



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1007728-6 B1



(22) Data do Depósito: 14/05/2010

(45) Data de Concessão: 08/06/2021

(54) Título: USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 36/63; A61P 17/02; A61P 9/10.

(30) Prioridade Unionista: 14/05/2009 ES P 200901296.

(73) Titular(es): SANIDAD Y RESIDENCIAS 21, S.A.; SERVICIO ANDALUZ DE SALUD; QUESPER R&D, S.L.,.

(72) Inventor(es): JOSÉ MANUEL QUESADA GÓMEZ; RAQUEL MARIA SANTIAGO MORA; ANTONIO CASADO DIAZ; MARIA DOLORES LUQUE DE CASTRO.

(86) Pedido PCT: PCT ES2010070327 de 14/05/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/130869 de 18/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/11/2011

(57) Resumo: USO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE OLIVEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE FERIDAS OU ÚLCERAS. Constitui o objeto da presente invenção a utilização de extratos de folhas de oliveira para a elaboração de uma composição farmacêutica com capacidades para induzir a angiogênese e vascularização. Esta composição pode ser utilizada em geral para aplicações terapêuticas onde se deseja promover a diferenciação de células-tronco para células endoteliais progenitoras (EPCs) e/ou células endoteliais maduras, bem como a indução da formação de vasos a partir dessas células endoteliais. Entre outras aplicações, as enfermidades cardiovasculares, os processos isquêmicos em geral, as úlceras e a cicatrização das feridas são patologias às quais se dirigirá esta composição angiogênica e indutora da vascularização, tanto no escopo da medicina como no veterinário.

USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
CAMPO E OBJETO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se enquadra no setor médico-farmacêutico e especificamente no campo técnico da promoção da angiogênese e vascularização, reparação endotelial e tratamento de feridas e úlceras.

[002] Constitui objeto da presente invenção a utilização de extratos de folhas de oliveira para a elaboração de uma composição farmacêutica com capacidade de induzir angiogênese e vascularização. Essa composição pode ser utilizada em geral para aplicações terapêuticas em que se queira promover a diferenciação de células-tronco para células endoteliais progenitoras (EPCs) e/ou células endoteliais maduras, assim como a indução da formação de vasos a partir dessas células endoteliais. Entre outras aplicações, as enfermidades cardiovasculares, os processos isquêmicos em geral, as úlceras e a cicatrização das feridas são patologias às quais se dirigirão esta composição angiogênica e indutora da vascularização tanto no escopo da medicina como no veterinário.

TÉCNICA ANTERIOR

[003] A formação e remodelação de vasos sanguíneos ocorrem nos processos denominados vasculogênese, angiogênese e arteriogênese. Carmeliet, P. (2004). "Manipulating angiogenesis in medicine." J Intern Med 255(5): 538-61. A vasculogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de células precursoras endoteliais (EPCs) que migram e se diferenciam de células endoteliais naqueles lugares onde se inicia a vascularização. A angiogênese consiste na formação de novas ramificações de capilares a partir de vasos

sanguíneos existentes. A arteriogênese, por sua vez, se refere ao remodelamento de uma artéria existente como consequência da sua adaptação ao fluxo sanguíneo.

[004] A arteriogênese difere da angiogênese em seu mecanismo. A primeira é produzida principalmente como consequência de estresse físico (p.ex., a ruptura ou obstrução de um vaso) e a segunda é produzida principalmente por hipoxia.

[005] Fisiologicamente, o organismo regula a angiogênese através de uma série de mecanismos que atuam como interruptores "on" e "off". Os interruptores "on" são conhecidos como fatores de crescimento angiogênico, enquanto os "off" são conhecidos como inibidores angiogênicos endógenos. Quando ocorre um aumento descontrolado e/ou excessivo da angiogênese, patologias como câncer, arteriosclerose e retinopatia diabética, entre outras, podem se desenvolver, enquanto uma diminuição da angiogênese favorece o desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares, processos isquêmicos em geral, úlceras e dificuldade na cicatrização de feridas, etc.

[006] O tratamento de patologias associadas a uma menor angiogênese compreende a utilização de fatores de crescimento que promovem a formação de vasos, como o fator de crescimento endotelial (EGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator-1 alfa indutor de hipóxia (HIF-1 α), FGF-4, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), a peptidase tecido calicreína (TK), ativadores dos receptores ativados por proteínas (PAR-ativadores), a trombina, a proteína "frizzled-A" e o óxido nítrico [Madeddu, P. (2005)].

"Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration." Exp Physiol 90(3): 315-26], entre outros.

[007] O uso dos fatores de crescimento como o VEGF, para o tratamento de processos isquêmico, não está ainda bem estabelecido porque é complicado aplicar a dosagem adequada e porque podem causar efeitos secundários como hipotensão e edemas teciduais. [Simons M. and Ware J.A. (2003) "Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov 2(11):863-71].

[008] Atualmente estão sendo também testadas terapias celulares com a aplicação de células-tronco ou EPCs para promover a angiogênese com fins terapêuticos [Tarzami, S. T. and J. P. Singh (2004) "Pharmacological revascularisation in coronary and peripheral vascular disease." Expert Opin Investig Drugs 13(10): 1319-26)]. As células-tronco, devido à sua plasticidade, podem se dividir em elementos vasculares e não vasculares, pelo que podem regenerar a parte danificada pela isquemia. Assim, por exemplo, no caso de infarto do miocárdio, tais células podem, adicionalmente, se dividir em miócitos, recuperando o tecido danificado.

[009] A estratégia da utilização de terapia celular apresenta o problema da perda de funcionalidade das EPCs poucas horas depois do transplante. Para diminuir esse fenômeno, foi proposto: 1) uma liberação local das células em lugar de uma liberação sistêmica, 2) administração de quimiocinas que promovam a mobilização das EPCs, 3) enriquecimento e expansão dos cultivos de EPCs e 4) aumento da funcionalidade das EPCs por modificação genética [Madeddu,

P. (2005). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration." Exp Physiol 90(3): 315-26].

[0010] A formação de novos vasos está implicada também na cicatrização de feridas, onde se distinguem várias etapas: angiogênese, depósito de colágeno, formação de tecido granular, epitelização e contração da ferida. Nos processos angiogênicos que ocorrem durante a cicatrização intervêm as EPCs [Eming, S.A., Smola, H., Krieg, T., Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs* 2002; 172, 105-17].

[0011] Em fases posteriores da cura da ferida, induz-se uma angiogênese adicional pelo incremento de VEGF no tecido danificado, com até vários dias após o dano [Karayiannakis AJ, Zbar A, Polychronidis A, Simopoulos C. Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res* 2003; 35, 492-6]; desse modo, no processo de cicatrização e reparação de feridas é fundamental a angiogênese e fatores relacionados. Da mesma maneira, a presença do fator VEGF, em determinadas concentrações, no meio de cultivo de células-tronco mesenquimais (MSCs), é a causa da diferenciação dessas células para células do endotélio [Liu, JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert JF, Fish RJ, Pernod G, Buehler L, Bounameaux H, Kruithof EK. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 826-34].

[0012] Em tumores o sistema vascular se desenvolve de forma desordenada e irregular. Conseqüentemente, o aporte sanguíneo no tumor é inadequado e provoca uma diminuição da eficácia de quimio e radioterapias [Jain, R. K. (2005).

"Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." Science 307(5706): 58-62]. Assim, atualmente as terapias mais inovadoras contra o câncer estão utilizando a ação combinada de agentes anti e pró-angiogênicos para reverter a anormalidade do sistema vascular no tumor [Ellis, L. M. and D. J. Hicklin (2008). "VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity." Nat Rev Cancer 8(8): 579-91]. Atualmente uma grande quantidade de extratos vegetais ricos em compostos antioxidantes está sendo estudada além da sua atividade antioxidante, por sua influência em distintos processos fisiológicos como inflamação, diferenciação celular, tumorigênese, angiogênese; por exemplo, a patente WO 2005/105127 descreve a utilização de um extrato de pele de frutas cítricas com capacidade de acelerar a cicatrização de feridas em ratos e promover a angiogênese.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0013] Na presente invenção descreve-se o uso de extrato de folhas de oliveira para serem utilizados sozinhos, em combinação com outros compostos ou com células-tronco, para o tratamento de patologias onde seja necessária a indução de angiogênese e vasculogênese.

[0014] Constitui objeto da presente invenção uma composição farmacêutica que contém extratos de folhas de oliveira, que satisfaçam a definição de extrato de folhas de oliveira publicada em Pharmeuropa Olive [(2007) Leaf dry extract Pharmeuropa 19(3): 510-511] para sua utilização na indução de angiogênese e vasculogênese.

[0015] Em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de extratos de folhas de oliveira para a preparação de uma composição farmacêutica.

[0016] Em outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de extratos de folhas de oliveira para a preparação de uma composição farmacêutica para a indução de angiogênese e vasculogênese e processos biológicos relacionados como cicatrização, reparação endotelial, processos isquêmicos, etc.

[0017] Em uma realização preferida, a composição farmacêutica usada se apresenta em forma de creme, pomada, bálsamo, solução, emulsão ou pomada para administração tópica.

[0018] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica compreende uma concentração inferior a 30% de extrato de folha de oliveira.

[0019] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica compreende entre 10^{-1} e 10^{-10} M de oleuropeína contida no extrato de folha de oliveira.

[0020] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica entre 1 e 8 vezes ao dia.

[0021] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica conjuntamente a outro produto.

[0022] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica pela primeira vez até 14 dias após a aparição do dano.

[0023] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica por meio de um adesivo transdérmico.

[0024] Em outro aspecto, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende extratos

de folhas de oliveira enriquecidos em polifenóis e/ou fatores estimulantes de angiogênese e vasculogênese.

[0025] Em uma realização preferida, a composição farmacêutica compreende adicionalmente células-tronco mesenquimais.

[0026] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se apresenta em forma de creme, pomada, bálsamo, solução, emulsão ou pomada para administração tópica.

[0027] Em uma realização preferida, a composição farmacêutica compreende uma concentração de extrato de folha de oliveira inferior a 30%.

[0028] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica entre 1 e 8 vezes por dia.

[0029] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica conjuntamente a outro produto.

[0030] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica por meio de um adesivo transdérmico.

[0031] Em outra realização preferida, a composição farmacêutica se aplica pela primeira vez até 14 dias após a aparição do dano.

[0032] Em um último aspecto, a presente invenção se refere a um método de tratamento e/ou prevenção de feridas ou úlceras que compreende a aplicação de uma composição farmacêutica conforme descrita anteriormente.

[0033] Especificamente, a composição que contém extratos de folhas de oliveira pode ser utilizada, sozinha ou associada a outras substâncias, na formação de células endoteliais derivadas de células-tronco mesenquimais e também na formação de vasos a partir de células endoteliais.

[0034] Constitui igualmente objeto da presente invenção a utilização de extratos de folhas de oliveira na preparação de uma composição farmacêutica para a indução de angiogênese e vasculogênese.

[0035] O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) é uma proteína sinalizadora implicada na vasculogênese (formação *de novo* do sistema circulatório) e na angiogênese (crescimento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). As ações do VEGF foram estudadas nas células do endotélio vascular, embora também causem efeitos sobre outros tipos celulares (por exemplo, estimula a migração de monócitos/macrófagos, neurônios, células epiteliais renais e células tumorais). *In vitro*, ficou demonstrado que a VEGF estimula a divisão e a migração de células endoteliais. O VEGF também é um vasodilatador e incrementa a permeabilidade vascular; originalmente tinha o nome de fator de permeabilidade vascular (*vascular permeability factor*).

[0036] O extrato de folha de oliveira usado na presente invenção tem a capacidade de estimular a síntese de VEGF e com isso a vasculogênese e angiogênese. Esses processos são o primeiro passo para a recuperação tecidual, uma vez que o extrato de folha de oliveira é capaz de promover a cicatrização em feridas e úlceras, especialmente as que aparecem em pacientes diabéticos e/ou de idade avançada.

[0037] A composição é preparada para administração oral, retal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, tópica, intratraqueal, intramuscular, intravenosa ou para inalação.

[0038] Como ocorre habitualmente na preparação de formulações farmacêuticas, a formulação da presente invenção incorporou, além do princípio ativo oleuropeína e/ou extrato de folhas de oliveira a diversas concentrações, todos aqueles ingredientes, convencionais para um especialista na prática galênica, que permitam as melhores propriedades de dosagem, conservação, penetração, biodisponibilidade de tais princípios ativos, para que os mesmos possam atuar com a máxima eficácia possível. Como exemplo, costumam incorporar estabilizantes, conservantes e antioxidantes.

[0039] Por exemplo, para o uso na pele, pode ser empregado como suporte das formulações bases já preparadas comercialmente, como emulsões de óleo em água e de água em óleo, e que têm excelente tolerância cutânea; também podem ser empregados, pelas características do produto, diversos tipos de gel. Nós utilizamos para avaliar em humanos o efeito do extrato de folhas de oliveira sobre feridas cutâneas, um creme de água em óleo e água gelificada às concentrações empregadas nos animais com resultados extraordinariamente favoráveis na totalidade dos casos tratados, como fica evidente nas fotos que se seguem.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0040] **Figura 1.** A e B comparam duas imagens de microscopia ótica de células-tronco mesenquimais. As células tratadas com extrato de folhas de oliveira, imagem B, formam estruturas tubulares típicas do processo angiogênico. Essas mesmas células sem tratamento com extrato de folhas de oliveira não são capazes de formar tais estruturas, imagem A.

[0041] **Figura 2.** Imagens obtidas com microscópio ótico comparando a formação de estruturas tubulares em

células HUVECs em meio endotelial sem tratamento (figura 2A), tratadas com VEGF (figura 2B) e tratadas com extrato de folhas de oliveira (figura 2C) sobre matrigel.

[0042] **Figura 3.** A mostra os resultados dos tratamentos realizados com o extrato de folhas e B os resultados dos tratamentos com oleuropeína pura. A evolução das feridas que receberam diretamente o tratamento é mostrada nos gráficos da direita, enquanto a evolução das que não receberam tratamento é mostrada nos gráficos da esquerda.

[0043] **Figura 4.** Mostra a resposta nas feridas de um animal em que foi administrado oleuropeína 10^{-7} M.

[0044] **Figura 5.** Mostra a resposta nas feridas de um animal em que foi administrado o extrato de folha de oliveira contendo 10^{-5} M de oleuropeína.

[0045] **Figura 6.** Mostra a evolução da úlcera em um paciente em quem se aplicou a composição da invenção, a partir do dia 0 (6.A) até o dia 11 (6.B).

EXEMPLOS

[0046] A atividade angiogênica dos extratos de folhas de oliveira que satisfazem um mínimo dos requisitos de extrato de folhas de oliveira publicados em *Pharmeuropa Olive* [(2007) Leaf dry extract *Pharmeuropa* 19(3): 510-511] fica demonstrada por meio de:

1) Evidências fenotípicas: após 15-28 dias de cultivo de células-tronco mesenquimais com extratos de folhas de oliveira, são formadas estruturas típicas de células endoteliais como micro-vasos.

2) Evidências de expressão de marcadores de membrana: O tratamento com extratos de folhas de oliveira provocam um

aumento de células com marcadores de superfície CD144 e VEGFR2.

3) Evidências de expressão de genes implicados na diferenciação endotelial: VEGF, PCAM, PDGFR e VEGFR1.

[0047] Estas evidências foram observadas nos seguintes exemplos.

1. Ensaios de indução e estímulo da angiogênese e vasculogênese.

Cultivo de células-tronco mesenquimais

[0048] As células-troncos mesenquimais obtidas de medula óssea humana foram expandidas e cresceram em meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) complementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM Ultraglutamina e com antibióticos. Quando as células estavam próximas da confluência, foram tratadas com extratos de folhas de oliveira. Como controle, uma parte das culturas não foi tratada.

[0049] As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e os meios foram trocados a cada 3 dias ao longo de todo o experimento.

Células endoteliais

[0050] A linha estabelecida de células endoteliais obtidas de cordão umbilical humano (HUVE) foi fornecida por Lonza Group, Ltd., Suíça; essas células foram expandidas em frasco com meio básico endotelial (EBM, Lonza) complementado com antibióticos e soro fetal bovino. Quando as células chegaram à confluência, foram subcultivadas. O meio foi trocado a cada 3 dias. Para levar a cabo essas experiências, foram utilizadas as células do 2º e 3º passes. Os tratamentos que receberam essas células foram:

- 1.- Extrato de folhas em diversas concentrações
- 2.- VEGF 10 µg/mL
- 3.- Controle, sem tratamento

Estudos de citometria de fluxo e anticorpos monoclonais

[0051] Para o estudo e análise dos marcadores celulares de membrana foram realizados ensaios de citometria de fluxo. As células foram lavadas com PBS + 3% soro fetal bovino, os anticorpos monoclonais anti-humanos conjugados, CD144-FITC e VEGFR2-PE, foram incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente. As células marcadas foram lavadas três vezes, ressuspensas em 0,5 ml de PBS e a marcação foi analisada com um citômetro de fluxo FACScan Caliber (Benton-Dickinson).

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

[0052] Para analisar a expressão de marcadores gênicos angiogênicos foi utilizada a PCR em tempo real. O RNA total das células foi obtido utilizando o reativo Tri Reagent (Sigma Aldrich) e seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de um micrograma de RNA total, que previamente havia sido tratado com DNAsal (Sigma Aldrich), utilizando o kit iScript TMcDNA Kit Síntese de Biorad. A PCR em tempo real utilizada para quantificar os mRMA analisados foi levada a cabo em um sistema Light Cyler (Roche) utilizando SYBR®Green. Essas reações foram realizadas em um volume final de 10 µL com 1 µL de cDNA, 10 pmol de cada primer e Quantitec® SYBR®Green máster mix (Qiagen). As condições para o Light-Cycler foram 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30s, 60°C durante 15s e 72°C

durante 30s. O ciclo limite (Ct) do gene alvo foi padronizado com o correspondente do gene constitutivo pGAPDH.

Angiogênese

[0053] Para levar a cabo os ensaios de angiogênese *in vitro* foi utilizado o kit Endothelial Tube Formation Assay, Cell Biolab Inc. As condições do ensaio são as que estavam indicadas nas instruções do provedor. Os meios utilizados foram o meio endotelial básico complementado sem tratar (controle negativo) e tratado com VEGF (controle positivo) ou com extrato de folhas de oliveira. As estruturas formadas foram marcadas mediante um anticorpo conjugado com calceína AM fornecida no kit, específico para os túbulos.

Resultados obtidos na diferenciação entre células-tronco mesenquimais e células endoteliais

[0054] A capacidade dos extratos de folhas de oliveira de promover a angiogênese em células-tronco está demonstrada na Figura 1, onde podem ser observadas as estruturas tubulares, características de células endoteliais obtidas por diferenciação de células-tronco mesenquimais tratadas com os extratos de folhas de oliveiras.

[0055] A análise por citometria dos marcadores de superfície característicos de células endoteliais, como são o CD 144 e VEGFR2, mostrou que estes se encontram em MSCs tratadas com extrato de folhas de oliveira, e em todos os casos analisados a porcentagem desses marcadores endoteliais nas células tratadas com os extratos mostram diferenças significativas com relação ao cultivo controle).

[0056] A expressão gênica de diferentes genes envolvidos na diferenciação endotelial como VEGF, PCAM, PDGFR

e VEGFR, mostrou um aumento com o tratamento com extrato de folhas de oliveira.

Resultados obtidos na indução de angiogênese em células endoteliais

[0057] A capacidade dos extratos de folhas de oliveira de promover a angiogênese em células endoteliais foi provada e avaliada mediante experimentos celulares em substrato de matrigel. As células endoteliais tratadas com extrato de folhas de oliveira apresentaram uma capacidade comparável ao VEGF de promover a formação de estruturas tubulares típicas da formação de vasos sanguíneos (Figura 2).

Comparação dos resultados com a técnica anterior

[0058] Como já foi dito em parágrafos anteriores deste documento, a angiogênese começa com um dado tecidual, o que provoca a ativação da proliferação das células endoteliais e a montagem das mesmas em estruturas tubulares ao redor das quais se formaram as novas paredes do vaso [Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis 2008 Biochemistry]. Os resultados aqui apresentados com os extratos de folhas de oliveira permitem propor a aplicação destes como fator angiogênico, devido à sua capacidade de diferenciar células-tronco para células endoteliais capazes de formar estruturas tubulares.

[0059] Os resultados obtidos com os extratos de folhas de oliveira como promotor de angiogênese são equiparáveis ou superiores aos do VEGF. Esse fator é um dos mais importantes agentes angiogênicos, e está envolvido nos estudos atuais cujo objetivo é encontrar terapias para patologias relacionadas à angiogênese como são as isquemias, ou a cicatrização de feridas, entre outras. Nos resultados apresentados os efeitos mostrados pelos extratos de folhas de

oliveira são semelhantes ou superiores aos mostrados pelo VEGF, o que dá respaldo à utilização destes como indutores angiogênicos [Jabbarzadeh, E. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. PNAS 2008]; [Guerrero, M., K. Athota et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor-165 gene therapy promotes cardiomyogenesis in reperfused myocardial infarction." J Interv Cardiol 21(3): 232-51]; [Michaels, J. T., M. Dobryansky, et al. (2005). "Topical vascular endothelial growth factor reverses delayed wound healing secondary to angiogenesis inhibitor administration." Wound Repair Regen 13(5): 506-12]; [Galiano, R. D., O. M. Tepper, et al. (2004). "Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells." Am J Pathol 164(6): 1935-47].

[0060] O tratamento de células-tronco mesenquimais humanas com extratos de folhas de oliveira propiciou a diferenciação destas células de células endoteliais, e mais ainda até células que foram capazes de formar as estruturas tubulares requeridas em todo o processo angiogênico e vasculogênico. Isto se encontra em consonância com o descrito por Alviano et al, entre outros, que mostraram o potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais de células endoteliais, sob a influência de fatores angiogênicos como o VEGF [Alviano, F., V. Fossati, et al. (2007). "Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro." BMC Dev Biol 7:11].

[0061] Os resultados obtidos tanto na expressão gênica de marcadores endoteliais como na análise dos marcadores de superfície das células-tronco mesenquimais diferenciadas de endoteliais com extratos de folhas e VEGF demonstram que o efeito indutor que têm esses extratos sobre as mesmas é comparável ao do VEGF, reconhecido indutor da diferenciação dessas células de endoteliais.

2. Testes de indução e estímulo da cicatrização.

2. a) Testes em animais

[0062] Foram utilizados ratos db/bd (BKS.Cg-m +/+ Lepr^{db}) fêmeas com idade de 10 a 12 semanas. Foram obtidas por meio do Charles River Laboratories (Spain), sendo que o peso médio dos animais quando recebidos era de 35,64g. Ao longo de todo o estudo os animais foram mantidos em espaços especialmente projetados para permitir o controle do ambiente dos animais, bem como a umidade relativa (30-70%), temperatura (22±2°C), pressão atmosférica, número de renovações e fotoperíodo (12/12 horas de luz/escuridão). O acesso a água foi "ad libitum" e a ração uma padrão para ratos seca e peletizada fornecida por PanLab (Barcelona, Spain). Após o período de aclimatação foi realizada uma divisão aleatória dos ratos em diferentes grupos de estudo. Neste estudo foram utilizadas três doses diferentes de um extrato do folhas de oliveira cuja riqueza em oleuropeína ETA de 41,5%; além disso, em outros grupos de animais, foi utilizada oleuropeína pura nas três concentrações utilizadas no extrato. Como substância de referência foi utilizado rhVegf (Sigma Aldrich) e como controle do experimento foi utilizado um grupo placebo; todos os compostos utilizados

neste estudo foram dissolvidos em PBS. As concentrações utilizadas neste teste estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composições administradas aos distintos grupos de estudo e suas respectivas concentrações.

Grupo	Substância de estudo	Concentração
A	Placebo (PBS)	
B	Extrato de folhas	10e-2M de oleuropeína
C	Extrato de folhas	10e-5M de oleuropeína
D	Extrato de folhas	10e-7M de oleuropeína
E	Oleuropeína	10e-2M de oleuropeína
F	Oleuropeína	10e-5M de oleuropeína
G	Oleuropeína	10e-7M de oleuropeína
H	VEGF (referência)	5µg.ml ⁻¹

[0063] No dia 0 do experimento foram feitas duas feridas excisionais de 6 mm no dorso de cada rato, sob condições assépticas e utilizando instrumental cirúrgico. Cada rato recebeu em uma das feridas (lado direito) o tratamento correspondente a seu grupo e no outro (lado esquerdo) nenhum recebeu tratamento. Os tratamentos foram administrados topicamente sobre as feridas, nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 do experimento. O processo de cura da ferida foi seguido e avaliado ao longo do experimento (ver figura 3).

[0064] Nos dias de administração do tratamento foram tiradas fotografias de ambas as feridas de cada rato para avaliação posterior (ver figuras 4 e 5). Para realizar o seguimento da cicatrização das feridas foi utilizado um procedimento de planimetria digital por meio do qual foi quantificada a área de cada ferida. As diferenças entre grupos foram determinadas mediante uma análise estatística Anova-two way, seguida de uma pós-análise de Bonferroni. Foram consideradas diferenças quando $p < 0,05$.

[0065] Os resultados destes experimentos mostram um efeito muito positivo dos extratos de folhas de oliveira na

cicatrização das feridas, semelhantes aos observados quando se utiliza a oleuropeína. Tanto a ferida que recebeu o tratamento (lado direito) como a que não recebeu (lado esquerdo) mostram um aumento de cicatrização (figura 3) que é estatisticamente significativo com relação ao controle (grupo A - tratamento com PBS em ambas as feridas).

[0066] Em todos os tempos avaliados e com as três doses de extratos de folhas analisadas, observa-se um efeito cicatrizante comparável ao produzido pelo VEGF em ambas as feridas. Mesmo no caso das feridas tratadas diretamente observa-se que a diferença com o grupo controle se inicia, aos dois dias, primeiramente com as três doses de extratos de folhas utilizadas, do que com o VEGF.

2.b) Testes em humanos

[0067] A formulação da invenção para aplicar em humanos pode ser preparada na sua forma mais simples ou elementar, dissolvendo o correspondente extrato de folhas de oliveira que contenha uma concentração conhecida de oleuropeína, em concentrações que vão de 10^{-2} M a 10^{-7} M, em uma mistura com gel de água, ou cremes hidratantes comerciais comuns, para lhes dar consistência e facilitar a aplicação local sobre a zona afetada da pele.

[0068] A avaliação das formulações citadas foi levada a cabo com pacientes idosos e/ou diabéticos com úlceras de diversos tipo etiológicos. Nenhum paciente apresentou hipersensibilidade aos extratos e com uma resposta positiva que começou a ficar evidenciada já nos primeiros dias de tratamento, sendo os resultados ótimos antes de se alcançar o mês de tratamento em todos os casos.

[0069] No que diz respeito aos efeitos adversos, apenas em alguns casos observamos rubor, mas em nenhum caso foi necessário suspender a administração do produto. A figura 6 mostra os resultados obtidos com um paciente.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizada por compreender o extrato da folha de oliveira e conter de 10^{-2} a 10^{-7} M de oleuropeína e ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de feridas e úlceras.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela composição ser na forma de creme, pomada, bálsamo, solução, adesivo transdérmico, emulsão ou unguento.

3. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela composição farmacêutica compreender menos de 30% de um extrato de folha de oliveira e conter de 10^{-2} a 10^{-7} M de oleuropeína.

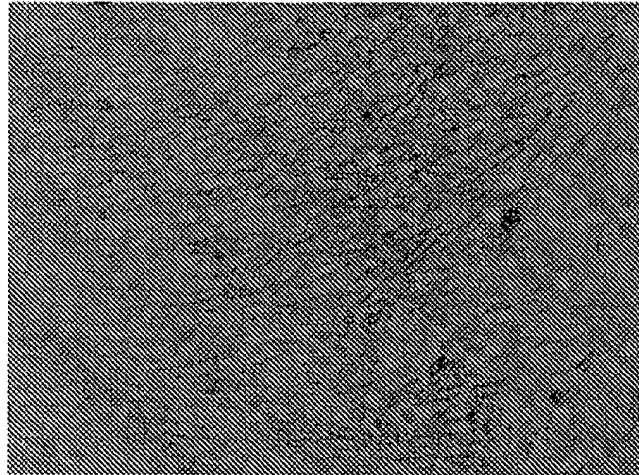
4. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela composição farmacêutica compreender de 1 a 10% de um extrato de folha de oliveira e conter de 10^{-2} a 10^{-7} M de oleuropeína.

5. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela composição farmacêutica compreender extrato de folha de oliveira e conter de 10^{-2} a 10^{-7} M de oleuropeína em combinação com polifenóis e/ou fatores estimulantes de angiogênese e vasculogênese.

6. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pela composição farmacêutica compreender extrato de folha de oliveira e conter de 10^{-2} a 10^{-7} M de oleuropeína em combinação com células-mãe mesenquimais.

1/6

FIG 1

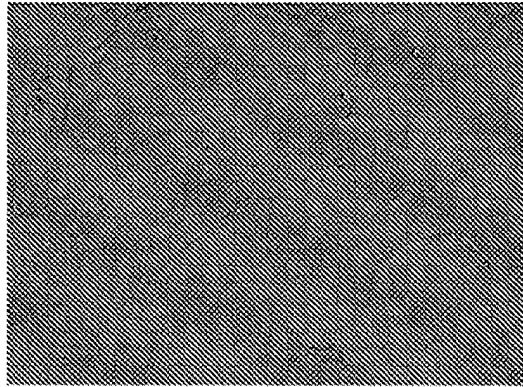


A

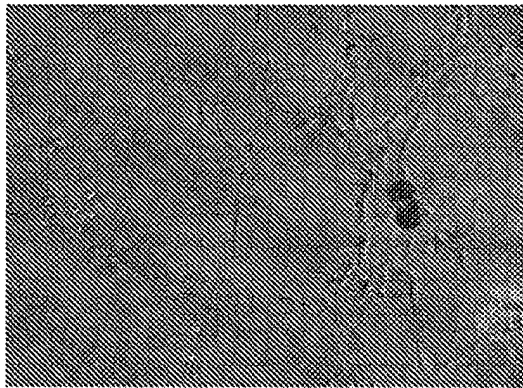


B

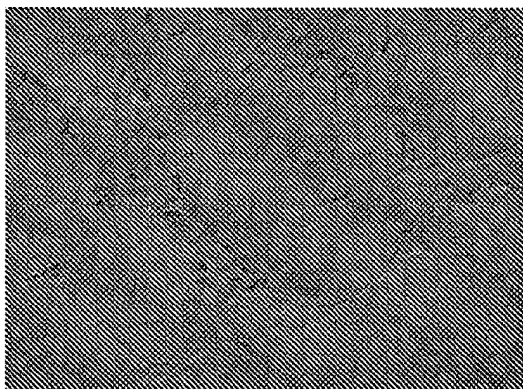
FIG 2



A



B



C

FIG 3

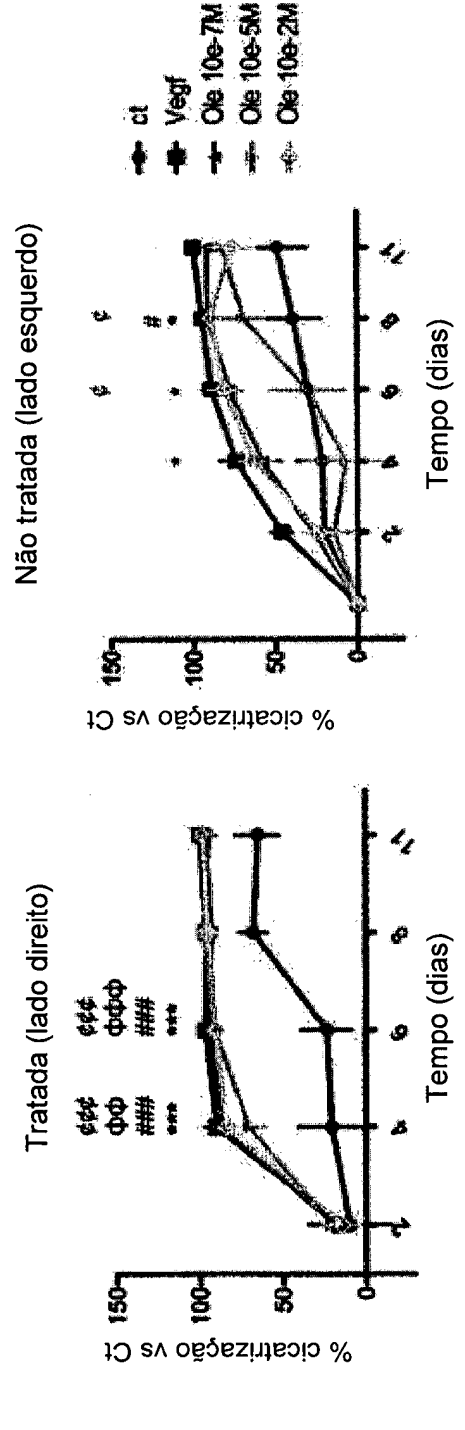
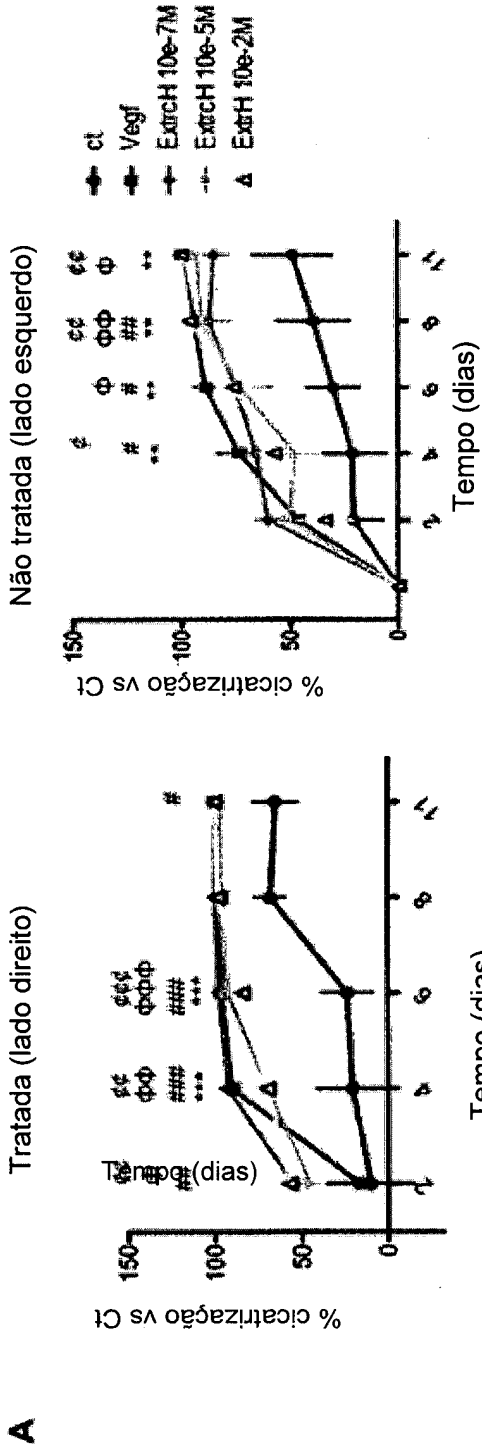


FIG 4



5/6

FIG 5

FCI/09/21/FT-Dia 11-C4



FIG 6

A)



B)

