orégano compacto contiene dos compuestos mayoritarios (monoterpenol): carvacrol y timol, presentes al 40 % y 20 %, respectivamente.



Linalol



Carvacrol



Timol

Estas tres moléculas, se incubaron 12 h con queratinocitos inmortalizados no mutados (HEK 001) y queratinocitos cancerosos mutados (A431). Los porcentajes de células en apoptosis se midieron mediante el ensayo con Anexina V/Yoduro de propidio. Las concentraciones de las moléculas utilizadas son iguales a las presentes durante tratamientos con los AE. Ejemplo: la concentración de linalol utilizada en este caso, representa el equivalente del 80 % de linalol presente en el AE de palo de rosa. En efecto, el linalol se utiliza a una concentración de 320 nl/ml (véase la figura 10), es decir el 80 % de 400 nl/ml de aceite esencial de palo de rosa que es la concentración demostrada como la más tóxica para las células HaCaT y A431, al tiempo que deja un máximo de células NHEK y HEK 001 viables (véase el ejemplo 2, conclusiones sobre la sección «medida de la viabilidad celular» y figura 3 y 4 así como la sección «detección de la apoptosis» y la figura 5). Lo mismo ocurre para el carvacrol y el timol del AE de orégano.

Los resultados de apoptosis se presentan en la figura 10.

Los resultados de este experimento expresados en % de células, vivas, en apoptosis o en apoptosis tardía y necrosis muestran:

- Una citotoxicidad y una actividad proapoptótica más baja de las moléculas mayoritarias aisladas con respecto a la inducida por los AE en su complejidad (70 % de apoptosis inducida en las células cancerosas a dosis equivalente de AE de orégano, es decir 150 nl/ml). En efecto, la figura 5 muestra, por ejemplo, que más del 60 % de las células A431 son apoptóticas después de un tratamiento con AE de orégano a una concentración de 150 nl/ml. La figura 10, por el contrario, muestra que aproximadamente solamente el 25 % de las células A431 son apoptóticas después de 12 h de tratamiento con carvacrol a una concentración de 60 nl/ml (correspondiente al 40 % de 150 nl/ml) y aproximadamente el 15 % de células apoptóticas con un tratamiento con timol a 30 nl/ml (correspondiente al 20 % de 150 nl/ml).
- Índices de viabilidad de las células no mutadas (HEK001) superiores a los observados en las células mutadas (A431). El direccionamiento preferente a las células mutadas, por lo tanto, se conserva.

Este experimento muestra que la muerte por apoptosis dirigida a las células cancerosas mutadas se conserva cualitativamente si se utilizan los compuestos mayoritarios del palo de rosa (linalol) o del orégano (carvacrol y timol). Por el contrario, la eficacia citotóxica es menor que con los AE en su complejidad. Existen, por lo tanto, seguramente sinergias con los otros constituyentes.

Este punto se confirma mediante la observación realizada por los inventores de que la mezcla de varias moléculas aisladas de un mismo aceite esencial reproduce la actividad observada con el aceite esencial, actividad superior a la simple suma de las actividades de las moléculas aisladas tomadas por separado.

Material y métodos para los ejemplos 2 y 3:

Treinta y seis horas antes del tratamiento, las células se distribuyen en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/ml).

Solución de tratamiento de los AE: los AE se diluyen al 1/10<sup>0</sup> una primera vez en etanol 100 %. A continuación, se realiza una segunda dilución en medio de cultivo para obtener las concentraciones deseadas.

La medida de viabilidad se realiza con ayuda del ensayo MTT (1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan. Sigma-Aldrich). En resumen, después del tiempo de tratamiento deseado, el medio de tratamiento se sustituye por medio que contiene la solución de MTT (0,25 µg/ml de concentración final). La placa de 96 de pocillos que contiene las células se incuba a continuación 4 h a 37 °C antes de eliminar la solución de MTT y de añadir 100 µl de DMSO. La medida de absorbancia se realiza a continuación a 540 nm después de haber homogeneizado el precipitado violeta. La medida del estrés oxidativo se realiza con ayuda de la sonda fluorescente DHR 123 (Molecular Probe). Después de 4 h de tratamiento con los AE, el medio se elimina y las células se recogen (por tripsinización), se centrifugan y a continuación se aclaran en 4 ml de PBS 1X. Las células se incuban a continuación 30 minutos (37 °C) en medio de cultivo que contiene la sonda (5 µM). Antes de la medida de fluorescencia por citometría (Excitación: 488 nm/Emisión: 530 nm), las células se aclaran en 4 ml de PBS 1X, se centrifugan y se recuperan en 0,5 ml de PBS.

Detección de la apoptosis:Ensayo con anexina V/yoduro de propidio:

5 Uno de los marcadores de la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática (translocación que permite a que los cuerpos apoptóticos sean reconocidos y fagocitados por los macrófagos).

10 El ensayo AV/PI permite detectar este acontecimiento, gracias a la afinidad de la proteína anexina V por la fosfatidilserina. El yoduro de propidio que se dirige al ADN, permite la discriminación de las células apoptóticas precoces, de las células en apoptosis tardía y/o en necrosis.

15 Después del tiempo de tratamiento deseado, el medio se elimina, las células se recogen (por tripsinización), se centrifugan y se aclaran en 4 ml de PBS 1X. El marcado se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante (Kit Vybrant. Molecular Probe). Rápidamente, las células se recuperan en 100 µl de tampón de marcado, en el que se añaden 6 µl de anexina 5, y 3 µg/ml de yoduro de propidio por muestra. Las células se incuban a continuación 30 minutos en la oscuridad (a temperatura ambiente). Se añaden cuatrocientos µl de tampón de marcado antes de medir la fluorescencia de la anexina 5 (a 530 nm) y del yoduro de propidio (a 610 nm).

20 Actividad caspasa:

La actividad caspasa es un segundo marcador de la apoptosis. La familia de la caspasa agrupa proteínas principalmente implicadas en la regulación de la muerte celular por apoptosis. La actividad caspasa se detecta con ayuda de un sustrato VAD (por valina-alanina-ácido aspártico) acoplado a un fluoróforo (FITC. Emisión: 530 nm).  
25 La detección de esta actividad se realiza siguiendo las instrucciones del kit CasPACE TM (Promega). Después del tratamiento, las células se recogen (por tripsinización), se centrifugan y se aclaran en 4 ml de PBS 1X. A continuación, las células se incuban 20 minutos en medio de cultivo que contiene el reactivo (10 µM), 20 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Las células se aclaran a continuación 2 veces en 4 ml de PBS 1X antes de fijarlas 30 minutos en una solución de formalina. Antes de la medida de fluorescencia por citometría de flujo, las  
30 células se aclaran 3 veces 5 minutos) en PBS 1X y a continuación se recuperan en 0,5 ml de PBS.

Permeabilización mitocondrial:

35 La permeabilización de los poros mitocondriales es también un marcador precoz de la apoptosis. Una sonda fluorescente (TMRM: éster metílico de tetrametil rodamina); Molecular Probe) se localizan en la mitocondria, disminuirá en intensidad cuando ésta migra al citoplasma, sucesivamente a la abertura de los poros mitocondriales. Una caída de fluorescencia se mide, por lo tanto, por citometría de flujo.

40 Después de 4 h de tratamiento, las células se tripsinizan y se aclaran en PBS 1X antes de incubarlas 30 minutos a 37 °C en medio de cultivo que contiene la sonda fluorescente (50 nM final). Después de esta incubación, las células se aclaran 1 vez 5 minutos en PBS 1X y a continuación se recuperan en 0,5 ml de PBS antes de la medida por citometría.

45 Ejemplo 4: Intervalo de concentración de AE: citotoxicidad dirigida

Los intervalos de concentraciones de AE (en % de AE por volumen de medio de cultivo) para las que se observa la propiedad de citotoxicidad inducida preferentemente en las células mutadas (HaCat y A431) con respecto a las células no mutadas (HEK001 y NHEK894) son:

50 del 0,0125 % al 0,0175 % de AE de orégano.  
del 0,035 % al 0,045 % de AE de palo de rosa

55 En estos intervalos de concentraciones, los índices de toxicidad son dos veces más elevados en las células mutadas que en las células no mutadas, en las que la viabilidad sigue siendo del orden del 60 %. Por otro lado, debe subrayarse que estudios demostraron una buena penetración cutánea de los principales ingredientes de los AE de palo de rosa y de orégano.

Referencias

60 Bakkali, F., et al. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutat. Res.* 606: 27-38, 2006.  
Calcabrini, A., et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 122: 349-360, 2004.  
65 Diaz, C., et al. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. *Nat. Prod. Res.* 22: 1521-1534, 2008.

- Fusenig, N. E. and Boukamp, P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 23: 144-158, 1998.
- Gogvadze V. et al. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 18: 165-173, 2008.
- 5 Itharat, A., et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J.Ethnopharmacol.* 90: 33-38, 2004.
- Kaur, M., et al. Skin cancer chemopreventive agent,  $\alpha$ -santalol, induces apoptotic death of human epidermoid carcinoma A431 cells via caspase activation together with dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis* 26: 369-380, 2005.
- 10 Koba K., et al. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J.Pharmacol.* 4: 29-34, 2009.
- Kumar, A., et al. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.* 171: 332-347, 2008.
- 15 Loizzo, M. et al. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prolif.* 41: 1002-1012, 2008.
- Molassiotis, A., et al. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Ann. Oncol.* 16: 655-663, 2005.
- 20 Mudgil, A. V., Segal, N., Andriani, F., Wang, Y., Fusenig, N. E., and Garlick, J. A. Ultraviolet B irradiation induces expansion of intraepithelial tumor cells in a tissue model of early cancer progression. *J. Invest. Dermatol.* 121: 191-197, 2003.
- Ortonne, J. P. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 146 Suppl. 61: 20-23, 2002.
- Sharma, P. R., et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chem. Biol. Interact.* 2008.
- 25 Taguchi, M., et al. Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 103: 500-503, 1994.
- Verma, M., et al. Induction of mitochondrial-dependent apoptosis by an essential oil from *Tanacetum gracile*. *Planta Med.* 74: 515-520, 2008.
- 30 Wischermann, K., et al. UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene* 27: 4269-4280, 2008.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende un aceite esencial extraído de plantas de la especie *Origanum compactum*, para una utilización en un ser humano, en el tratamiento dirigido de queratosis actínicas desprovistas de células tumorales, caracterizándose dichas queratosis por células portadoras de mutaciones en el gen p53.
2. Composición para una utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho aceite esencial se aplica en combinación con otros compuestos, concretamente en asociación con aceites vegetales.
- 10 3. Composición para una utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para una aplicación tópica.
- 15 4. Composición para una utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que induce una citotoxicidad preferencial en los queratinocitos hiperproliferativos con respecto a los queratinocitos no hiperproliferativos.
5. Composición para una utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el aceite esencial constituye un principio activo de la composición.

20

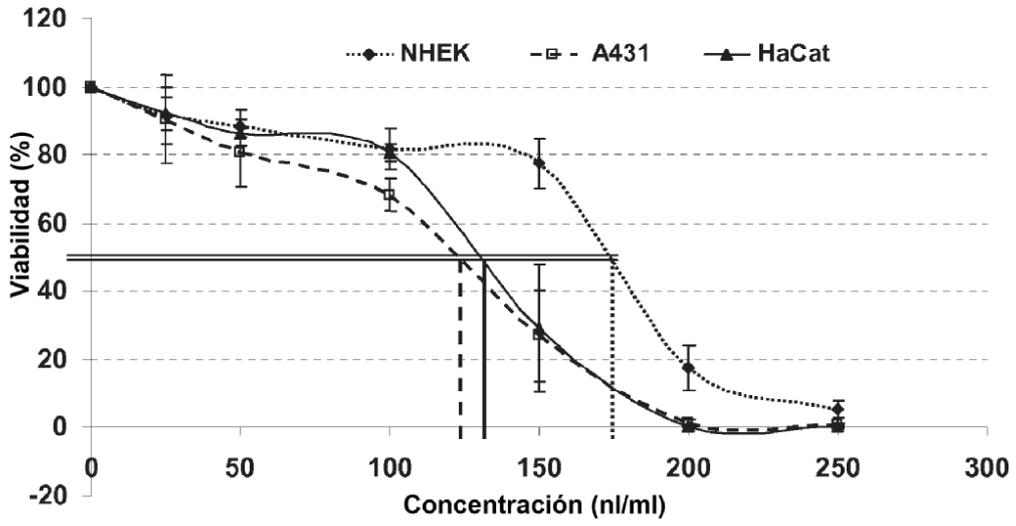


FIG. 1

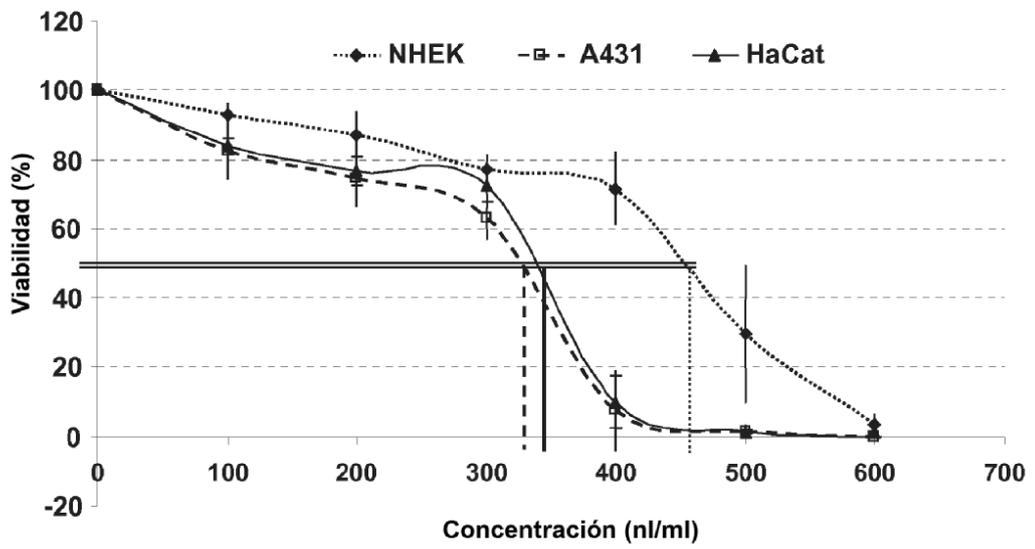


FIG. 2

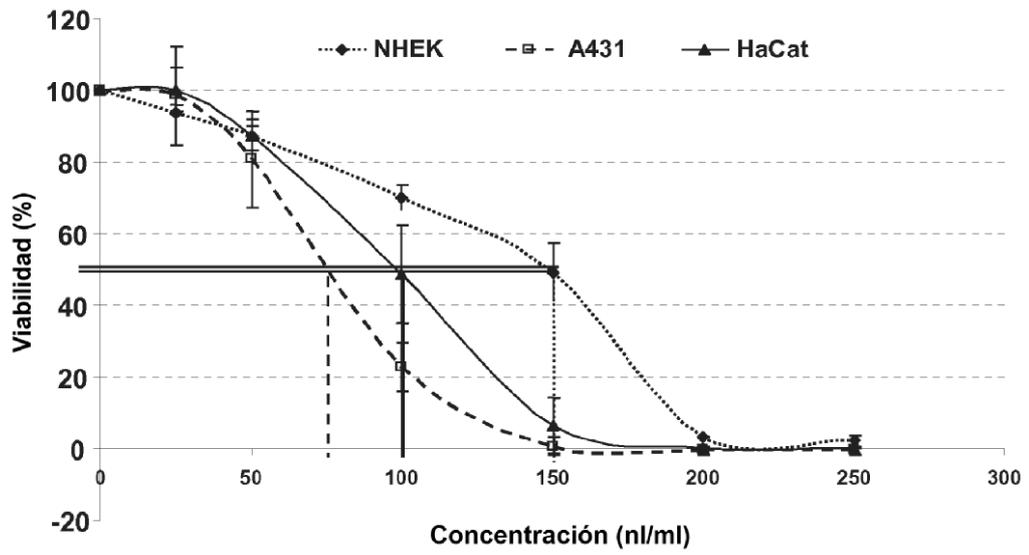


FIG. 3

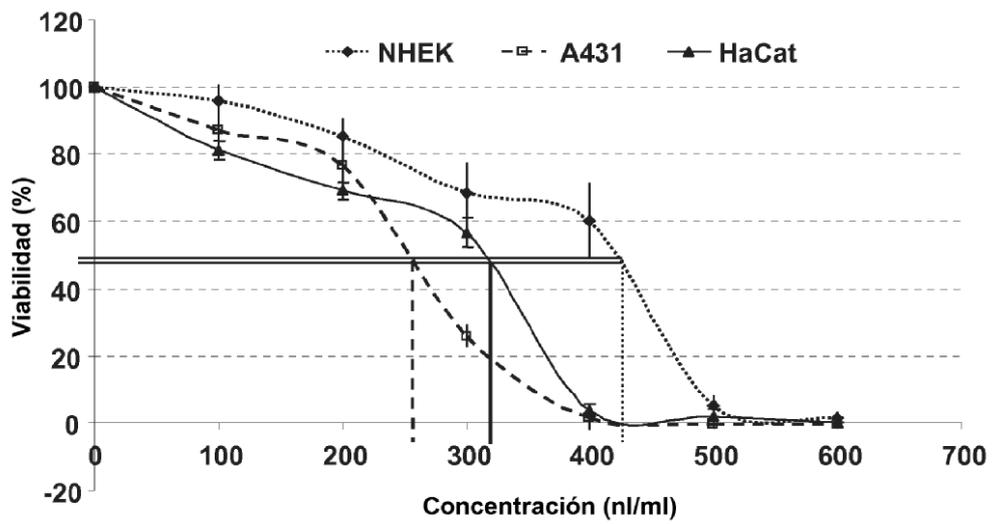


FIG. 4

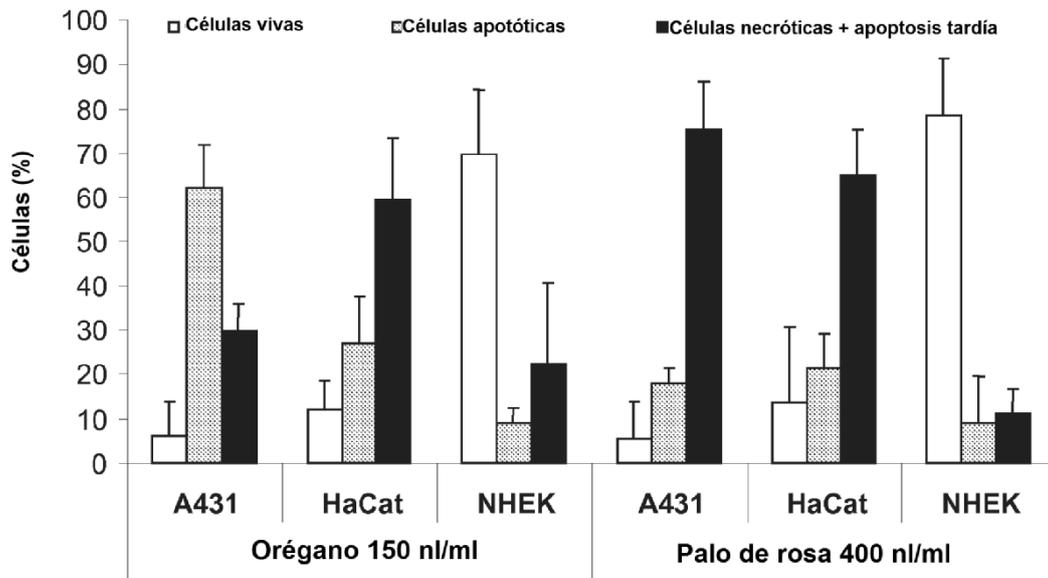


FIG. 5

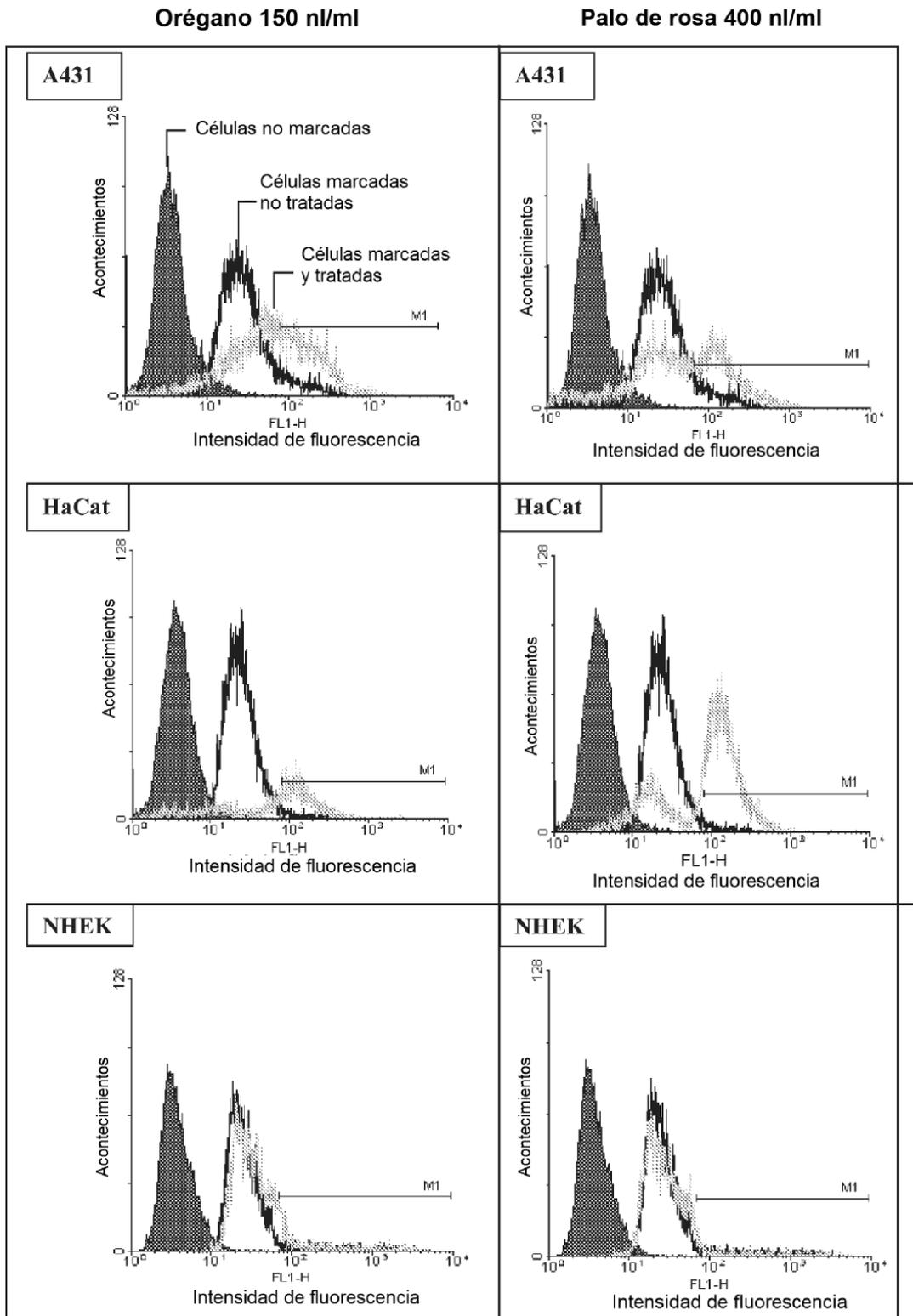


FIG. 6

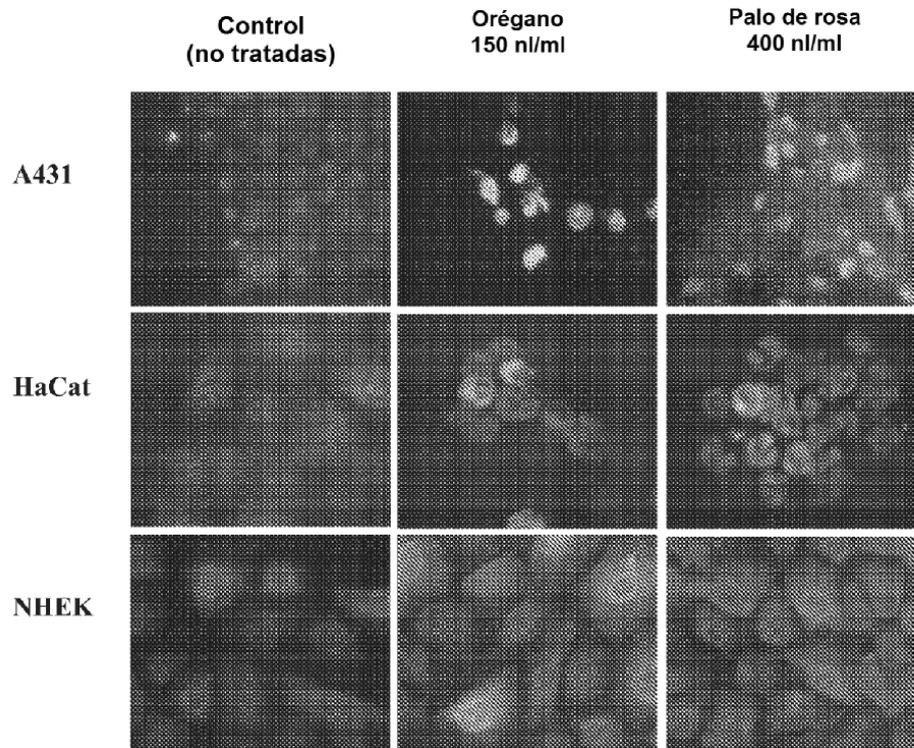


FIG. 7

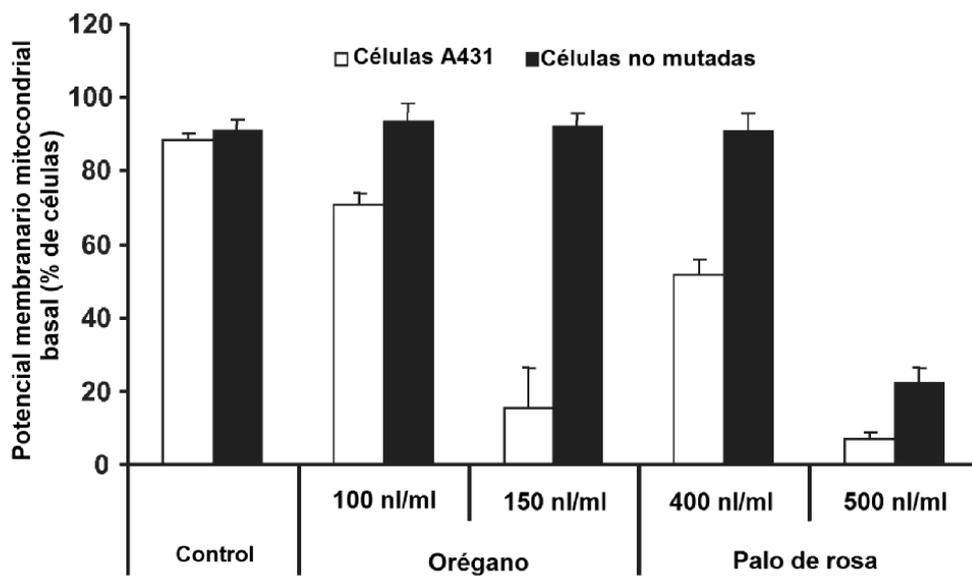


FIG. 8

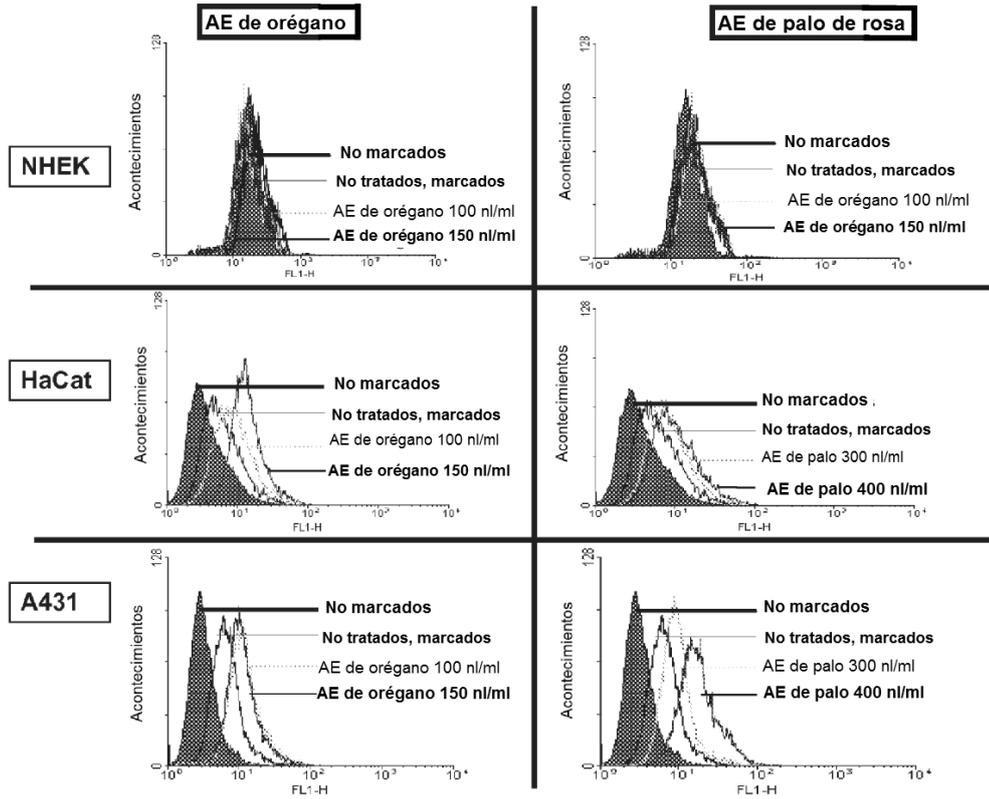


FIG. 9

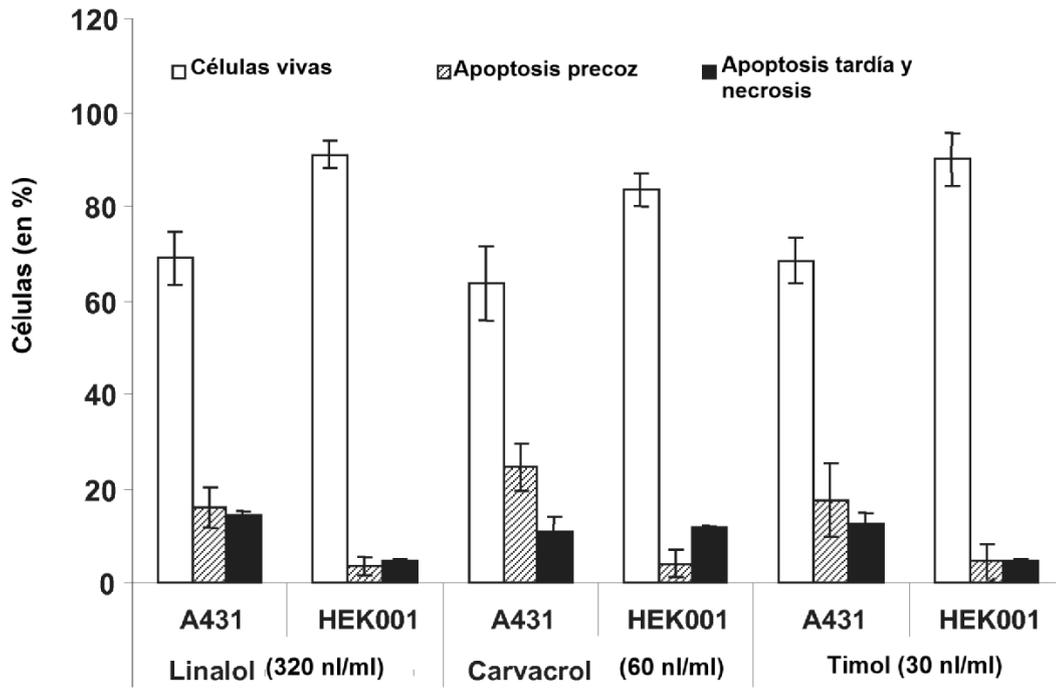


FIG. 10