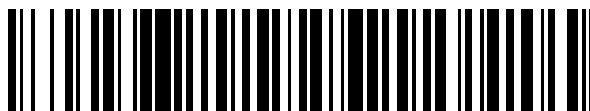


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 216**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

A61K 36/906 (2006.01)

A61K 36/9066 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007** **E 07752521 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013** **EP 1993365**

54 Título: **Formulaciones de curcuminoides biodisponibles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos relacionados con la edad**

30 Prioridad:

06.03.2006 US 779817 P

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

29.10.2013

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)

1111 Franklin Street, 12th Floor

Oakland, CA 94607-5200, US y

THE U.S. GOVERNMENT REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS (50.0%)

72 Inventor/es:

FRAUTSCHY, SALLY A. y

COLE, GREG M.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 427 216 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

Formulaciones de curcuminoides biodisponibles para el tratamiento de la enfermedad de alzheimer y otros trastornos relacionados con la edad

5

Campo de la invención

En general, la presente invención se refiere a composiciones de curcuminoides útiles para el tratamiento y la prevención de la enfermedad, en particular de las enfermedades relacionadas con la edad.

10

Antecedentes de la invención

La patogénesis de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson revela crecientes evidencias de daño oxidativo y factores inflamatorios. Lamentablemente, a pesar de una sólida epidemiología y justificación, por lo general los planteamientos con antioxidantes y AINE para estas enfermedades asociadas a la edad no han prosperado en la práctica clínica. Por ejemplo, la vitamina E ha fracasado en los ensayos sobre prevención de la enfermedad de Alzheimer y cardiopatías, mientras que los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) han fracasado en el tratamiento del Alzheimer y su uso se ha limitado a los esfuerzos de prevención con otros antioxidantes tradicionales (selenio, vitamina E, β caroteno), estrógenos e inhibidores de COX-2. La demografía del envejecimiento de nuestra población revela una necesidad urgente de alternativas adecuadas para la prevención y el posible tratamiento de una o más de las enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento.

15

20

25

En forma de extracto de turmérico, la curcumina es la sustancia amarilla que se utiliza en el curry como condimento alimentario, por ejemplo, en la mostaza amarilla. Al igual que la aspirina, el "remedio milagroso" que sigue siendo uno de los pocos agentes de prevención que han prosperado, el potencial a corto plazo que ofrece la curcumina para la salud tiene una larga historia y una base científica relativamente bien establecida. Ha sido identificado como un importante agente bioactivo en un sistema desarrollado empíricamente de la medicina tradicional india y china.

30

35

La curcumina (diferulometano) no solo es un potente agente antioxidante y antiinflamatorio natural, que actúa sobre mediadores proinflamatorios regulados por NF κ B y AP-1, entre los que se incluyen COX-2, iNOS, il-1 y TNF α , sino que también tiene numerosas actividades útiles y ha demostrado su potencial terapéutico en múltiples modelos de cultivos preclínicos y animales para enfermedades a menudo relacionadas con el envejecimiento. Entre estas enfermedades se incluyen el cáncer (colon, próstata, mama, piel, leucemia, etc.) (Agarwal et al., 2003), enfermedad priónica (Caughey et al., 2003), aterosclerosis (Miquel et al., 2002; Ramaswami et al., 2004), ictus (G. Sun, com. personal), toxicidad alcohólica sobre el SNC (Rajakrishnan et al., 1999), traumatismo cerebral (F. Gomez-Pinilla, com. personal en UCLA), enfermedad de Huntington (MF Chesselet, com. personal), Marie-Charcot Tooth (J. Lupski, com. personal), esclerosis múltiple (EAE), y enfermedad de Alzheimer.

40

45

50

La curcumina puede bloquear la agregación de A β y otros péptidos formadores de la placa amiloide a oligómeros y fibrillas tóxicas, quelar metales que causan daños oxidativos de los lípidos, las proteínas y el ADN en el cerebro, inhibir la inflamación aberrante a través de la transcripción de NF κ B y AP-1, estimular la fagocitosis microglial beneficiosa como la vacuna de amiloide para eliminar las placas de beta-amiloide del cerebro, e inhibir la producción de BACE en condiciones de inflamación y daño oxidativo, limitando así la producción de A β . La eficacia de amplio espectro para la enfermedad relacionada con la edad se ve acentuada por los datos positivos en materia de aumento de la esperanza de vida (Kitani et al., 2004). Basándose en su destacado perfil de seguridad y eficacia en múltiples modelos de enfermedades con daños oxidativos y factores inflamatorios, la curcumina ha demostrado un excelente potencial para la patogénesis de la enfermedad en modelos de Alzheimer. La curcumina se encuentra en la reducida lista de agentes útiles para la quimioprevención del cáncer que está desarrollando el Instituto Nacional contra el Cáncer estadounidense (NCI), que estudia la curcumina a través del Programa Nacional de Toxicología y ensayos preclínicos de eficacia y seguridad (Kelloff et al., 1996; Chainani-Wu, 2003). La curcumina se ha sometido a varios ensayos clínicos en fase I para el cáncer y en la actualidad es objeto de otros ensayos clínicos sobre el cáncer en múltiples centros de los Estados Unidos y de otros países.

55

60

65

La estructura de la curcumina se asemeja a la de los compuestos de unión a amiloide. (FIG. 1) Se sabe que los tintes de amiloide, como Congo Red (CR) se unen a través de subgrupos hidrófobos planares con una carga convenientemente separada y que suprimen la toxicidad y agregación de β -amiloide y otros péptidos dependientes de lámina beta. El análogo del Congo Red (CR), Chrysamine G, es más permeable en el cerebro y mantiene las propiedades de unión a amiloide del CR. La curcumina comparte la separación del CR de 19 angstrom entre sus grupos de fenoles polares, es muy permeable en el cerebro y se une a los péptidos amiloides, inhibiendo su agregación y toxicidad *in vitro*. Hemos descubierto que la curcumina reduce de forma efectiva la acumulación de amiloide *in vivo* en ratones APP Tg. Dado que la unión anti-amiloide del CR es genérica y potencialmente relevante para otros agregados intraneuronales de lámina beta, entre los que se incluyen el Huntington, a-sinucleína, priones y tau, la actividad anti-amiloide de la curcumina puede ser relevante más allá del amiloide extracelular para agregados intraneuronales. De hecho, la curcumina es uno de los compuestos anti-priones más efectivos que se han testado *in vitro*, aunque no funcionó *in vivo* con una dosis oral de una formulación no revelada (Caughey et al., 2003). Esto

aumenta las limitaciones de la biodisponibilidad oral de la curcumina, el objeto de la presente invención.

Se están estableciendo los beneficios de la curcumina como tratamiento para múltiples enfermedades con acumulación de proteínas amiloides y otros trastornos de repeticiones de CAG, y también se está empezando a entender su eficacia para el tratamiento del ictus, traumatismo craneal, síndrome metabólico y otros muchos trastornos, entre los que se incluyen algunas formas de cáncer y artritis, así como para promover la cicatrización de las heridas. No obstante, todas estas aplicaciones terapéuticas son limitadas debido a una mala absorción intestinal.

A pesar de que la curcumina es una medicación efectiva en múltiples modelos animales para enfermedades humanas cuando se administra en la comida a dosis elevadas (típicamente 2.000-5.000 ppm en la dieta en ensayos sobre el cáncer), en la actualidad se piensa que su biodisponibilidad es tan pobre que no se puede utilizar para el tratamiento fuera del colon en seres humanos. La curcumina es muy hidrófoba y, por lo general, no se disuelve cuando se administra en forma de extracto en polvo en los nutracéuticos comunes. La mayoría de las actividades de la curcumina requieren unos niveles de 100-2.000 nanomolares (0.1-2 micromolares) *in vitro*, aunque los suplementos actuales provocan unas concentraciones plasmáticas nanomolares insignificantes (véase Sharma et al., 2004). El grupo de R. Sharma de Leicester lo ha intentado en repetidas ocasiones y no ha conseguido unos niveles significativos en sangre, más allá del rango nanomolar bajo (Garcea G., Jones JD, Singh R., Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*. 8 de marzo de 2004; 90 (5): 1011-5. PMID: 14997198.) Estos, entre otros, concluyeron que la administración de concentraciones efectivas de curcumina oral en tejidos sistémicos (fuera del tracto GI) "probablemente no resulta viable". La mayor parte de la bibliografía comparte esta opinión, lo que ha llevado al NCI a concentrarse en el cáncer de colon.

Tres factores limitan la absorción de curcumina y deben ser abordados: 1) la rápida glucuronidación/sulfatación de grupos hidroxilo fenólicos de la curcumina y el elevado aclaramiento "de primer paso"; 2) la curcumina es inestable en solución acuosa a un pH 7 y superior; y 3) la curcumina es muy hidrófoba y normalmente no es soluble en agua a un pH ácido ni cuando se administra como polvo seco en suplementos existentes. (La mayor parte de la curcumina nunca es absorbida y simplemente pasa por el tracto GI y es excretada.)

La solubilización es crítica para evitar esto, pero la curcumina requiere un pH 8.5 para disolverse por completo. Por esta razón, a los pacientes de cáncer se les administran dosis elevadas, típicamente hasta 8 gramos al día. La diarrea es un efecto secundario habitual. Garcea, G. et al. (2004) informa de que los pacientes que reciben 3,6 gramos de curcumina al día (mediante una cápsula de extracto en polvo estándar suministrada por Sabinsa Corporation), alcanzan unos niveles insignificantes en sangre e hígado. Concluyen que "los resultados sugieren que las dosis de curcumina necesarias para alcanzar unos niveles hepáticos suficientes como para ejercer una actividad farmacológica probablemente no sean viables en seres humanos".

La curcumina no es soluble al pH ácido y se descompone cuando se solubiliza y se disuelve en agua a un pH neutro o alcalino (por ejemplo, en el tracto GI, después del intestino delgado), debido a las transformaciones ceto-enol en el puente de β -dicetona. Por otra parte, la curcumina es susceptible de una rápida glucuronidación/sulfatación. El principal proveedor de los Estados Unidos, Sabinsa, ha intentado fabricar una forma más biodisponible, añadiendo bioperina (en desarrollo) para inhibir la glucuronidación. Sin embargo, este planteamiento es erróneo, porque la mayor parte de la glucuronidación se produce en el tracto GI superior, donde el pH es ácido, y la curcumina no se disuelve por completo hasta un pH 8.5 y superior. Todavía peor, la inhibición de la glucuronidación puede provocar graves riesgos para la salud. La glucuronidación protege frente a muchas toxinas y contribuye al metabolismo de fármacos de uso común. La mayoría de los pacientes de edad avanzada reciben múltiples fármacos, a unos niveles que es probable que se vean alterados de forma poco segura mediante la inhibición de la glucuronidación.

A pesar de que muchos grupos han planteado ideas teóricas para mejorar la absorción de la curcumina, la mayoría han formado parte de estudios completamente *in vitro*, probablemente debido a la dificultad que implica medir la curcumina y sus metabolitos en el tejido. Nuestras instalaciones, conocimientos y experiencia en la medición de la curcumina y la tetrahidrocurcumina han permitido un planteamiento mejor.

Resumen de la invención

De conformidad con las reivindicaciones, la presente invención proporciona composiciones de curcumina que presentan una biodisponibilidad mejorada y que se pueden emplear como agentes terapéuticos para tratar (y posiblemente ralentizar o prevenir) una serie de enfermedades y trastornos asociados a la edad. En un aspecto de la invención, una composición de curcuminoides que ofrece una biodisponibilidad mejorada comprende un curcuminóide, un antioxidante y un vehículo farmacéuticamente aceptable solubilizante en agua y, opcionalmente, un inhibidor de la glucuronidación. En una realización, la solubilización se consigue formando micelas de curcuminóide-lípido y la composición se proporciona en forma de una microemulsión o nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). En otra realización, el curcuminóide se disuelve en un aceite comestible, que posteriormente puede ser microencapsulado o emulsionado. La composición se puede proporcionar en forma de gel, cápsula, líquido y otra forma farmacéuticamente aceptable.

De conformidad con las reivindicaciones, la invención también proporciona composiciones de curcuminoides para su uso en un método de tratamiento, ralentización y/o prevención de la enfermedad, particularmente de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad, como el Alzheimer, y comprende la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un curcuminoide solubilizado, resistente a la hidrólisis y, opcionalmente, resistente a la glucuronidación, de acuerdo con las reivindicaciones. Las dosis funcionales de curcuminoides se pueden administrar a mamíferos, como ratas, ratones y humanos, empleando una composición de curcuminoides mejorada, tal y como se describe en el presente.

Breve descripción de las ilustraciones

Estas y otras características y ventajas de la invención se entenderán mejor cuando se consideren conjuntamente con la siguiente descripción detallada y consultando las ilustraciones adjuntas, donde:

La FIG. 1 ilustra las estructuras moleculares y la similitud de la separación molecular de Congo Red, curcumina y Chrysamine G;

La FIG. 2 es un gráfico de la absorbancia frente al tiempo para la actividad de protección del antioxidante (estabilización) de diversas formulaciones de curcumina, tetrahidrocurcumina y ascorbato;

La FIG. 3 es un gráfico de la concentración de ascorbato frente al tiempo para diversas formulaciones de curcumina y ascorbato, a 450 nm;

La FIG. 4 es un gráfico similar al de la FIG. 3, pero con la absorbancia medida a 405 nm.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con las reivindicaciones, la presente invención proporciona composiciones de curcuminoides que presentan una biodisponibilidad mejorada. En un aspecto, esta composición comprende un curcuminoide, un antioxidante (que estabiliza el curcuminoide frente a la hidrólisis), un solubilizante en agua, un vehículo farmacéuticamente aceptable e, idealmente, un inhibidor de la glucuronidación. En algunas realizaciones, por ejemplo cuando el curcuminoide es tetrahidrocurcumina, que es estable incluso a un pH alcalino, se puede dispensar con el antioxidante. En diversas divulgaciones, la composición se proporciona en forma de microemulsión, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), aceite microencapsulado, gel, cápsula, líquido y/u otra forma farmacéuticamente aceptable, y es adecuada para su administración a un ser humano u otro mamífero por vía entérica, parenteral, tópica o por algún otro modo de administración.

Algunos ejemplos de curcuminoides, a título meramente enunciativo, incluyen la curcumina, tetrahidrocurcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, ésteres de curcumina (que funcionan como profármacos) y combinaciones de los mismos. La combinación de curcumina y su metabolito, tetrahidrocurcumina, resulta particularmente efectiva. La tetrahidrocurcumina es relativamente estable en agua a un pH fisiológico, es un inhibidor competitivo de la glucuronidación, mejora la absorción y, en última instancia, los niveles plasmáticos de curcumina.

Para proteger el curcuminoide frente a la hidrólisis, se emplea un antioxidante soluble en agua. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, incluyen el ácido ascórbico (ascorbato, vitamina C y sus derivados acilados solubles en agua), ácido α -lipoico (alfa-lipoato), vitamina E y derivados, N-acetilcisteína (NAC), y glutatión reducida (GSH). Incluso la tetrahidrocurcumina proporciona a la curcumina cierta protección frente a la hidrólisis. También se pueden emplear mezclas de antioxidantes.

La mayoría de los esfuerzos anteriores por explicar la mala biodisponibilidad de la curcumina se han centrado en la rápida glucuronidación. Sin embargo, la tetrahidrocurcumina y la curcumina son similarmente hidrófobos y poco solubles en agua, además de someterse a glucuronidación y sulfatación de forma igualmente rápida. No obstante, nuestros datos y los datos de la bibliografía demuestran que la tetrahidrocurcumina presenta una biodisponibilidad mucho mayor que la curcumina, con unos niveles plasmáticos derivados de las mismas dosis orales entre 7 y 8 veces superiores. La biodisponibilidad mejorada de la tetrahidrocurcumina se atribuye en gran medida a que es estable incluso a un pH básico. Por lo contrario, la curcumina es inestable en soluciones acuosas con un pH superior a 7.0 y, por tanto, es inestable en el tracto intestinal, donde se produce principalmente la absorción. Se hidroliza a productos de degradación del ácido ferúlico y la vanillina. Se prevé que un preparado que estabiliza la curcumina a un pH ligeramente más básico incrementará la biodisponibilidad de la curcumina solubilizada hasta 7 u 8 veces. La combinación de curcumina con un antioxidante adicional soluble en agua, como el ascorbato, puede estabilizar la curcumina a un pH de 7.4.

Hemos testado diluciones en serie de ascorbato y pensamos que la estabilización es efectiva hasta 4 horas (un ciclo de absorción típico) con unos ratios de curcumina/ascorbato de hasta 16:1, produciéndose una ligera reducción de la eficacia entre 8:1 y 16:1. Por tanto, el suministro de un ratio de curcuminoide/antioxidante de aproximadamente 10:1 o superior sería suficiente para evitar la hidrólisis durante la absorción y mejorar la biodisponibilidad. A modo de ejemplo, meramente enunciativo, un preparado que contiene 330 mg de curcumina (MW 368) tendría solamente

17,75 mg adicionales de ascorbato (MW 198). Por tanto, no es necesario añadir una cantidad prohibitiva de antioxidante al conjunto de una formulación.

Algunos ejemplos de inhibidores de la glucuronidación incluyen la tetrahidrocurcumina, piperina (Bioperine®), probenecid (Probene®), y diclofenaco. (Véase, por ejemplo, Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, Gardner-Stephen D, Galetin A, Houston JB, Miners JO. Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *DrugMetab Dispos.* 2004 Apr;32(4):413-23; Vree TB, van den Biggelaar-Martea M, Verwey-van Wissen CP, van Ewijk-Beneken Kolmer EW. Probenecid inhibits the glucuronidation of indomethacin and O-desmethylindomethacin in humans. A pilot experiment. *Pharm World Sci.* 1994 Feb 18;16(1):22-6.) También se pueden emplear mezclas de inhibidores. La curcumina y la tetrahidrocurcumina se eliminan rápidamente mediante la glucuronidación de primer paso y se ha documentado que la glucuronidación con piperina mejora la biodisponibilidad de curcumina en seres humanos. No obstante, la adición de un inhibidor de la glucuronidación plantea problemas de interacciones con otros muchos fármacos que se eliminan a través de la glucuronidación. La presente invención puede mejorar la biodisponibilidad con este inhibidor, aunque se incluye como componente opcional en algunas formulaciones.

A pesar de su reducida biodisponibilidad, la administración oral de curcumina *in vivo* puede inhibir de forma competitiva y temporal la glucuronidación de otros fármacos, como el ácido micofenólico. (Basu et al Nikhil K. Basu, Labanyamoy Kole, Shigeki Kubota, and Ida S. Owens, Human UDP-Glucuronosyltransferases Show Atypical Metabolism of Mycophenolic Acid and Inhibition by Curcumin. *Drug Metabolism and Disposition* 32:768-773, 2004). Se prevé que la tetrahidrocurcumina, que ofrece unos niveles entre 7 y 8 veces más elevados, ofrecerá una biodisponibilidad y estabilidad mucho mayores y que, por tanto, será más efectiva que la curcumina. Por otra parte, se prevé que la tetrahidrocurcumina protegerá a la curcumina frente a la glucuronidación. Asimismo, los datos de nuestro bioensayo *in vitro* muestran que, a unos ratios de 1:1, la tetrahidrocurcumina y la curcumina establecen sinergias juntas *in vitro*. Por tanto, la formulación de tetrahidrocurcumina con curcumina a unos ratios molares de 1:1 o superiores mejorará la biodisponibilidad de la curcumina y proporcionará una eficacia asociada a la sinergia.

La glucuronidación y sulfatación de curcuminoides también se puede inhibir esterificando un ácido graso u otro grupo acilo con uno o ambos hidroxilos en los dos grupos metoxifenol que son los objetivos de la glucuronidación y sulfatación enzimáticas rápidas. Los grupos éster de bloqueo serán eliminados entonces del éster del profármaco de curcuminoides *in vivo* mediante esterasas en los tejidos diana, proporcionando curcumina libre. En principio, se puede utilizar cualquier ácido graso para la esterificación. Dado que nuestros datos demuestran sinergias efectivas *in vivo* entre el ácido graso omega-3 y el ácido docosahexaenoico (DHA) y la curcumina en un modelo de Alzheimer, el DHA resulta una opción atractiva. El DHA no solamente es asimilado selectivamente por el cerebro, donde la curcumina es neuroprotectora en múltiples sistemas, sino que también puede dirigir los fármacos hacia las células tumorales, un objetivo clínicamente importante de la curcumina. (Para el uso de DHA dirigido a los fármacos para el cáncer lipofílico contra las células tumorales, véase Bradley MO, Swindell CS, Anthony FH, Witman PA, Devanesan P, Webb NL, Baker SD, Wolff AC, Donehower RC, Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel. *J Control Release.* 6 de julio de 2001;74(1-3):233-6; Harries M, O'Donnell A, Scurr M, Reade S, Cole C, Judson I, Greystoke A, Twelves C, Kaye S; Phase I/II study of DHA-paclitaxel in combination with carboplatin in patients with advanced malignant solid tumors. *Br J Cancer.* 1 de noviembre de 2004; 91(9): 1651-5.) Asimismo, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el DHA favorecen la administración del fármaco en los linfáticos, lo que reduce los problemas del metabolismo de primer paso. Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como el DHA, incrementan la administración del fármaco en el sistema linfático, lo que reduce los problemas de metabolismo de primer paso.

De este modo, resulta posible sintetizar un "profármaco" de DHA-curcuminoides a partir de un curcuminoides (como curcumina) y un DHA, uniendo el DHA a la curcumina en un hidroxilo fenólico con una estequiometría de 1:1, análoga a la empleada por Bradley et al 2001 para el paclitaxel. (Bradley MO, Webb NL, Anthony FH, Devanesan P, Witman PA, Hemamalini S, Chander MC, Baker SD, He L, Horwitz SB, Swindell CS. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. *Clin Cancer Res.* Octubre de 2001; 7(10):3229-38.) Alternativamente, el DHA se puede unir a la curcumina mediante un programa de múltiples pasos, análogo al empleado para unir la doxorubicina a la curcumina (Wang Y, Li L, Jiang W, Yang Z, Zhang Z. Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 de junio de 2006; 16(11):2974-7.) Los ésteres de DHA-curcumina proporcionarán un DHA neuroprotector y una curcumina neuroprotectora con una vida útil superior y una biodisponibilidad mejorada.

Más generalmente, un éster curcuminoides, de conformidad con un aspecto de la invención, puede comprender el producto de esterificación de un curcuminoides y un ácido carboxílico RCOOH, donde R se selecciona de forma que el éster resultante no sea tóxico y esté sujeto a clivaje mediante una esterasa *in vivo*. Una clase preferible de ácidos carboxílicos a tal efecto son los ácidos grasos, especialmente los ácidos grasos esenciales, como el DHA (un ácido graso omega-3). Los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos son otros ejemplos de ácidos carboxílicos adecuados para la producción de profármacos de curcuminoides.

El curcuminoide se solubiliza utilizando cualquier número de vehículos solubilizantes en agua. Para los fines del presente, "vehículo solubilizante en agua" se refiere a un agente, composición, compuesto o medio que proporciona un curcuminoide en una forma más soluble en agua o dispersable en agua, o que interactúa con el curcuminoide para imprimir una mayor dispersabilidad o solubilidad en agua. En términos generales, dos ejemplos de categorías de vehículos incluyen las micelas lipídicas y los aceites microencapsulados.

Las micelas lipídicas que contienen un curcuminoide se pueden fabricar con cualquiera de una variedad de lípidos. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, incluyen (i) ácidos grasos, como ácido esteárico; (ii) fosfolípidos, por ejemplo, fosfoglicéridos, como fosfatidilcolina ("PC"); fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol; (iii) ácidos biliares, por ejemplo, ácido desoxicólico (desoxicolato) y conjugados de los mismos (por ejemplo, conjugados de aminoácidos, como glicocolato y taurocolato); (iv) aceites comestibles, especialmente aceites saludables, por ejemplo, aceites vegetales, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de pescado; (v) triglicéridos; (vi) mezclas de cualquiera de estos y/u otros lípidos y derivados, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos y conjugados de los mismos. La combinación de un fosfolípido (por ejemplo, PC o lecitina de soja o lecitina de huevo) y otro tensioactivo, como ácido biliar/sal (por ejemplo, desoxicolato, taurocolato); copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno (Poloxámero 188, Poloxámero 182, Poloxámero 407, Poloxamina 908), o copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno de sorbitán (Polisorbato 20, Polisorbato a60, Polisorbato 80)) resulta particularmente útil. Otros lípidos útiles incluyen la lecitina natural (una mezcla de glicolípidos, triglicéridos y fosfolípidos, incluyendo PC). Por lo general, se prefieren los compuestos de cadena larga a los compuestos de cadena corta cuando la composición se proporciona en forma de emulsión.

En una realización, se preparan las micelas utilizando un protocolo modificado de Began et al 1999. (Began G, Sudharshan E, Tjdaya Sankar K, Appu Rao AG. Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: A spectrofluorometric study. J Agric Food Chem., diciembre de 1999; 47(12):4992-7.) De este modo, las micelas de PC-curcumina se pueden preparar utilizando una mezcla de fosfatidilcolina (PC) y desoxicolato (DOC), a un ratio molar de DOC/PC de 2.0. Se añade curcumina (10 mg) a la mezcla de DOC/PC, se solubilizan juntos en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 por volumen). Posteriormente se evapora la mezcla y se seca con nitrógeno. La película fina resultante es resuspendida en 2 ml de solución tampón de fosfatos (PBS), a un pH de 7.4 y, a continuación, la solución (5 mg/ml) se somete a ultrasonidos durante 5 minutos utilizando un baño de ultrasonidos.

Began et al realizó todos los experimentos *in vitro* utilizando un ratio molar de 2:1 de DOC/ PC, y averiguó que las micelas se saturaban de curcumina a un ratio molar de 6:1 o 7:1 de PC/curcumina. Por lo contrario, en una realización de la invención, las micelas se forman con un ratio molar de DOC/PC de 3,7:1 y un ratio molar de PC/curcumina de 1:3,33 (véase el Ejemplo 1). En general, se emplean ratios de tensioactivo/lípido (por ejemplo, ratios de DOC/PC) de 1:1 a 4:1. Teóricamente, la biodisponibilidad se puede continuar mejorando mediante el aumento del ratio de PC/curcumina, hasta un ratio de saturación de 6:1, pero el volumen de PC reducirá la cantidad de curcumina que se puede obtener por cápsula de 1 gramo.

En algunas realizaciones, las micelas también contienen uno de los antioxidantes, o ambos, y el inhibidor de la glucuronidación. Alternativamente, los dos últimos componentes se añaden a la composición tras la formación de la micela. En cualquiera de los casos, las micelas se pueden administrar en diversas formas clínicamente viables (por ejemplo, diluidas en salino y administradas en forma de líquido; conjugadas con un aglutinante y otros excipientes, y administradas en forma de cápsula, etc.).

También resulta posible formar micelas lipídicas *in vivo*, por ejemplo disolviendo un curcuminoide en un aceite comestible, añadiendo un antioxidante y un inhibidor de la glucuronidación; microencapsulando los componentes combinados y permitiendo que los ácidos biliares formen micelas *in vivo*.

La segunda categoría amplia de "vehículos solubilizantes en agua" son los aceites microencapsulados, en los que las microgotas de un aceite no tóxico, preferiblemente un aceite comestible, en especial aceites saludables (por ejemplo, aceites vegetales, aceite de oliva, aceite de colza y aceite de pescado) se rodean de un revestimiento, una ampolla u otra membrana que sea soluble en agua o se descomponga en agua. Los aceites microencapsulados son conocidos en el campo farmacéutico y se pueden preparar mediante diversos métodos, incluyendo el revestimiento por suspensión en aire, la extrusión centrífuga, la boquilla de vibración y el secado por atomización. En una realización, el revestimiento se disuelve o se descompone en el tracto GI con cinética de orden cero o cinética de primer orden. Los aceites microencapsulados se pueden administrar por vía oral (por ejemplo, con la formulación deseada para proporcionar una cápsula u otro sistema de administración) o mediante otra vía de administración apropiada. Las partículas se pueden estabilizar con polisorbato 80, por ejemplo, cápsulas de gel estándar o también se pueden utilizar cápsulas de gel recubiertas de quitosán para contener las formulaciones y promover la administración intestinal.

En otra realización de la invención, la composición se proporciona en forma de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), que se pueden administrar mediante diversas formas clínicas, por ejemplo en cápsulas de gel, o mediante la formulación con uno o más aglutinantes u otros excipientes. La preparación de SLN es conocida en el campo. Véase, por ejemplo, Luo, Y., Ren, L., Zhao, X., Qin, J., Solid Lipid Nanoparticles For Enhancing Vinpocetine's Oral

Bioavailability, J. Controlled Release, 114 (2006) 53-59 (disponible en línea, en www.sciencedirect.com).

Algunos ejemplos ilustrativos de lípidos adecuados para la SLN incluyen: triacilgliceroles, como tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, tristearina; acilgliceroles, como monoestearato de glicerol, behenato de glicerol, palmitoestearato de glicerol; ácidos grasos, como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido decanoico, ácido behénico; ceras, como palmitato de cetilo; complejos cíclicos, como ciclodextrina, para-acil-calix-arenos; y combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen los siguientes: fosfolípidos, como lecitina de soja, lecitina de huevo, fosfatidilcolina; copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, como Poloxámero 188, Poloxámero 182, Poloxámero 407, Poloxamina 908; copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno de sorbitán, como Polisorbato 20, Polisorbato 60, Polisorbato 80; polímeros de alcohol polieter alquilarilo, como tiloxapol.

Algunos ejemplos de cotensioactivos adecuados incluyen los siguientes: colato de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio.

Existen múltiples maneras de preparar formulaciones de SLN. Solamente a modo de ejemplo general, se puede utilizar la homogeneización por calor, que consiste en calentar un lípido aproximadamente a 10 grados por encima de su temperatura de fusión, añadir un fármaco lipofílico y disolverlo en el lípido, añadir un tensioactivo a un ratio tensioactivo/lípido de 1:1 a 2:1, enfriar la combinación y, a continuación, dispersarla por ultrasonidos (tamaño de partícula típico: ~ 100 nm). Este método se puede reproducir a mayor escala con facilidad. (Sin embargo, los métodos de evaporación son más difíciles de reproducir a mayor escala.) Por lo general, en el caso de tensioactivos como la lecitina, el desoxicolato, taurocolato o tensioactivos comerciales como Tureen 80 y aceite de ricino hidrogenado polioxietileno (Cremaphor), al incrementar el ratio de tensioactivo/lípido hasta 1,5:1,75 o incluso 2:1 tiende a reducirse el tamaño de las partículas y a mejorar la absorción. Los tensioactivos naturales son preferibles, al menos en parte, porque la curcumina se comercializa normalmente como nutraceutico y existe la percepción de que "lo natural" es más seguro.

Eficacia. *In vivo*, los datos adquiridos de la administración a ratones de curcumina recién disuelta en una base (0,5M de NaOH) y diluida rápidamente en una PBS neutralizante (donde se mantiene estable), administrada mediante sonda o por vía i.p. o i.m., demostraron que los niveles plasmáticos en el rango micromolar de 0,25-0,5 proporcionaban unos niveles cerebrales suficientes como para alcanzar las IC₅₀ para una inhibición de -50% de IL-1β proinflamatoria, iNOS y una quinasa MAP asociada a la muerte celular (quinasa c-Jun activa (p)JNK).

Estableciendo una comparación, basada en peso de fármaco/peso corporal, que generalmente exagera las dosis en seres humanos, esto supone 1 mg/30 g = 33,3 mg/kg y se traduce aproximadamente en 2,5 g para una persona de 75 kg, lo que se encuentra dentro del rango administrado a los pacientes en ensayos clínicos.

De este modo, un ejemplo de una formulación práctica que combina los tres principios (solubilización con lípido, protección con antioxidante e inhibición competitiva y sinergia con tetrahidrocurcumina) para seres humanos sería 165 mg de curcumina, 165 mg de tetrahidrocurcumina, 17,7 mg de antioxidante estabilizante (ascorbato, lipoato, NAC, GSH, etc.), y el resto de micelas de DOC/PC como se ha mencionado anteriormente o en forma de otros lípidos anfifílicos, de una cápsula de 1 g. También pueden estar presentes aglutinantes, adyuvantes de procesamiento y otros excipientes.

A continuación se recogen formulaciones de curcuminoide seleccionadas que se pueden preparar de conformidad con la presente invención.

Fórmula 1. Micelas de curcumina/tetrahidrocurcumina con PC-DHA

Curcumina, tetrahidrocurcumina (favorece la absorción, establece sinergias con la curcumina), fosfatidilcolina (emulsiona, forma micelas con sales de desoxicolato, favorece notablemente la absorción), ácido docosahexaenoico (de aceite marino, establece sinergias con la curcumina, facilita la administración de curcumina en el cerebro o los tumores), un antioxidante o combinación de antioxidantes (vitamina C o vitamina C lipídada, ácido alfa-lipoico, vitamina E) (empleados para estabilizar y reciclar la curcumina, manteniendo su estabilidad y evitando que se convierta en un prooxidante en la cápsula o en el organismo).

Fórmula 2. Micela de curcumina con PC-DHA

Curcumina (nosotros hemos determinado que el 25% de los curcuminoideos en plasma se convierten naturalmente en tetrahidrocurcumina, que favorece la absorción y establece sinergias con la curcumina), fosfatidilcolina, ácido docosahexaenoico, un antioxidante o combinación de antioxidantes (vitamina C o vitamina C lipídada, ácido alfa-lipoico, vitamina E).

Fórmula 3. Curcumina con DHA/aceite de oliva

Curcumina, ácido docosahexaenoico, un antioxidante o combinación de antioxidantes (vitamina C o vitamina C

lipidada, ácido alfa-lipoico, vitamina E). Nuestros datos revelan que cuando la curcumina se disuelve en aceite, la curcumina plasmática se mantiene en niveles bajos, aunque la curcumina en glóbulos rojos se mantiene bastante elevada, lo que explica la biodisponibilidad a pesar de unos niveles plasmáticos insignificantes. Ningún otro grupo ha documentado esta observación fundamental, que parece ser el método más sencillo de fomentar la biodisponibilidad.

Se pueden emplear otros aceites saludables (aceite de pescado, aceite de colza, otros aceites con un elevado contenido en omega-3). En esta formulación, la curcumina disuelta en aceite puede ser microencapsulada.

Fórmula 4. Éster de curcumina-DHA

Profármaco. Un nuevo compuesto que resuelve los problemas de la biodisponibilidad de curcumina y de la eficacia en seres humanos, que ofrece una absorción oral óptima, actividades antioxidantes en el cerebro, propiedades antiinflamatorias (por ejemplo, el DHA reduce la producción y acumulación de amiloide), y resistencia a la glucuronidación. La composición puede ser en forma de micela, SLN u otra formulación.

Fórmula 5. Éster de curcumina-DHA y éster de tetrahidrocurcumina-DHA

Otro profármaco con estabilidad y disponibilidad oral mejoradas.

Fórmula 6. Curcumina-SLN

Utilizando grasas con un punto de fusión elevado, se pueden producir formulaciones de curcuminoide solubilizadas y resistentes a la hidrólisis en forma de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) clínicamente viables, con un lípido en fase interna, un fármaco (curcuminoide), un tensioactivo y un cotensioactivo.

Además de las composiciones aquí proporcionadas, la invención proporciona asimismo un método para tratar diversas enfermedades, particularmente neurodegenerativas, enfermedades asociadas con la edad, como la enfermedad de Alzheimer. En una realización, el método comprende la administración a un ratón, una rata, un ser humano u otro mamífero de una dosis efectiva de un curcuminoide, donde el curcuminoide se proporciona en forma de una composición aquí descrita, por ejemplo, en forma de micelas lipídicas, aceites microencapsulados, SLN, etc., y opcionalmente en forma de gel, cápsula o líquido. Para los seres humanos, la mayoría de las actividades de la curcumina requieren unos niveles de 100-2.000 nanomolares (0,1-2 micromolares).

La inclusión de un lípido solubilizante aumenta en gran medida los niveles de curcumina en plasma y glóbulos rojos. En un experimento, se prepararon micelas de DHA/lecitina en una proporción de 1:1, poniendo la curcumina en DHA caliente (55°C) y someténdola a ultrasonidos para dispersar la curcumina proporcionada por las micelas de PC-DHA (pero sin un antioxidante ni un inhibidor de la glucuronidación independiente), y se consiguió una concentración de curcumina de 0,29 mg/ml en plasma y de 0,96 en glóbulos rojos (0,8 y 2,6 mm, respectivamente). Por lo contrario, utilizando la formulación de Sabinsa (con piperina, pero sin vehículo solubilizante en agua) se obtuvo una concentración de curcumina de 0,17 mg/ml en plasma (0,46 mm). Los ácidos grasos de cadena larga, particularmente los insaturados como el DHA, han añadido valor en lo que respecta al direccionamiento de los fármacos lipofílicos al sistema linfático y a la reducción de las pérdidas elevadas en el metabolismo de primer paso.

Ejemplos

A continuación se incluyen ejemplos ilustrativos de la invención, su preparación y su uso *in vivo*.

Materiales

El ácido esteárico, la L-fosfatidilcolina (lecitina), el taurocolato de sodio, el desoxicolato y el agua nanopura doblemente destilada (dd) son de Sigma. El DHA y la curcumina (97%) son de Cayman Quemicals (Michigan, MI). La tetrahidrocurcumina (99%) es de Sabinsa Corporation (Piscataway, NJ).

Protocolo general para nanopartículas - Homogeneización por calor (modificado de Bocca et al., 1998)

1. Preparar un baño de agua a unos 75-80°C para fundir el lípido.
2. Medir los lípidos, tensioactivos y el agua por cada fórmula de ensayo y tamaño de lote.
3. Añadir el lípido en fase interna (ácido esteárico o DHA) y el fármaco y la lecitina (tensioactivo) con agitador magnético para vaciar el recipiente revestido.
4. Añadir taurocolato de sodio (cotensioactivo) al agua y continuar agitando.
5. Calentar la solución de agua dd a 75°C sobre una placa calentada.
6. Una vez que el lípido se ha fundido, añadir la solución de agua al recipiente revestido.
7. Dejar que la solución de lípido/agua combinada se equilibre a 75°C.
8. Dispersar la solución en un homogeneizador de rotor-estátor Ika Ultra-Turrax T 18 (con rotor-estátor de 19 mm) a 30.000 rpm durante 2 minutos.
9. Inyectar/dispersar rápidamente 1 ml de microemulsión templada a través de una aguja de pequeño calibre

en 10-20 ml de agua dd a 2°C en un vial de vidrio con agitación constante.

10. Lavar tres veces en agua dd mediante diafiltración, utilizando un aparato TCF2 con una membrana de corte YM100kD (Amicon, Danvers, Ma).

11. Almacenar el producto de la nanopartícula lipídica a 2°C.

12. Medir el tamaño de la partícula.

Optimización. A fin de conseguir un objetivo de 100 nm de tamaño para la administración parenteral y un objetivo de polidispersidad de 0,10, por lo general se ha seleccionado ácido esteárico como el lípido a utilizar. No obstante, para la administración oral pueden resultar aceptables las partículas de mayor tamaño. Las cantidades absolutas dependen de los tamaños de los lotes, aunque la estequiometría apropiada se conoce por la bibliografía. Utilizando este protocolo, se ha averiguado que un ratio de lecitina (fosfatidilcolina)/taurocolato de sodio de 2:3, un ratio de tensioactivo/lípido de 1:4 y un tiempo de mezclado de 70 segundos con una velocidad de mezclado de 18.000 rpm resultan óptimos para el betacaroteno, que proporcionó una eficiencia de atrapamiento media del 40% y una concentración de 0,22 mg/ml (Triplett, 2004).

Preparación de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

Fórmula de partida. Fracción molar de ácido esteárico 0,710; fracción molar de lecitina 0,210; fracción molar de taurocolato 0,069; la curcumina u otro curcuminoide varía gradualmente en torno a la fracción molar 0,011. El lípido ácido esteárico se mantiene aproximadamente a 75°C para fundirlo por completo. Por separado, se calienta agua doblemente destilada a 75°C. Típicamente, los tensioactivos se añaden al agua bajo agitación magnética y se deja que se equilibren a 75°C. La solución de agua-tensioactivo se añade al lípido fundido y se deja que se equilibre a 75°C. Posteriormente se utiliza el homogeneizador de rotor-estátor Ika Ultra-Turrax T 18 para conseguir un mezclado adecuado, típicamente 18.000-30.000 rpm durante 70-150 seg. Una vez mezclado, la fase del lípido dispersado de la emulsión se solidifica, a fin de producir las nanopartículas lipídicas sólidas dispensando a través de una aguja de pequeño calibre partes alícuotas de la emulsión de 1 ml en agua fría casi helada (unos 2°C) con agitación constante, a un ratio de 1:20 (microemulsión templada: agua fría). El producto final se lava tres veces con agua destilada y se somete a esterilización con filtro con un aparato Amicon Diaflo con membranas YM100 (corte 100.000 Dalton). Posteriormente se almacena en condiciones estériles a 4°C hasta su administración mediante sonda. Se pueden preparar múltiples muestras de nanopartículas lipídicas a partir de un lote de microemulsión.

Determinar la eficacia del fármaco incorporado: Para determinar la cantidad de fármaco incorporado, las dispersiones de SLN (o micelas) se secan por congelación utilizando un secador por congelación. La SLN sin carga de cada formulación, es decir la SLN que no porta ningún fármaco, también se prepara como se ha descrito anteriormente. La cantidad de curcumina incorporada a la SLN se puede determinar entonces disolviendo la SLN secada por congelación en una solución de 95% de acetato etílico/5% de metanol, evaporándola bajo gas N₂ y resuspendiendo la muestra mediante un reactivo C en fase móvil (41% acetonitrilo, 35% agua desionizada, 23% metanol y 1% ácido acético; v/v/v/v). La muestra es analizada mediante métodos isocráticos de HPLC con una columna C18 de fase reversa (3,9 x 150 mm, tamaño de partícula 5- μ m; Waters Corporation, Massachusetts, MA), empleando la detección por luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 262 nm (Health et al., 2003; Health et al., 2005).

Carga del fármaco y mediciones de la liberación. La fotospectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) se emplea para medir la carga de fármaco de las muestras liofilizadas, empleando etanol como disolvente para disolver las micelas o nanopartículas lipídicas desecadas y eliminar los errores de absorción y dispersión secundarios. Todas las lecturas de la absorción se realizan a una longitud de onda a la que la curcumina (262 nm-UV 426 nm-visible) o un curcuminoide (XnM) presenta una absorción mayor respecto de otras moléculas que absorben la luz en estos estudios. Otras moléculas con una absorbancia detectable incluyen el taurocolato de sodio y la lecitina, que se pueden corregir para asumir una relación lineal entre absorbancia y concentración, y con una curva de calibrado para cada molécula absorbente. Estas se proporcionan mediante controles de micelas o SLN sin fármaco "en blanco". Dadas las concentraciones conocidas de todos los componentes salvo de la curcumina o los derivados, la concentración del fármaco se puede calcular a partir de la absorbancia corregida. La estabilidad se evalúa con diferentes métodos de almacenamiento y en distintos momentos de la preparación de las micelas.

Caracterización de los diámetros de las nanopartículas.

Microscopía de fuerza atómica. La microscopía de fuerza atómica (AFM) se puede utilizar para obtener imágenes de los tamaños de preparación de las nanopartículas lipídicas. Se colocan pequeñas cantidades de la suspensión de nanopartículas lipídicas en el sustrato y se dejan secar al aire antes de captar las imágenes, observando que esto puede aplanar las partículas durante el secado, resultando en un tamaño de partícula ligeramente mayor que el obtenido con métodos de dispersión de luz dinámica.

Ejemplo 1. Micelas de DOC/PC/curcumina y administración por sonda (Gav) a ratones. Para producir 5 mg de micelas de curcumina con un ratio molar de DOC/PC de 3,7:1 y un ratio molar de PC/curcumina de 1:3,33, para su administración oral a 5 ratones a 1 mg por ratón de aproximadamente 30 g, mezclamos 12,438 mg de DOC con 6,219 mg de PC (ratio de masa 2:1) y 1 mg de curcumina en polvo. Esto se disolvió mediante agitación vortex de

una mezcla de 2 ml de cloroformo/metano (2:1). El solvente se evaporó y se secó bajo nitrógeno. La película de la emulsión resultante se raspó sobre 2 ml de solución tampón de fosfatos (PBS) de pH 7.4 y se sometió a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Se administró 1 mg (200 µL) por sonda a cada ratón para producir una concentración plasmática de 0,465 micromolares, lo que representa más del doble del nivel plasmático sin las micelas. La masa seca de la preparación era de 2,865 mg/mg de curcumina o curcuminoides, lo que proporcionaría unos 350 mg de curcumina por cápsula de 1 g o 175 mg por cápsula de 500 mg, en cantidades prácticas.

Ejemplo 2. Éster de DHA-curcuminoide

Se puede sintetizar un éster de curcuminoide a partir de un curcuminoide y un DHA, uniendo el DHA a la curcumina en un hidroxilo fenólico con una estequiometría de 1:1, análoga a la empleada por Bradley et al 2001 para el paclitaxel. A una solución de curcumina (366 mg; 1 mol) en cloruro de metileno (61 ml) sometido a argón, se añade 4-dimetilaminopiridina (122 mg; 1 mol), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (412,36 mg; 2 mol), y DHA (329,4 mg; 1 mol). La mezcla de la reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la dilución con dietiléter, la mezcla de la reacción se lava con un 5% de HCl, agua y NaCl acuoso saturado. La mezcla se seca con sulfato sódico, se concentra y se purifica mediante cromatografía. El conjugado de DHA-curcumina se utiliza entonces tal y como se utilizaría la curcumina, por ejemplo en formulaciones de gel o micelas preparadas. (Véase Bradley MO, Webb NL, Anthony FH, Devanesan P, Witman PA, Hemamalini S, Chander MC, Baker SD, He L, Horwitz SB, Swindell CS. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. Clin Cancer Res. 7 de octubre de 2001; 7(10):3229-38). El éster se puede solubilizar y combinar con un antioxidante y un inhibidor de la glucuronidación, y formularse en forma de emulsión, SLN o aceite microencapsulado.

Ejemplo 3. Datos sobre antioxidantes

Para testar el efecto de un antioxidante sobre la estabilidad de la curcumina, se prepararon varias soluciones de curcumina de 25 micromolares, en presencia/ausencia de un antioxidante (ácido ascórbico o tetrahidrocurcumina). Utilizando una espectroscopia de la absorbancia, se midió la intensidad de absorbancia de la curcumina a 426 nm. Los resultados se presentan en la FIG. 2. "PBS" significa solución tampón de fosfatos (pH 7.4); "Curc" significa curcumina; "TC" significa tetrahidrocurcumina; "Veh" significa vehículo. Los datos muestran que el ácido ascórbico es muy efectivo retardando sustancialmente la hidrólisis de la curcumina. Se recogen más datos sobre los antioxidantes en las FIG. 3 y 4, que muestran los datos de absorbancia del lector de microplacas a 450 y 405 nm, respectivamente (flanqueando el pico de absorbancia de la curcumina a 426 nm). Los datos muestran que el ácido ascórbico es muy efectivo retardando la hidrólisis de la curcumina, a un ratio de curcumina/ácido ascórbico de 1:1 o incluso 2:1, con una efectividad ligeramente reducida a ratios superiores.

El Apéndice proporciona datos adicionales sobre los efectos diferenciales de la curcumina y su metabolito, la tetrahidrocurcumina.

La invención se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y ejemplos, aunque no se limita a estos. Se pueden realizar variaciones sin partir desde el alcance de la invención, que está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

APÉNDICE

Journal of Biological Chemistry

EFFECTOS DIFERENCIALES DE LA CURCUMINA Y SU METABOLITO, LA TETRAHIDROCURCUMINA, SOBRE LA PATOGENESIS DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA PLACA (*DIFFERENTIAL EFFECTS OF CURCUMIN AND ITS METABOLITE TETRAHYDROCURCUMIN ON NEUROINFLAMMATION AND PLAQUE PATHOGENESIS*)

Aynun N. Begum^{1,3}, Mychica R. Simmons-Jones^{1,3}, Giselle P. Lim^{1,3}, Takashi Morihara^{1,3,5}, Peter Kim^{1,3}, Dennis D. Heath⁴, Cheryl L. Rock⁴, Mila A. Pruitt⁴, Fusheng Yang^{1,3}, Bruce Teter^{1,3}, Marni E. Harris-White^{1,3}, Greg M. Cole^{1,2,3}, y Sally A. Frautschy^{1,2,3*}

De los Departamentos de ¹Medicina y ²Neurología, UCLA, Los Ángeles, CA 90095, y ³Greater Los Angeles Healthcare System, GRECC, Sepulveda, CA 91343, ⁴Cancer Prevention and Control Program, Moores UCSD Cancer Center, UCSD, La Jolla, CA 92093-0901, dirección actual Department of Post-Genomics and Diseases, Division of Psychiatry and Behavioral Proteomics, Osaka University Graduate School of Medicine D3, Yamada-oka 2-2, Suita-shi, Osaka 565-0871, JAPÓN

Título abreviado: La curcumina y la tetrahidrocurcumina suprimen la neuroinflamación y el Aβ (*Curc and TC suppress neuroinflammation and Aβ*)

Remitir la correspondencia a: Sally A. Frautschy, Greater Los Angeles Healthcare System, Veterans Administration Medical Center, Research 151, 16111 Plummer Street, Sepulveda, CA 91343, Tel.: 818-895-5892; Fax: 818-895-5835; E-mail: frautsch@ucla.edu

RESUMEN

La curcumina (Curc) es eficaz en múltiples modelos inflamatorios y neurodegenerativos. Sin embargo, su limitada biodisponibilidad genera preocupación en torno a su uso y a si los metabolitos de la Curc, como la tetrahidrocurcumina (TC), median en la eficacia. Examinamos los efectos antioxidantes, antiinflamatorios o antiamiloidogénicos de la Curc y la TC mediante administración crónica con la comida a ratones Tg2576 APPsw de edad avanzada o mediante la administración aguda a ratones silvestres por sonda (gav), inyecciones intraperitoneales (i.p.) o intramusculares (i.m.) en un modelo inflamatorio de inyección de lipopolisacáridos (LPS, i.p.). A pesar de que la TC fue más estable y se absorbió mejor, alcanzando unos niveles plasmáticos entre 4 y 7 veces superiores que la Curc; los niveles cerebrales de TC no fueron diferentes a los alcanzados con la Curc, lo que sugiere una menor biodisponibilidad en el cerebro de la TC respecto de la Curc. Los niveles cerebrales de TC y Curc no solamente se correlacionaban bien con la eficacia, sino que también ambos compuestos redujeron la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) estimulada por LPS, nitrotirosina, 8-iso-prostaglandina(PG)²_F²_α y carbonilos. La Curc parecía más efectiva, dado que los niveles de Curc se asociaron a una mayor inhibición respecto de los niveles comparables de TC.

A pesar de que la TC y la Curc fueron igualmente potentes reduciendo la interleuquina-1 {beta} (IL-1{beta}) causada por la inflamación tanto aguda como crónica (Tg2576), la Curc fue más efectiva reduciendo la carga de la placa amiloide, el Aβ insoluble y los carbonilos. Sorprendentemente, la TC redujo de forma más efectiva el A {beta} soluble y la forma activa de la quinasa N-terminal de cJun (pJNK). El plasma de los ratones alimentados con Curc mostró un 25% de TC libre. Respecto de cada una de ellas individualmente, la unión de TC y Curc redujo de forma más efectiva la toxicidad y la iNOS causada por oligómeros de A{beta}, así como por la agregación de oligómeros de A{beta}. En resumen, la excepcional bioabsorción de TC y su estabilidad en plasma no implica una mejor biodisponibilidad en el cerebro. La TC y la Curc afectan de forma diferente a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD), pero su sinergia ofrece una justificación para su uso combinado.

INTRODUCCIÓN

La neuroinflamación es una característica de muchas enfermedades neurodegenerativas y está implicada en su patogénesis. Los mecanismos inflamatorios que contribuyen a la patogénesis incluyen la secreción de mediadores inflamatorios, tales como la interleuquina-1β (1L-1β) (1,2), 1L-1α (3), así como la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) (4-7) y productos de la peroxidación de lípidos (como 8-iso-PGF_{2α}) (8,9). El ROS no solamente daña las proteínas y los lípidos en la AD, sino que también causa la activación de la JNK (10), un evento de la transducción de la señal implicado en la neurodegeneración asociada a la AD (11, 12) y a modelos transgénicos (13). La neuroinflamación también puede estimular la iNOS, que cataliza la producción de óxido nítrico (NO), un radical libre reactivo que se convierte en peroxinitrito (OONO) un producto de la reacción de NO[•] y O₂^{-•} y otras especies de óxido nítrico reactivo (RNS) derivadas de NO (14). Los RNS están implicados en numerosos trastornos neuropatológicos, donde contribuyen a la neuroinflamación y al daño oxidativo (15, 16). El potencial papel patógeno de los RNS en la enfermedad de Alzheimer está respaldado por el incremento de la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) en las neuronas que contienen ovillos en los pacientes de AD (17) y en las microglías y astrocitos que rodean las placas de beta amiloide. Se produce un incremento de RNS en las neuronas del cerebro con AD (16, 18) y también en las glías estimuladas por β-amiloide (19).

Los compuestos que se dirigen a los mediadores neuroinflamatorios, como ROS, RNS, JNK y citoquinas inflamatorias implicadas en la patogénesis, son sólidos candidatos para la intervención terapéutica. Uno de estos compuestos es la Curc, el pigmento de color amarillo del turmérico, un producto muy utilizado. El turmérico se encuentra en la lista de GRAS (sustancias reconocidas como generalmente seguras) de la FDA y la Curc es antagonista de numerosos pasos de las cascadas inflamatorias relevantes de la enfermedad, incluyendo la transcripción de AP-1, la activación de NF-κB, iNOS y JNK (20-25), y atenúa la neuroinflamación y la patología de la placa en los modelos de AD (26-28). Nuestro estudio previo demostró que la administración crónica de una dosis oral baja de Curc (160 ppm con la comida o 800 µg/día) fue capaz de reducir la citoquina inflamatoria 1L-1β, los grupos carbonilo como índices de proteínas oxidadas, el Aβ soluble e insoluble, y las placas en el ratón APPsw Tg2576 (26). Recientemente, Backsai et al. han descubierto, utilizando la microscopía de doble fotón *in vivo* para seguir placas individuales en ratones transgénicos APP/PS1 tratados con Curc, que la Curc se unía a depósitos preexistentes y reducía el tamaño medio de la placa en un 30%, tras 8 días de tratamiento (29).

Debido a las acciones farmacológicas propuestas respecto de la Curc, entre las que se incluyen diversas actividades anticancerígenas, antioxidantes y antiinflamatorias (30-33), se están realizando ensayos clínicos para investigar su eficacia para la prevención del cáncer y de la AD. A diferencia del α-tocopherol (vitamina E), que es un neutralizador limitado de la oxidación asociada al NO (34), la Curc ejerce una potente actividad antioxidante para la generación de radicales asociada al NO (35). A diferencia de los NSAID, cuyos efectos secundarios adversos incluyen la ulceración y la hemorragia gastrointestinal, así como la toxicidad hepática o renal (26, 38), la Curc parece ser relativamente segura, incluso en los ensayos clínicos sobre la prevención de las úlceras.

La Curc es un compuesto bifenólico con grupos hidroxilo en la posición orto de los anillos aromáticos. Está separado por un puente de β-dicetona, que contiene dos enlaces dobles (dienona). La fracción de dienona contribuye a su inestabilidad en solución acuosa (39, 40), mientras que la reducción de los enlaces dobles *in vivo* resulta en el metabolito TC, que es resistente a la hidrólisis (39,40). Se cree que la reducción a TC se produce primero en un compartimento citosólico (intestinal o hepático) (41).

Poco se sabe sobre los efectos diferenciales de la Curc respecto de la TC. Al igual que en el caso de la Curc, se ha documentado que la TC ejerce actividades antioxidantes y antiinflamatorias similares *in vitro* (42,43) e *in vivo* (riñón) (44), lo que sugiere que la TC puede contribuir a los beneficios de la Curc. La TC se puede administrar oralmente y es más fácilmente absorbible, biodisponible y más estable que la Curc (42, 44). No obstante, la TC carece de la fracción de dienona, que se puede someter a la adición de Michael y puede resultar fundamental para algunos de los efectos de la Curc (45, 46). No está claro si la TC derivada del metabolismo de la Curc puede ejercer algún efecto, dado que los glucuronidos de TC, pero no la TC libre, se observan en plasma tras la administración oral de Curc (44, 47, 48). Esto sugiere que la mayoría de la TC en plasma puede existir en forma de glucurónido que será rápidamente filtrado por los riñones.

También existe controversia por lo que respecta a la bioabsorción de la Curc. Un estudio reciente encontró unos niveles aparentemente insignificantes (en nM) de Curc en plasma humano, incluso tras la administración oral de una dosis elevada (10 gramos) (49). Sin embargo, existen numerosos informes de efectos funcionales tras la administración oral de Curc. Los estudios farmacocinéticos de la Curc demuestran una ávida glucuronidación y sulfatación intestinal, generando incertidumbre con respecto a si la Curc o sus metabolitos son responsables de sus acciones beneficiosas más allá del intestino (23, 33, 47, 50-52). Se ha postulado que determinadas condiciones, tales como el ayuno, la vía de administración, el uso de vehículos o el tratamiento conjunto con extracto de pimienta (piperazina) puede mejorar la biodisponibilidad y eficacia, aunque no existe un consenso con respecto a la posología, la frecuencia y la vía de administración, o la administración junto con alimentos.

Para comenzar a aclarar la interacción entre biodisponibilidad y bioeficacia, investigamos primero los niveles de Curc y TC en plasma y en el cerebro tras utilizar diferentes vías de administración (por sonda en ayunas o sin ayuno, i.p. e i.m.), así como su impacto sobre las respuestas neuroinflamatorias a un estímulo inflamatorio agudo (LPS). Posteriormente, investigamos el impacto relativo de la administración crónica de Curc o TC con la comida sobre el A β y los parámetros inflamatorios del modelo de AD en el ratón transgénico APPsw de edad avanzada, así como la presencia de TC libre en forma de producto de la biotransformación de la Curc no glucuronidada en el plasma de los ratones alimentados con Curc.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales y tratamientos — El uso de animales fue aprobado por la Greater Los Angeles Veterans Administration Institutional Animal Care and Use Committee. En el paradigma de administración aguda, los ratones C57/B16/J machos y hembras (3-4 meses de edad, n=4) recibieron Curc, TC o vehículo por sonda (gav), i.p. o i.m., después de ayunar durante dos días consecutivos, tal como se muestra en la Fig. 1A. Una hora después de la dosis del segundo día, se administró LPS a los ratones (0,5 μ g/g de peso corporal) por vía i.p. y fueron sacrificados 3 horas más tarde. Cada una de las dosis gav e i.p. contenía 148 μ g (0,4 μ moles) de Curc (Cayman Chemicals, Michigan, MI) o TC (Sabinsa Corp. Piscataway, NJ) y la dosis i.m. fue de 74 μ g (0,2 μ moles). La solución madre se produjo disolviendo Curc o TC en una solución de 0,5 N de hidróxido de sodio (NaOH), que fue rápidamente diluida 1:100 y neutralizada en la solución tampón de fosfatos (pH 7.4) anteriormente descrita (23).

El paradigma de administración oral crónica de TC o Curc (500 mg/kg con la comida o aproximadamente 1,25 mg/kg de peso corporal) se evaluó utilizando ratones APPsw Tg2576 machos y hembras (Fig. 1B). Los ratones fueron alimentados con estas dietas durante 4 meses con TC (n = 5-7) o Curc (n = 5-11) durante el periodo de deposición de placa acelerada (12-16 meses de edad). Para el sacrificio, los ratones fueron anestesiados primero con fenobarbital (40 mg/kg de peso corporal, i.p.) para recoger una muestra de sangre. La sangre se extrajo de la aorta abdominal en tubos que contenían EDTA y se centrifugó a 1.600 x g durante 20 minutos a 4°C. El plasma recogido se repartió en partes alícuotas y se sometió a congelación instantánea, utilizando nitrógeno líquido. Posteriormente los ratones recibieron una perfusión de PBS (pH 7.4) que contenía inhibidores de la proteasa (20 μ g/mL de pepstatina A, aprotinina, fosforamidona, y leupeptina, 0,5 mM de PMSF, y 1 mM de EGTA). Los cerebros se extrajeron, se diseccionaron y posteriormente se sometieron a congelación instantánea utilizando nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Estudios *in vitro*. Tratamiento de las neuronas con oligómero de A β — El oligómero de A β 42 (100 nM) se preparó como se ha descrito anteriormente (27). En resumen, el péptido A β (1-42) sintético sometido a doble liofilización fue monomerizado mediante solubilización en (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) (HFIP). La formación de fibrillas se minimizó durante la posterior evaporación de HFIP, añadiendo agua esterilizada (para conseguir la solución madre de 315 μ g/ml). Las fibrillas se formaron en la solución mediante agitación continua (600 rpm) durante 48 horas a temperatura ambiente (25 °C). Se añadió 1 mM de solución tampón NaHCO₃ (pH 10-11) para optimizar la estabilidad del oligómero de A β de elevado peso molecular (HMW). Los oligómeros se añadieron a las células durante 48 horas a 37 °C con Curc (2,5 μ M), TC (2,5 μ M), Curc+TC (1,25 μ M de cada), o el vehículo. Después de 48 horas, se realizaron ensayos de LDH sobre medios de cultivo, utilizando un ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 (Promega, Madison, WI), y se midió la absorción a 490 nm. Cada punto de recogida de datos se determinó por triplicado y el valor de S.D. no superó el 5%.

Para evaluar el impacto de la Curc y/o TC sobre la toxicidad del oligómero de A β , los oligómeros de A β se añadieron a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y cultivadas y mantenidas como se ha descrito anteriormente (53). Las células se colocaron en placas de 96 pocillos, a 10.000 células/pocillo, y se diferenciaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en suero, con suplemento N₂ y 10 μ M de ácido *trans*-retinoico durante 7 días. El medio fue retirado y sustituido por un medio de mantenimiento limpio que contenía BSA al 0,1%.

Estudios in vitro. Tratamiento de microglías con LPS - Dado que los LPS pueden inducir la iNOS en el CNS en las microglías (54), y recientemente se ha documentado que inducen la iNOS en las neuronas, posteriormente investigamos el efecto de la TC y/o la Curc sobre la iNOS *in vitro*. Se prepararon cultivos de neuronas corticales de fetos de rata Spague Dawley de 18 días de gestación (E18), siguiendo el método descrito en Brinton et al. (56), obteniendo aproximadamente un 97% de neuronas y 3% de glías. En resumen, las células se cultivaron primero en medio B27 (que contenía arabinósido citosina para minimizar la proliferación de células gliales), se suplementaron con 25 μ M de glutamato, 0,5 μ M de glutamina, 5 U/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina, y un 10% de suero bovino fetal (FBS). Tres horas antes del tratamiento, las neuronas se incubaron en medio neurobasal (BNBM), pero sin B27 y glutamato. Posteriormente, las células fueron preincubadas con 2,5 μ M de Curc, TC, Curc+TC, o vehículo durante una hora, antes de añadir el LPS (1 μ g/ml o 100 nM). Las células se recogieron 24 horas más tarde. En resumen, las células se lavaron con PBS fría, se rasparon sobre 1 ml de PBS y, a continuación, se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min. Los gránulos de células se sometieron a ultrasonidos en solución tampón de lisis (SDS, desoxicolato, triton X100, NaCl, NaH₂PO₄, a 0,5%, 0,5%, 1%, 150 mM, 10 mM, respectivamente) con una mezcla inhibidora de fosfatasa y proteasa (fenvalerato, cantaridina, vanadato de sodio, pirofosfato de sodio, fluoruro de sodio, fosforamidón, EGTA, EDTA, leupeptina, aprotinina, pepstatina A, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), hidrocloreto de 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoruro, a 0,05, 0,05, 1, 1, 50, 0,02, 1, 0,1, 0,02, 0,0015, 0,0145, 0,250, 0,5 mM, respectivamente). Tras la incubación a 4°C durante 30 min, las muestras fueron centrifugadas de nuevo (12.000 rpm durante 10 min), y los supernatantes se recogieron y se utilizaron para determinar la concentración de proteína (kit de ensayo de proteínas Bio-Rad DC, Hercules, CA) y los niveles de iNOS mediante inmunoensayo Western blot.

Dado que las microglías son la principal fuente de iNOS en el cerebro, también evaluamos el impacto de la Curc y la TC sobre la iNOS en una línea de células microgliales BV-2 (cortesía del Prof. Jean deVellis, UCLA) (57). Las células BV-2 se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), suplementado con un 10% de FBS inactivado por calor (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) a 37°C en un 5% de CO₂ en una incubadora de células humidificada. Un día antes del tratamiento, se retiró el suero y las células se incubaron en un 0,1% de BSA y DMEM. Posteriormente, las células fueron pretratadas con Curc, TC, Curc + TC, o vehículo, una hora antes del LPS, y las células se recogieron 24 horas más tarde, tal y como se ha descrito anteriormente para los cultivos de neuronas corticales.

Preparación de muestras de tejido y plasma para la HPLC — Las muestras de plasma y cerebro de ratón se extrajeron en una solución al 95% de acetato etílico/5% de metanol y se analizaron mediante HPLC para determinar la presencia de Curc (58) y TC (59), utilizando 17 β estradiol como estándar interno, tal y como se ha descrito anteriormente, salvo por la modificación siguiente. Para la preparación de la muestra de tejido cerebral, el conjunto del tejido cerebral se homogeneizó primero en 10 vol de 1 M de acetato de amonio (pH 4.6). La eficiencia de extracción de la Curc y la TC fue del 88-97% y del 82-90% en plasma y tejido cerebral, respectivamente. Este método de HPLC ofreció un límite de detección de 10 ng/ml.

PCR cuantitativa (QPCR) — Los niveles cerebrales de mRNA de iNOS se midieron mediante transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa (QPCR). En resumen, el RNA total fue aislado del cerebro utilizando el kit RNAqueous (Ambion), conforme a las instrucciones del fabricante, y tratado con DNasa. A continuación, el RNA (1 μ g) se sometió a transcripción inversa con cebadores dT, utilizando el kit Retroscript, y se dividió en partes alícuotas para usos individuales. El análisis de los niveles de mRNA se realizó utilizando una QPCR con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un termociclador SDS7700 (Applied Biosystems), seguida de un análisis de la curva de disociación, que verificó la amplificación de una única especie de la PCR. Los parámetros del termociclador fueron los estándares para los instrumentos SDS7700 (Applied Biosystems): 95°C durante 10 min. y 40 ciclos de 95°C durante 15 seg. y 60°C durante 1 min. Cada una de las muestras fue testada por triplicado. Se trazó una curva estándar para realizar comparaciones relativas de los valores de la muestra. Los cebadores de la PCR para la iNOS fueron TGAGACAGGAAAGTCGGAAG (directo) y TCCCATGTTGCGTTGGAA (inverso) y se normalizaron a los niveles de mRNA de GAPDH (un control de un gen de mantenimiento interno) para cada muestra de cDNA, utilizando los cebadores de los reactivos TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems).

Ensayos ELISA para 8-iso-PGF₂ α (F2-isoprostanos), A β e interleuquina1 β (1L-1 β) — Para los ELISA de A β e IL-1 β , una parte alícuota de tejido cerebral congelado (pulverizado sobre hielo seco con un mortero y una mano) se homogeneizó en 10 vol de TBS que contenía la mezcla inhibidora de proteasa (menos los detergentes). Las muestras se sometieron a ultrasonidos brevemente y se centrifugaron a 100.000 x g durante 20 min a 4°C. El supernatante de la TBS soluble se utilizó como "fracción de TBS" para el ELISA y se empleó para medir la interleuquina 1 β y el A β soluble. El gránulo se disolvió en guanidina y se empleó para medir el A β insoluble, como se ha descrito anteriormente (60). Para el ELISA de F2-isoprostano se utilizó otra parte alícuota de tejido pulverizado y se extrajo la totalidad de los lípidos utilizando una modificación del método de Hara y Radin (8). A continuación, se midieron las muestras utilizando el kit de inmunoensayo 8EPI-F2 Immunoassay Kit (EA84; Oxford Biomedical Research, Oxford, MI), como se ha descrito anteriormente (28).

Inmunoensayo Western blot para detectar iNOS, p-JNK, nitrotirosina y carbonilos en tejido cerebral — Para detectar iNOS, nitrotirosina y p-JNK, se utilizó la fracción de TBS. Las muestras (20 μ g) se sometieron a electroblot en un gel de Tris-glicina al 10% y posteriormente el gel fue transferido a una membrana de PVDF y bloqueado durante 1 hora a temperatura ambiente en leche al 5% con Tween20 al 0,05% en PBS. La membrana fue incubada con anticuerpos monoclonales de ratón primarios a una dilución de 1:1.000 a 4°C durante una noche: anticuerpo anti-iNOS

(Transduction laboratories, BD Biosciences, Bedford, MA), anti-nitrotirosina (Cayman Chemical, Michigan, MI) o anti-pJNK (Cell signaling; Beverly, MA). El anticuerpo secundario fue anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:30.000), incubado durante 1 hora a temperatura ambiente y desarrollado con ECL.

Para las mediciones de carbonilos, utilizamos el kit "Oxyblot" (Intergen, Purchase, NY), tal como se ha descrito anteriormente (26). El gránulo insoluble en TBS se sometió a ultrasonidos en solución tampón de lisis (véase arriba) con mezclas inhibitoras de la proteasa y, posteriormente, se centrifugó a 100.000 x g durante 20 min., a 4°C. El supernatante resultante se recogió en forma de "fracción de lisis". Se hicieron reaccionar 10 µg de proteína de esta fracción con 1 x dinitrofenilhidrazina (DNPH) durante 15-30 min. y se neutralizaron con una solución que contenía glicerol y β-mercaptoetanol. Estas muestras se sometieron a electrofóresis en un gel al 10% de Tris-glicina, se transfirieron y bloquearon. El blot fue incubado durante una noche con un anticuerpo de ratón anti-DNPH (1:150) a 4°C y, posteriormente, se incubó con anticuerpo de cabra anti-ratón (1:300) durante una hora a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron utilizando técnicas quimioluminiscentes con exposiciones no saturadas y se cuantificaron. Las bandas resultantes fueron escaneadas y cuantificadas utilizando un densiómetro y el software Molecular Analyst software (Model GS-700, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Inmunotinción y análisis de imágenes — Las criosecciones hemisféricas de 8 µm de ratones Tg2576 sometidos a una dieta de Curc y TC fueron analizadas inmunohistoquímicamente para detectar Aβ (anticuerpo policlonal de conejo; 1:500 anti-Aβ1-13, DAE) o GFAP (1:10000, anticuerpo monoclonal, Sigma, St Louis, MO), tal y como se ha descrito anteriormente (60). En resumen, la recuperación de antígeno se realizó vaporizando secciones en una solución de desenmascaramiento (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después de inhibir la fluorescencia con peróxido de hidrógeno al 0,6% y bloquear con suero normal, las secciones fueron incubadas con anticuerpos primarios durante una noche a 4°C. Tras incubar con el reactivo ABC que contenía peroxidasa (Vector Lab), las secciones se desarrollaron con diaminobencidina con metal potenciador (DAB, Pierce, Rockford, IL).

Los análisis de las imágenes de DAE y GFAP se realizaron en dos secciones coronarias por cerebro. Todas las imágenes se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse E800 (Tokyo, Japón), con un sistema de vídeo Sony Triniton. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software de dominio público NIH Image para calcular el número de placas, la carga de placas y el porcentaje del área de GFAP teñido en las capas de la corteza y el hipocampo.

Desagregación del oligómero de Aβ42 mediante inmunoensayo Dot-blot — Examinamos el impacto de la TC y la Curc sobre la desagregación de Aβ42 en un sistema libre de células, utilizando un Dot-blot con un anticuerpo de oligómero específico, tal como se ha descrito anteriormente (27), salvo por el hecho de que los oligómeros estaban preformados. Los oligómeros de Aβ42 recién preparados (11 µM, Dr. Charles C. Glabe, UC Irvine) fueron coincubados con Curc (16 µM), TC (16 µM), Curc+TC (Curc y TC juntas, 8 µM de cada), o vehículo, durante 72 horas a 25°C y, posteriormente, a 500 ng por pocillo, se les aplicó una membrana de nitrocelulosa en un aparato de Bio-Dot (Bio-Rad). La membrana fue bloqueada con leche desnatada al 10% en TBS-T a temperatura ambiente durante una hora, se lavó con TBS-1 y se sondó con el anticuerpo A11 anti-Aβ (6E10) o anti-oligómero (61) (1:10.000) en un 3% de BSA-TBS-T durante una noche a 4 °C. Después de lavarla, se sondó con una solución de anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente. El blot se desarrolló con SuperSignal (Pierce) durante 2-5 min. Las manchas se escanearon y analizaron con un densiómetro del modelo GS-700 utilizando el software Molecular Analyst (Bio-Rad).

Análisis estadístico — Los efectos comparativos del tratamiento con Curc y TC mediante HPLC se analizaron mediante un análisis ANOVA de un factor, seguido de un test *post-hoc* de Bonferroni/Dunn. La densimetría del Western blot se analizó mediante un análisis ANOVA de un factor (Graph Pad InStat v.3.05, San Diego, CA). El coeficiente de correlación y la significancia del grado de relación lineal entre parámetros se determinó con un modelo de regresión simple, utilizando StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC). Todos los experimentos se realizaron por triplicado o cuadruplicado.

RESULTADOS

Las mediciones anteriores de Curc o TC utilizando nuestros métodos de HPLC publicados revelaron una detección de TC o Curc en muestras de tejido que contenían estas sustancias. Sin embargo, se desconocía si estos métodos eran lo suficientemente sensibles como para detectar TC o Curc en animales tratados con estas sustancias antes de ser sacrificados. Por tanto, proporcionamos Curc o TC utilizando tres vías de administración y empleando un método mostrado para mejorar su biodisponibilidad (23). Las estructuras de Curc y TC se muestran en la Fig. 2, A y B, lo que ilustra que los dobles enlaces de Curc que flanquean el puente de β-dicetona se pierden después de la reducción a TC. Los datos demostraron la detección satisfactoria de estos compuestos en los ratones tratados. Cromatogramas representativos de los ratones a los que se les había inyectado Curc o TC por vía i.m. revelaron la presencia de sus respectivos valores máximos, tanto en plasma (Fig. 2, C y D) como en las fracciones del cerebro (Fig. 2, E y F), mientras que en las muestras de control solamente estaba presente el valor máximo estándar interno (Fig. 2, G y H).

Un análisis detallado, mostrado en la Tabla 1, reveló que tras la administración aguda por sonda, la Curc y TC se podían detectar en el cerebro, pero no en plasma. Incluso cuando se evitó la barrera gastrointestinal mediante inyección i.p. o i.m., los niveles plasmáticos de TC fueron siempre superiores (>2 µM) a los de Curc (<0.3 µM). Aún cuando los niveles plasmáticos de TC fueron notablemente superiores a los de Curc, los niveles cerebrales de TC fueron los mismos que los de la Curc. De hecho, los niveles plasmáticos de Curc de los ratones tratados con Curc fueron relativamente equivalentes a los respectivos niveles cerebrales (gradiente plasma/cerebro cercano a 1),

mientras que los niveles plasmáticos de TC de los ratones tratados con TC fueron varias veces superiores a los cerebrales (gradiente plasma/cerebro 4,4-11).

Dado que los niveles cerebrales de los curcuminoides eran varias veces inferiores a los empleados en numerosos estudios publicados, investigamos si estos niveles eran suficientes como para ejercer efectos antiinflamatorios. Dado que la iNOS es un índice de inflamación que se incrementa en el cerebro del paciente de AD y se puede inhibir mediante Curc a dosis relativamente bajas *in vitro*, indujimos la inflamación inyectando LPS y, a continuación, analizamos los cerebros de ratones tratados con TC o Curc para detectar la presencia de la proteína de iNOS (Fig. 3, A y B) y del mRNA (Fig. 3, C). Los LPS causaron fuertes incrementos del mRNA y la proteína de iNOS. A pesar de que la inyección i.m., que provocó los niveles cerebrales más elevados del fármaco, tendía a ser ligeramente más efectiva atenuando las respuestas a estos LPS, todas las vías de administración de Curc y TC causaron importantes reducciones del mRNA y la proteína de iNOS. El análisis de regresión mostró una estrecha correlación entre la inhibición del mRNA de iNOS y el aumento de las concentraciones de los curcuminoides administrados, aunque sugirió que unos niveles cerebrales inferiores de Curc eran más efectivos que unos niveles equivalentes de TC a la hora de reducir el mRNA de la iNOS (Fig. 3, D).

Dado que los LPS inducen la expresión en el CNS de IL-1 β (2, 7), una citoquina inflamatoria cuyos niveles se sabe que son elevados en las enfermedades neuroinflamatorias, incluyendo la AD, también evaluamos el impacto relativo de la Curc o la TC sobre la inducción de IL-1 β . A pesar de que los LPS indujeron efectivamente unos notables incrementos de los niveles cerebrales de IL-1 β en comparación con el vehículo, todas las vías de administración tanto de Curc como de TC inhibieron igualmente esta respuesta (Fig. 4, A). La correlación de los niveles de TC o Curc con IL-1 β confirmó que la TC y la Curc fueron igualmente efectivas reduciendo la IL-1 β (Fig. 4, B).

Los LPS pueden inducir la peroxidación lipídica en el cerebro, medida mediante F2-isoprostanos (62), que es elevada en la AD (63, 64) y en modelos de AD (28, 65). Por tanto, investigamos el impacto de la Curc o TC sobre la inducción de F2-isoprostanos. Los resultados mostraron que los LPS incrementaban los niveles de F2-isoprostanos. A pesar de que la administración oral aguda de Curc o TC no consiguió producir unos niveles cerebrales suficientes como para modificar los isoprostanos, la administración i.p. redujo ligeramente y la administración i.m. redujo significativamente los niveles de F2-isoprostanos inducidos por LPS. El análisis de regresión de los niveles de Curc o TC con F2-isoprostanos muestra importantes correlaciones, aunque unos niveles inferiores de Curc parecían causar una mayor inhibición de F2-isoprostanos en comparación con los niveles equivalentes de TC (Fig. 4, D).

La reacción del superóxido con óxido nítrico, resultante en un aumento del peroxinitrito, se produce en enfermedades neuroinflamatorias como la AD y la ALS (66, 67). Se puede estimar un índice indirecto del peroxinitrito, midiendo las proteínas reactivas anti-nitrotirosina (NT), que se forman por la nitración mediada por peroxinitrito de residuos de tirosina de la proteína. Los resultados demostraron que los LPS inducían unas destacadas bandas NT-reativas de 75 kD y 90 kD, pero la administración por sonda de cualquiera de los compuestos no fue efectiva modificando la NT (Fig 5, A), de igual modo que la administración por sonda no consiguió suprimir la inducción de F2-isoprostano. Al contrario, la Curc fue efectiva suprimiendo la oxidación de proteína inducida por LPS, mediada por los carbonilos, con independencia de la vía de administración (Fig. 5, B), a diferencia de la TC, que solamente fue efectiva reduciendo la inducción de carbonilo mediante inyección i.m. (Fig. 5, C).

Dado que se ha documentado que el ayuno puede potenciar la absorción o el aprovechamiento de la Curc (23, 68, 69), y dado que el tratamiento crónico es probablemente necesario para la intervención terapéutica de las enfermedades, evaluamos el impacto de los alimentos *ad libitum* sobre la absorción y eficacia de la Curc y la TC. Incrementamos la dosis administrada por sonda a 480 μ g, que se encuentra más cerca del consumo en la dieta diaria de Curc utilizada para reducir la patogénesis de la AD en el ratón Tg2576 (26). En este experimento, el ratio de Curc/TC en el cerebro fue de 2:3, lo que respalda la hipótesis, a diferencia de lo que ocurre en el plasma, de que la biodisponibilidad de la Curc en el cerebro es mayor que la de la TC. En comparación con los ratones en ayunas, los ratones alimentados previamente *ad libitum* mostraron una importante reducción de la absorción tanto de Curc como de TC (administrada por sonda), medida por sus contenidos en el cerebro (Fig. 6, A). A pesar de que la Curc no fue siquiera detectable en el cerebro cuando se administró con comida, la TC sí fue detectable. La reducción de la absorción GI derivada de la ingesta de alimento se asoció a una disminución (Curc) o inexistencia (TC) de eficacia en la inhibición de la iNOS cerebral inducida por LPS (Fig. 6, B). No obstante, la Curc fue significativamente eficaz en el cerebro ($p < 0.05$), lo que sugiere que la Curc puede ser efectiva a unos niveles cerebrales tan limitados como 81,3 nM (0,03 μ g/10 mg de proteína).

Dado que la Curc no fue detectable con una administración aguda por sonda con alimentos (sin ayuno), posteriormente investigamos si se podría detectar tras la administración crónica en la comida. Seleccionamos las dosis anteriormente indicadas para reducir el daño oxidativo, la neuroinflamación y la patología de las placas en el ratón APPsw Tg2576 (26). La Tabla 2 indica que, a diferencia de la administración aguda por sonda, la administración oral crónica en la comida de Curc o TC resultó en unos niveles plasmáticos detectables de 0,095 μ M y 0,73 μ M, respectivamente. Al igual que en el caso de la administración aguda, la administración crónica se tradujo en unos niveles plasmáticos de TC varias veces superiores a los de la Curc.

A continuación, evaluamos la eficacia relativa de la alimentación con Curc y TC sobre la patología de las placas en el ratón Tg2576 APVsw. La inmunotinción para anti-A β reveló que, en comparación con los ratones alimentados con el control, los ratones alimentados con Curc mostraban una sorprendente reducción de las placas (Fig. 7, A-D), similar a la anteriormente descrita (26). El hecho de si la dieta con TC mostraba una ligera reducción del tamaño de

las placas en comparación con los ratones alimentados con la dieta de control estuvo menos claro (Fig. 7, E y F). La cuantificación del tamaño de la placa (Fig. 7, G) y de la carga de placas (Fig. 7, H) confirmó que la Curc, pero no así la TC, reducía la patología asociada al A β . Posteriormente, analizamos la corteza diseccionada para detectar los niveles de A β y observamos que los animales alimentados con Curc, pero no así los alimentados con TC, mostraban una reducción de A β en la fracción insoluble (Fig. 7, I). El único impacto significativo de la TC sobre las variables de A β se produjo sobre el A β soluble, que se redujo en mayor medida que con la Curc (Fig. 7, J).

La GFAP fue analizada inmunohistoquímicamente para evaluar el impacto de la Curc y la TC sobre la gliosis elevada en este modelo transgénico de AD (Fig. 8, A-H). La cuantificación de la GFAP confirmó la inducción conocida de GFAP en este modelo transgénico. Tanto la Curc como la TC atenuaron de forma significativa la gliosis asociada con el transgen (Fig. 8). La IL-1 β es un índice de neuroinflamación, que se cree que contribuye a la patogénesis de la AD y que mantiene un nivel elevado en este modelo. Al igual que en el caso de la gliosis, la IL-1 β se redujo de forma efectiva tanto con la Curc como con la TC, en comparación con los ratones Tg⁺ que seguían la dieta de control (Fig. 9, A). Sin embargo, a pesar de que los carbonilos que se sabe que son inducidos por este transgen (26) se redujeron con la Curc como se ha descrito anteriormente, la TC demostró únicamente una tendencia poco significativa de reducción de los carbonilos (Fig. 9, B). Dado que se ha documentado que la quinasa N-terminal de cJun (pJNK) activada por estrés (fosforilada) mantiene unos niveles elevados en homogeneizados corticales de este modelo (13) y la JNK es un posible objetivo de la Curc, también examinamos los impactos relativos de la Curc y la TC sobre la pJNK. El análisis del Western blot reveló dos bandas a 46 y 56 kDa, que cuando se cuantificaron demostraron que tanto la Curc como la TC redujeron de forma efectiva la pJNK, teniendo la TC un mayor efecto (Fig. 9, C y D). Dado que la TC tenía efectos más potentes que la Curc tanto sobre los oligómeros solubles como sobre la pJNK, la posibilidad de una relación directa fue evaluada mediante un análisis de regresión, que demostró que el grado de reducción del oligómero soluble era directamente proporcional al de reducción de la pJNK (Fig. 9, E). Dado que los datos demostraron diferentes efectos de la Curc y la TC sobre la eficacia, y dado que parte de la Curc se puede convertir en TC libre, planteamos la hipótesis de que podían funcionar sinérgicamente en el modelo crónico. Por tanto, los niveles de Curc y TC se midieron en plasma tras la ingestión crónica de Curc en la comida. Se pudieron detectar cantidades significativas de TC, con la Curc representando el 75% y la TC el 25% del contenido en curcuminoides totales en plasma (Fig. 10, A). La posibilidad de que la combinación de ambas sustancias *in vitro* pueda inhibir de forma más efectiva la inducción de la iNOS por mediación de LPS se testó en las neuronas (55) y en una línea de células microgliales. Los resultados demostraron que la combinación de la TC y la Curc tenía un efecto más potente sobre la supresión de la iNOS que cualquiera de ellas por separado, tanto sobre las neuronas primarias (Fig. 10, B) como sobre las microglías BV2 (no mostradas). También evaluamos si esta sinergia observada era aplicable asimismo a la toxicidad del A β medida mediante LDH. Los resultados demostraron que, a pesar de que tanto la Curc como la TC tenían una actividad protectora, su efectividad era mayor cuando se administraban en forma combinada (Fig. 10, C). A pesar de que la TC tuvo un mayor impacto sobre el A β soluble, se sabe que la Curc se une al amiloide y reduce su agregación. Puesto que existe la hipótesis de que la agregación del oligómero soluble es un importante efector en la AD (70), empleamos un ensayo libre de células (27) para investigar el impacto relativo de la TC y/o la Curc sobre la desagregación de oligómeros de A β de elevado peso molecular. Los datos demostraron que tanto la TC como la Curc por separado eran capaces de desagregar los oligómeros preformados, pero que utilizadas conjuntamente incrementaban su potencia de desagregación de los oligómeros de A β (Fig. 10, D).

DEBATE

La Curc es sorprendentemente eficaz en numerosos modelos animales *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneración y cáncer, aunque se desconocen los niveles en sangre necesarios para producir estos efectos. La escasa biodisponibilidad tanto en animales como en seres humanos ha sido motivo de preocupación, dado que los niveles plasmáticos necesarios para muchos efectos *in vitro* no se consiguen con claridad (41). Esto ha generado interés en los metabolitos activos para los que la Curc puede actuar como profármaco, como la TC, que se cree que se absorbe mejor y ofrece unos efectos similares. No obstante, con excepción de unos pocos estudios *in vivo* (44, 71), poco se sabe acerca de los efectos de la TC *in vivo*, y nada sobre sus efectos sobre el cerebro. Nuestras nuevas conclusiones demuestran los niveles en sangre y en los tejidos diana necesarios para diversas actividades protectoras. Confirmamos que la TC ofrece una mayor estabilidad y absorción que la Curc, aunque demostramos por primera vez una menor disponibilidad de TC en el cerebro. También ofrecemos evidencias que respaldan un impacto diferencial de la TC respecto de la Curc sobre las cascadas neuroinflamatorias y la patogénesis de la AD, y proporcionamos la base para la justificación de su uso conjunto sinérgico, por ejemplo, en la terapia para la AD.

Efectos de la TC y la Curc sobre la absorción GI — A pesar de que la Curc no se podría detectar en el cerebro tras la administración aguda por sonda de una dosis de 147 μ g o 480 μ g, la TC se podría detectar con la dosis más elevada administrada por sonda, lo que confirma las sugerencias anteriores de que la TC podría tener una mejor absorción GI (44). La absorción GI mejorada de la TC respecto de la Curc también fue sugerida por el modelo de administración crónica en la dieta (*ad libitum*), donde los niveles plasmáticos de TC en los ratones alimentados con TC fueron casi 8 veces superiores que los niveles plasmáticos de Curc en los ratones alimentados con Curc. A diferencia de lo ocurrido con la administración aguda por sonda, la administración repetida diariamente en la dieta de Curc resultó en unos niveles plasmáticos detectables de Curc, lo que se puede deber a su capacidad para inhibir la glucuronidación. Un informe demostró que tras una alta dosis oral, se detectaron conjugados de Curc-glucuronida y Curc-sulfato, pero la Curc libre se mantuvo por debajo de los límites de detección (50). Otros estudios demostraron

unos resultados similares en ratas, con unos niveles de Curc libre inferiores a 5 nM (72), mientras que nuestros datos revelaron unos niveles plasmáticos cercanos a 100 nM de Curc libre con la administración crónica en la dieta. Pan et. al. descubrieron que aproximadamente el 99% de la Curc y más del 85% de la TC en el plasma se encuentran conjugados con glucuronida con una administración oral aguda (39). Sin embargo, la Curc puede inhibir las LTDP-glucuronosiltransferasas (73). Nuestro éxito en la detección de Curc libre puede estar relacionado con el hecho de que la administración crónica inhibe la glucuronidación o con la mejora de nuestros métodos de detección (58).

Se ha sugerido con anterioridad que el ayuno era necesario para optimizar la absorción de Curc tras una administración aguda, mientras que los alimentos podrían reducir la eficacia de la Curc, posiblemente debido a la reducción de su absorción intestinal (23). Nuestros datos no solamente confirmaron que los alimentos atenúan la absorción y la eficacia de la Curc administrada por sonda, sino que también demostraron una supresión incluso superior de la eficacia de la TC. Por tanto, a fin de superar la reducción de la absorción, se empleó una dosis superior (unos 2.000 µg por día) con la administración con la comida. El aumento de la velocidad de vaciado estomacal, como la inducida por los alimentos sólidos, puede reducir la absorción de compuestos neutros, dado que pueden ser absorbidos en cierta medida directamente del estómago (74). Dado que los alimentos calientes y las comidas con un elevado contenido en grasa pueden tener un efecto opuesto sobre los alimentos sólidos por lo que respecta al vaciado del estómago, reduciendo su velocidad (74), es posible que en los seres humanos, a diferencia de los ratones, la Curc se absorba mejor con comidas calientes con un elevado contenido en grasa, una controversia que es necesario resolver. Por otra parte, otra explicación de cómo los alimentos podrían reducir la absorción de la Curc o la TC (y su eficacia) en los ratones es mediante la estimulación de la motilidad gástrica, que puede disminuir la absorción de algunos fármacos, al incrementar la velocidad de tránsito a través del intestino (74). En resumen, además de confirmar que la TC es mucho mejor absorbida en el tracto GI respecto de la Curc, nuestros datos demuestran por primera vez que la TC y la Curc libre se pueden detectar en plasma tras la administración oral crónica (en la comida) y sugieren que, incluso cuando el ayuno no resulta posible, la administración crónica en la dieta puede mejorar la limitada absorción oral de la Curc.

Estabilidad de la Curc y la TC en plasma frente al cerebro — Los elevados ratios de la TC respecto de la Curc en plasma demuestran que la biodisponibilidad mejorada de la TC en plasma no se debió únicamente a una mejora de la absorción GI, dado que estos ratios se observaron en animales inyectados en los que los niveles de TC fueron entre 4 (i.m.) y 7 (i.p.) veces superiores que los niveles de Curc, debido posiblemente a una mejor estabilidad de la TC en plasma. Esto coincide con los datos *in vitro* que demuestran que la TC no se degrada en solución PBS, con independencia del pH, tras 8 horas de incubación a 37°C (39), mientras que el 90% de la Curc se degrada antes de 4 horas (39, 40). La inestabilidad de la Curc como resultado de la hidrólisis en soluciones tampón acuosas (39, 40) y en plasma, con independencia de la vía de administración, no implica necesariamente inestabilidad en compartimentos lipídicos como el cerebro, donde la hidrólisis puede ser limitada. Nuestros datos sugieren que la Curc puede ser igual de estable o incluso más que la TC en el cerebro, dado que los niveles de Curc fueron equivalentes o en ocasiones superiores a los de la TC, a pesar de mantener unos niveles más reducidos en plasma. En resumen, la Curc no solamente tiene una absorción limitada, sino que se prevé que sea sumamente inestable en compartimentos acuosos como el plasma; sin embargo, puede ser más estable si se administra en un compartimento rico en lípidos, como el cerebro.

Absorción reducida de TC en el cerebro en comparación con la Curc — Los ratios de los niveles cerebrales respecto de los plasmáticos alcanzaron una media de 1:7 en el caso de la TC y prácticamente de 1:1 en el caso de la Curc. Esto resultó sorprendente y puede reflejar diferencias en el transporte por la barrera sangre-cerebro, el aclaramiento del cerebro o del plasma, resultantes de diferencias en la estructura química, la sulfatación o glucuronidación. Se ha señalado que la Curc total (incluyendo la sulfatada y glucuronidada) fue relativamente baja en el cerebro en comparación con el plasma, y se ha sugerido que el principal factor que limitó la entrada de Curc en el cerebro fue su glucuronidación (75). Probablemente la entrada de la TC en el cerebro también se ve limitada por la glucuronidación. Nuestras mediciones de la TC y la Curc libre en el cerebro en comparación con el plasma sugieren que la Curc es mejor absorbida por el cerebro que la TC.

Efectos de la TC y la Curc sobre el IL-1β y/o la gliosis — La Curc y la TC parecieron ser inhibidores similarmente potentes de la citoquina inflamatoria IL-1β y el marcador astrocítico GFAP. Tanto la Curc como la TC, por todas las vías de administración, atenuaron de forma efectiva la inducción aguda mediante LPS de la IL-1β a concentraciones muy limitadas en el cerebro (0,042-0,027 µg/10 mg proteína, aprox. 0,1 µM), incluso cuando los niveles en plasma se mantenían por debajo del límite de detección.

La regresión de la inhibición de la IL-1β y los niveles de Curc mostraron un solapamiento preciso respecto a los niveles de IL-1β y TC, lo que demuestra que no se apreciaron diferencias claras en las potencias de estos compuestos. De forma similar a lo sucedido en el modelo de la inflamación aguda, en el modelo crónico del ratón transgénico Tg2576 APP de la inflamación cerebral y la AD, tanto la TC como la Curc redujeron de forma equivalente los niveles de IL-1β, lo que demuestra que ambas inhiben fuertemente la inflamación y que lo consiguen a niveles reducidos. En múltiples sistemas, incluyendo nuestro informe previo sobre el modelo de Tg2576 (26), la Curc es un potente inhibidor de la inducción de la citoquina inflamatoria, incluyendo la IL-1β, tal y como se ha revisado en (76). Esta es la primera demostración del efecto de la TC sobre la IL-1β en este modelo. A pesar de que se dispone de menos datos acerca de la actividad antiinflamatoria de la TC, se cree que la actividad de la Curc está

mediada por la limitación de la actividad de los factores de transcripción AP-1 (45), NF- κ B (46), o los coactivadores de AP-1, la histona acetiltransferasa p300 (HAT, (77, 78)). La inhibición de la Curc de AP-1 y NF- κ B provoca la inhibición de la cicloxigenasa-2 (COX-2) en una línea de células microgliales (79). Lo que no está tan claro es en qué se diferencia la Curc de la TC en estas actividades. Un informe sugirió que en comparación con la TC, la Curc era un inhibidor más potente de la COX-2 en las células intestinales (50), aunque otro consideró que su potencia era similar en una línea de células macrófagas (80). En resumen, las concentraciones submicromolares de la TC y la Curc *in vivo* inhiben de forma significativa la IL-1 β en los modelos agudos y crónicos, sin que se produzca una diferencia clara en la eficacia, lo que demuestra que los enlaces dobles C=C de la dienona de la Curc no son necesarios para la inhibición de la IL-1 β *in vivo*.

5 *Efectos de la TC y la Curc sobre la expresión de iNOS* — De forma similar a la gran potencia demostrada por la TC y la Curc sobre la IL-1 β y la gliosis, ambas inhibieron notablemente el mRNA y la proteína de iNOS a niveles cerebrales muy reducidos (0,1 μ M). Ambas inhibieron también de forma significativa la inducción de la iNOS en microglías y neuronas. Dado que tanto la Curc como la TC demostraron tanta potencia *in vivo* y a unas concentraciones tan limitadas, resultó difícil distinguir si existía alguna diferencia en términos de potencia. La primera sugerencia de que la Curc era ligeramente más efectiva que la TC en la inhibición de la iNOS se derivó de la correlación entre los niveles de TC frente a Curc y el mRNA de la iNOS, que demuestran que por encima de una inhibición máxima del 20% se precisaban unos niveles cerebrales superiores de TC que de Curc para conseguir el mismo porcentaje de inhibición de iNOS. Se observaron evidencias más sólidas, que respaldan un efecto más potente de la Curc sobre la inhibición de la iNOS, en los animales sin ayuno en los que los niveles cerebrales de Curc se encontraban por debajo del límite de detección, a pesar de que la administración era efectiva reduciendo la inducción de la proteína de la iNOS. Esta observación fue coherente con un informe anterior que revelaba que la Curc *in vitro* era más potente que la TC inhibiendo la iNOS en una línea de células macrófagas (43). Una posible explicación de esta inhibición más potente de la iNOS por parte de la Curc puede estar asociada a la mayor potencia de la Curc inhibiendo la LOX (80). La IL-1 β (inducida por LPS o por transgen) induce la fosfolipasa 2 que puede desencadenar la activación del sistema de la lipoxigenasa, que puede desencadenar entonces la expresión de iNOS mediada por NF- κ B (81). La actividad antiinflamatoria de la Curc también se podría conseguir a través del producto de su descomposición hidrolítica, el ácido ferúlico, pero el ácido ferúlico cargado alcanzaría una escasa penetración en el cerebro y no sería un producto de la TC más estable.

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

La TC también carece de la funcionalidad de la cetona α , β -insaturada (dienona), necesaria para someterse a la adición de Michael (la adición nucleofílica de carbaniones a compuestos de carbonilo α , β -insaturado). La fracción de dienona puede ser importante para algunas de las actividades antiinflamatorias de la Curc, así como para su capacidad de quelar metales. Sin embargo, nuestros datos demuestran que la dienona no es necesaria para la inhibición de la iNOS, porque no se encuentra presente en la TC. Se ha sugerido que dos de las principales actividades antiinflamatorias de la Curc, la inhibición de AP-1 o NF- κ B, se encuentran presentes en análogos sin la fracción de dienona, lo que sugiere que el reactivo aceptor de Michael no es necesario para estas actividades (45, 46). Por tanto, no podemos excluir un efecto de la inhibición de AP-1 o NF- κ B en la mediación de la inhibición de la iNOS por parte de la TC. Sin embargo, parece más probable que la TC actúe sobre la activación de la JNK en sentido ascendente de AP-1 como se debate a continuación.

Efectos antioxidantes de la TC y la Curc — A pesar de que tanto la Curc como la TC redujeron efectivamente la formación de NT, la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas, la Curc fue más eficaz que la TC inhibiendo los daños oxidativos en el cerebro, especialmente los carbonilos. La Curc inhibió la oxidación de proteínas a niveles cerebrales muy limitados (0,042 μ g/10 mg de proteína, unos 114 nM), e inhibió tanto la peroxidación de lípidos (medida por F2-isoprostanos) como la oxidación de NO (medida mediante NT) a unos niveles cerebrales iguales o superiores a 200 nM. Por ejemplo, los niveles cerebrales de Curc tras la inyección i.p. de Curc fueron los mismos que los niveles de TC tras la inyección i.p. de TC, pero solamente la Curc inhibió la NT, lo que sugiere que puede ser el inhibidor más potente de la oxidación de NO. Esta actividad es coherente con las observaciones de que la Curc redujo la formación de peroxinitrito *in vitro* (82) e *in vivo* (inyectada) en un modelo de rata de isquemia cerebral (83). La Curc en la comida también fue efectiva inhibiendo la peroxidación de lípidos en un modelo de infusión de amiloide (28) y los carbonilos tanto en un modelo de Tg2576 de AD (26) como en un modelo de traumatismo cerebral (84). El presente informe es el primero que demuestra la eficacia de la TC sobre los daños oxidativos del CNS. Nuestros resultados que demuestran que la Curc es más potente inhibiendo la peroxidación de lípidos que la TC resulta sorprendente, dado que la TC actúa moderadamente mejor que la Curc *in vitro* en los fantasmas de eritrocitos de membrana tratada con tertbutilhidroperóxido (42, 87) e *in vivo*, incluyendo las enzimas de detoxificación renal de fase II nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH)-quinona reductasa y glutatión S-transferasa (GST, (44)). Los motivos de las discrepancias podrían ser que las limitadas investigaciones que comparan estos dos compuestos no tienen en cuenta el papel del quelado de metales, del que carece la TC. El quelado de metales puede resultar crítico para la reducción del daño oxidativo o la patogénesis de las placas (85). La pérdida del equilibrio de ceto-enol y la carga de carbaniones que se produce con la conversión de la Curc en TC debería reducir la capacidad de la TC para quelar metales. Los estudios de la estructura/función de las actividades antioxidantes sugieren que los grupos fenólicos 4-hidroxi-3-metoxi, que son comunes a la TC y a la Curc, son críticos para los efectos antioxidantes (86). Otra explicación de las discrepancias con la bibliografía en las potencias diferenciales documentadas de la Curc y la TC sobre la peroxidación de lípidos es que los estudios anteriores utilizaron dosis *in vivo* 170 veces superiores que en nuestro experimento (44), e *in vitro* los efectos diferenciales se observaron únicamente a dosis elevadas (150 μ M), lo que no se puede conseguir mediante la administración oral (42). Los niveles cerebrales de TC fueron solo 1/7 de los niveles plasmáticos reduciendo su ventaja de

administración sistémica. En resumen, nuestros datos demostraron que a pesar de que tanto la Curc como la TC podrían atenuar la inducción de F2-isoprostanos si los niveles cerebrales son cercanos a 0,2 μM o superiores, pero la Curc pareció ser ligeramente más potente.

5 *Efectos de la TC y de la Curc sobre el A β en el ratón Tg2576* — La Curc fue más efectiva que la TC atenuando la patogénesis de las placas, tal y como sugiere la reducción del tamaño de las placas, la carga de placas y la reducción de los niveles de A β en el compartimento insoluble en detergente. Esta fue una conclusión significativa, que demuestra una diferencia clara e importante entre los dos compuestos. El efecto inhibitorio de la Curc sobre la formación y la desagregación de fibrillas y oligómeros se había demostrado previamente en una cohorte de animales diferente (27) y los potentes efectos contra la formación o desagregación de fibrillas se había observado con anterioridad (88-90); sin embargo, esta es la primera vez que se ha documentado un efecto diferencial de la Curc frente a la TC *in vivo*. Es interesante señalar que se ha documentado *in vitro* que, a pesar de que la adición o eliminación de los grupos metoxi de los anillos fenólicos no atenuó la potencia de los curcuminoides para reducir la formación de fibrillas, la pérdida de los dobles enlaces de dienona resultó en una pérdida de inhibición de las fibrillas (88). En su conjunto, estos datos plantean la posibilidad de que el puente de dienona no solamente es crítico para la inhibición de la agregación de amiloide *in vivo*, sino que también es necesario para una reducción máxima de las placas de amiloide *in vivo*. La Curc es menos estable que la TC y, por tanto, se puede metabolizar más rápidamente en ácido ferúlico, lo que también afecta a la formación de fibrillas; sin embargo, las concentraciones EC50 para la desagregación del A β fibrilar son unas 10 veces superiores para el ácido ferúlico que para la Curc (91), lo que contradice la existencia de un papel sustancial del metabolito por lo que respecta a la mayor eficacia de la Curc sobre las placas y el A β insoluble *in vivo*. No obstante, otros factores distintos de la unión del amiloide pueden explicar los efectos más potentes de la Curc por lo que respecta a la reducción de las placas *in vivo*, como el quelado de metales, que se sabe que reduce la formación de placas (85). A pesar de que la TC no se une bien a los metales (véase más arriba), la Curc se une fácilmente al Cu^{2+} y Fe^{2+} (92). Las mediciones espectrofotométricas de la unión de la Curc a los metales demuestran una afinidad en un rango comparable a la del A β por los metales, lo que sugiere que la Curc podría competir por los metales o eliminar los metales del A β (92). En resumen, la Curc, aunque no así la TC, redujo el A β insoluble y la carga de placas, posiblemente debido a la capacidad de la Curc para unirse directamente y desagregar las fibrillas, y/o por la capacidad del puente de dienona de quelar metales. Esto respalda el uso de la Curc, en detrimento de la TC, para la reducción terapéutica de la deposición de placas de la AD.

10
15
20
25
30
35
40
45
50
Nuestros datos sobre los niveles de A β soluble confirmaron nuestro informe anterior sobre los efectos de la Curc en la reducción del A β soluble en el Tg2576, mostrando una disminución similar del 50% (26). Nuestros niveles de A β soluble (TBS) en los ratones Tg2576 de edad avanzada se encuentran muy por encima de los niveles basales de producción del monómero de A β en los Tg2576 e incluyen claramente agregados solubles (oligómeros) como los mostrados en los inmunoensayos Western blot. Se podría presumir que, si los compartimentos de A β insoluble y soluble estuviesen en equilibrio, los fármacos que reducen la agregación de A β o que incrementan el aclaramiento de A β reducirían de forma similar tanto las placas fibrilares de amiloide como los oligómeros solubles, como observamos en el caso de la Curc. La conclusión sorprendente fue que la TC no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre las placas o el A β insoluble, aunque redujo el A β soluble en un 75%, de forma más efectiva que la Curc. Una posibilidad es que, a pesar de tener una estructura muy similar y de una mayor afinidad de la Curc por las fibrillas (88), la TC puede tener una mayor afinidad de unión por los oligómeros. Sin embargo, en el ensayo libre de células, la Curc y la TC fueron igualmente potentes desagregando oligómeros de elevado peso molecular. Una segunda posibilidad es que la TC sirva de sumidero periférico para los oligómeros del CNS, de forma similar al aclaramiento de A β del cerebro tras la administración periférica de anticuerpos anti-A β (93, 94). A diferencia de la Curc, donde el gradiente plasma/cerebro era cercano a 1, en el caso de la TC, los ratios plasma/cerebro oscilaron entre 4:4 (i.m.) y 11:1 (i.p.); por tanto, la TC puede ser capaz de secuestrar los oligómeros de A β y favorecer su salida del CNS. Una tercera posibilidad es que la inhibición de la JNK por parte de la TC reduzca la producción de A β , dado que datos recientes han demostrado una reducción de la producción de A β con inhibidores de la JNK *in vitro* (95) y con el ratón *JNK knockout* cruzado con el ratón APP Tg *in vivo* (96). En resumen, la reducción del A β soluble por parte de la Curc, y particularmente de la TC, tiene gran relevancia para la intervención en la AD, dado que las placas no se correlacionan bien con el deterioro cognitivo (97) y los oligómeros de elevado peso molecular están implicados en la pérdida sináptica y la neurodegeneración en la AD (61, 98-102).

55 *Efectos de la TC y la Curc sobre la pJNK en el ratón Tg2576* — La Curc parece abordar las cascadas inflamatorias a través de múltiples mecanismos, mediante la inhibición de: 1) NF- κB bloqueando la degradación de I κB y la importación nuclear de NF- κB , 2) AP-1 bloqueando directamente su interacción con su motivo de unión a DNA (103), y 3) AP-1 inhibiendo los mediadores en sentido ascendente, tales como la activación de la JNK, a dosis inferiores y más fáciles de conseguir (aprox. 10 nM o menos) (20). La Curc inhibe la JNK a través de un mecanismo en sentido ascendente no identificado, dado que la Curc no puede interactuar directamente con la JNK o los mediadores directos en sentido ascendente SEK1, MEKK1 o HPK1 (104). Observamos que la TC fue sorprendentemente mejor que la Curc ($p < 0,002$) inhibiendo la JNK *in vivo*, en el modelo Tg2576. Este es el primer informe de que la TC puede inhibir la JNK, que demuestra claramente que la adición de Michael no es necesaria para la inhibición de JNK *in vivo*. A pesar de que el A β soluble, que experimentó una reducción notablemente mayor con la TC (no el A β fibrilar), estaba muy estrechamente correlacionado con la JNK, no está claro si las reducciones de la JNK asociadas al curcuminoides contribuyeron a la reducción de los oligómeros. Se plantea la hipótesis de que la activación de la JNK, una tau quinasa, media en la fase final de la neurodegeneración (105), se regula al alza en la AD (11) y modelos

transgénicos de la AD (12, 13) y puede mediar en la inhibición del oligómero del A β de la LTP sin pérdida de neuronas (106). La JNK se puede activar fácilmente mediante las especies de oxígeno reactivas (ROS) que causan el daño oxidativo, al menos a través de 4 sistemas cistosólicos diferentes, así como por el sistema de la balsa lipídica de la membrana (10). En resumen, la Curc no solamente puede inhibir la JNK *in vitro* (20), sino también *in vivo*. Nuestros datos demuestran por primera vez que la TC también puede actuar como inhibidor de la JNK *in vivo*, y con más potencia que la Curc. Ambas están estrechamente correlacionadas con las reducciones del A β soluble, aunque todavía no está claro si la TC actuó directamente sobre el sistema de la JNK, como se demostró en el caso de la Curc en otros muchos sistemas, o si actúa a través de la reducción del A β soluble, o ambas cosas.

Sinergias TC/Curc — La TC libre detectada en el plasma de los ratones alimentados con Curc fue aproximadamente el 25% de los niveles de Curc libre. Se ha documentado que la Curc se reduce *in vitro* a TC libre. En el citosol del tejido intestinal incubado con Curc (41), no existen informes previos de TC libre *in vivo* tras el tratamiento con Curc. *In vivo*, los glucuronidos de la TC o la TC total tras la β -glucuronidasa se han detectado en el plasma de los ratones inyectados (i.p.) con Curc o en el suero (44) o el plasma (48) de los ratones alimentados con Curc. No obstante, los curcuminoides-glucuronidos son eliminados muy rápidamente por el riñón y pueden no tener ninguna bioeficacia. Una explicación de nuestra capacidad de medir la TC libre más relevante desde un punto de vista funcional en los animales tratados con Curc puede ser el aumento de la sensibilidad de nuestro ensayo publicado (59). En resumen, nuestra observación de la TC libre en los ratones alimentados con Curc es la primera demostración de la bioconversión de Curc en TC libre, y sugiere su presencia en una concentración lo suficientemente elevada como para contribuir a la eficacia.

Las observaciones de que la Curc fue mejor reduciendo la patogénesis de las placas y los carbonilos, mientras que la TC fue mejor reduciendo el A β soluble y la pJNK, planteó la cuestión de si la Curc y la TC podrían contribuir a la eficacia y si podrían realmente actuar de forma sinérgica en modelos crónicos. Demostramos un efecto sinérgico, mejorado de la TC y la Curc cuando se administran conjuntamente respecto de la administración de cada una de ellas por separado (a la misma concentración total de curcuminoide) en tres sistemas: 1) atenuación de la iNOS inducida por LPS en neuronas primarias y una línea de células microgliales; 2) bloqueo de la toxicidad del A β en un modelo de neuroblastoma; y 3) desagregación de oligómeros de elevado peso molecular preagregados.

Conclusiones — Nuestros datos demuestran que, a pesar de la absorción gastrointestinal y/o estabilidad notablemente superior de la TC, que obtuvo unos niveles plasmáticos entre 4,3 (i.m.) y 6,7 (i.p.) veces superiores que unas dosis iguales de Curc, los niveles cerebrales obtenidos con la Curc fueron similares o incluso mayores que los de la TC. Tanto la Curc como la TC, a niveles nanomolares, atenuaron la inducción aguda por LPS de la iNOS, NT, carbonilos y peroxidación lipídica. Esto se produjo a pesar de las evidencias que demuestran que, a diferencia de la Curc, la TC no inhibe los posible objetivos antiinflamatorios a través de la adición de Michael. De este modo, en el modelo amiloide crónico de la AD, la TC y la Curc tuvieron efectos similares sobre la reducción del IL-1 β y la GFAP. Resulta interesante señalar que la TC y la Curc tuvieron efectos diferentes sobre el A β , dado que solamente la Curc redujo la patogénesis de las placas y la TC tuvo un efecto más potente sobre la reducción de la activación del A β soluble y la JNK. Por último, la TC y la Curc parecieron ejercer efectos diferenciados y sinérgicos sobre los sistemas patógenos de la AD, lo que respalda la justificación del uso conjunto de la TC y la Curc como estrategia de intervención en la AD.

*NOTAS AL PIE

AG028583 (SAF), AG021975 (SAF), AG016570 (Cummings. Project 1. GMC). Agradecemos el soporte original de la señora K.K. Siegel con respecto a la curcumina, hace 10 años, en un Centro Piloto de UCLA beneficiario de una subvención para la investigación relacionada con el envejecimiento.

¹ Las abreviaturas empleadas son las siguientes: Curc, curcumina; TC, tetrahidrocurcumina; i.p., intraperitoneal, i.m., intramuscular, NF κ B, factor nuclear kappa B, A β , péptido beta-amiloide; iNOS, sintasa inducible del óxido nítrico; LPS, lipopolisacárido; JNK, quinasa N-terminal de cJun; NT, nitrotirosina; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; IL-1 β interleuquina- β ; AD, enfermedad de Alzheimer; ROS, especies de oxígeno reactivas; RNS, especies de nitrógeno reactivas; CNS, sistema nervioso central; COX, ciclooxigenasa; HAT, histona acetiltransferasa; NSAIDs, fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Las vías de administración aguda y crónica de la Curc y la TC en ratones se emplearon para investigar la bioabsorción y la bioeficacia. *A*, los ratones fueron tratados con Curc o TC por sonda (gav), inyección intraperitoneal (i.p.), o inyección intramuscular (i.m.), empleando dosis de 0,4, 0,4, o 0,2 μ moles (148, 148, 73.4 μ g), respectivamente. *B*, Los ratones transgénicos Tg2576 APP^{sw} de edad avanzada fueron alimentados con dietas *ad libitum* con o sin Curc y TC durante cuatro meses a 500 ppm en la comida (500 mg/kg comida).

Fig. 2. Los cromatogramas de la HPLC demostraron una detección de Curc o TC en plasma y en el cerebro tras la inyección i.m., pero no en los extractos de tejido de control. Las estructuras de la Curc (*A*) y la TC (*B*) con círculos que destacan las diferencias estructurales entre ellas en el puente de dicetona. Las longitudes de onda para la detección UV de la Curc y la TC fueron de 262 nM y 280 nM, respectivamente. Los cromatogramas de la HPLC de plasma (*C*, *D*) y cerebro (*E*, *F*) se muestran para la Curc y la TC, respectivamente. La Curc se detectó a un tiempo de retención de 5,56 minutos y el estándar interno (ISD)

a los 10,898 minutos (C E), mientras que la TC se detectó a los 10,6 minutos y el ISD a los 19,9 minutos (D, F). Las muestras de control solamente mostraron el nivel máximo de ISD, sin niveles máximos de TC ni Curc (G, H). Las flechas indican los tiempos de retención máximos. Los cromatogramas mostrados son representativos de los análisis realizados con plasma o tejido cerebral de tres o cuatro ratones. mAU indica miliunidad de absorbancia.

Fig. 3. La Curc y la TC suprimieron el mRNA y la proteína de iNOS inducida por LPS. A los ratones se les inyectaron los LPS o el vehículo, fueron sacrificados 4 horas después de la administración de la Curc (A) o la TC (B), y el supernatante de los cerebros extraídos en TBS fue sometido a electroforesis en Western blot y a inmunotinción con anti-iNOS y β -actina. Se muestran las líneas representativas y su cuantificación densiométrica. C) Se extrajo RNA del cerebro y se midió para detectar mRNA de iNOS mediante RT-PCR cuantitativa. D) El porcentaje de inhibición de la iNOS se sometió a regresión respecto de las concentraciones de Curc y TC. Círculos cerrados, Curc; círculos abiertos, TC. Los valores mostrados son la cantidad de mRNA de iNOS en forma de la media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ representan una diferencia significativa en comparación con controles positivos (tratamiento de LPS solo; $n=4$).

Fig. 4. La inyección aguda de TC y Curc atenúan de forma similar la inducción de IL-1 β y F2-isoprostano, aunque con sonda solamente se suprime la IL-1 β . (A) La cuantificación de los niveles de IL-1 β en homogeneizados de cerebro de ratón se determinó mediante ELISA de fase doble. Los ratones pretratados con o sin Curc y TC muestran que la inyección de LPS (i.p.) incrementa los niveles de IL-1 β más de 6 veces, un efecto que se ve parcialmente suprimido (>50%) en la administración aguda de Curc o TC, con independencia de la vía de administración. (B) La correlación de los niveles de Curc o de TC con el porcentaje de inhibición de la IL-1 β fue estadísticamente significativa. (C) Los niveles de 8-iso-PGF2a se midieron en extractos lipídicos de cerebro pulverizado congelado mediante ELISA para evaluar la peroxidación lipídica y se demostró que se incrementaron en un 40% por la inyección de LPS. A pesar de que la administración aguda por sonda de TC o Curc no fue suficiente para afectar a la peroxidación lipídica del cerebro, la inducción de la peroxidación lipídica se vio parcialmente suprimida por la inyección i.p. y completamente suprimida por la inyección i.m. de cualquiera de los compuestos. (D) La correlación entre los niveles cerebrales de Curc o TC y los niveles cerebrales de F2-isoprostano fue significativa. No obstante, la Curc produjo una mayor inhibición de F2-isoprostano que la TC cuando los niveles alcanzados subieron por encima de 0,075 μ g/mg de proteína. Los valores mostrados son la media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ representan una diferencia significativa en comparación con controles positivos (tratamiento de LPS solo; $n=4$).

Fig. 5. La administración aguda de Curc o TC (por inyección i.m.) suprime de forma similar la inducción por LPS de nitrotirosina (NT) en el cerebro, pero la Curc administrada por sonda o i.p. es más efectiva que la TC en la supresión de carbonilos. (A) Las proteínas de NT de homogeneizados de cerebro de ratón se midieron mediante inmunoensayo Western blot con anticuerpo anti-nitrotirosina. El panel superior muestra un Western blot representativo de nitrotirosina y β -actina de control. La cuantificación densiométrica de las bandas y la normalización a β -actina mostraron una inducción más de 7 veces superior de NT por inyección de LPS respecto del vehículo. A pesar de que la administración aguda por sonda de Curc o TC no demostró ningún efecto sobre la inducción de NT, la inyección i.m. de cualquiera de los compuestos suprimió la inducción de NT. La inyección intraperitoneal de Curc suprimió parcialmente la inducción de NT, mientras que la inyección i.p. de TC no afectó a la inducción de NT. Los niveles de proteína oxidada del cerebro se determinaron en el supernatante extraído de la lisis de los gránulos insolubles en TBS, utilizando un análisis Oxyblot con un anticuerpo anti-DNP. El impacto de la Curc (B) o la TC (C) sobre los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas se muestran mediante líneas representativas a la izquierda. Los valores cuantificados a la derecha son la media \pm SD. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ representan una diferencia significativa en comparación con controles positivos (tratamiento de LPS solo; $n=4$).

Fig. 6. Los niveles cerebrales y de eficacia de la Curc y la TC administradas por sonda se reducen si los ratones no ayunan. Se administraron 480 μ g de Curc o TC por sonda a los ratones en condiciones de ayuno (FAS) o sin ayuno (nFAS) y posteriormente, transcurridas 4 horas, se extrajeron los cerebros y se prepararon para el análisis de los niveles de Curc y TC mediante (A) HPLC y (B) proteína iNOS mediante análisis de Western donde el panel superior mostró un Western blot representativo de la iNOS y la β -actina (control endógeno). Cuando los ratones disponían de comida, los niveles de Curc no fueron detectables y los niveles de TC se redujeron en un 50% respecto de los niveles obtenidos en ayunas. La Curc y la TC no fueron tan eficaces reduciendo la iNOS cuando los ratones disponían de comida. Los valores mostrados son la media \pm SD. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ representan una diferencia significativa en comparación con el control (con, no tratados, $n=4$) Curc o TC por sonda $n=4$, cada tratamiento (ND, no detectable).

Fig. 7. La Curc administrada en la dieta parece más efectiva que la TC reduciendo la patología de las placas en el ratón Tg2576 APPsw, aunque ambas reducen los niveles de A β soluble. Se administró Curc o TC a ratones Tg2576 de edad avanzada durante 4 meses (12-16 meses de edad) con la comida (500 ppm) durante la deposición acelerada de la placa. Las micrografías representativas teñidas con anticuerpos

para A β (DAE, anti A β 1-13) demostraron que, a diferencia de los ratones Tg+ sometidos a la dieta de control (A y B), los ratones con la dieta de Curc demostraron una notable reducción del número y tamaño de las placas (C y D). Sin embargo, las secciones de los ratones con la dieta de TC (E y F) demostraron una distribución de las placas similar a la de los ratones con la dieta de control. A pesar de que la cuantificación del análisis de la imagen confirmó que la dieta de Curc podría reducir el tamaño de las placas (G) y la carga de placas (H), la dieta de TC pareció no tener ningún efecto sobre la patología de las placas. El análisis bioquímico del A β insoluble en guanidina de los homogeneizados (I) corticales mediante ELISA de fase doble de A β reveló unos resultados similares, lo que demuestra la eficacia de la Curc y la ineficacia de la TC reduciendo los niveles de A β insolubles. Al contrario, tanto la Curc como la TC suprimieron los niveles de A β soluble en los homogeneizados cerebrales, siendo la TC más potente (I) Barra de aumento=75 μ m. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA de dos factores y los valores mostrados son la media \pm SD. * p<0,05, ** p<0,01 y *** p<0,001 representan una diferencia significativa de la dieta de control (dieta de reducción de ácidos grasos poliinsaturados n-3; n=5) y la dieta estándar (n=5) en comparación con el tratamiento de Curc (n=9) y TC (n=7) de los ratones Tg+, respectivamente.

Fig. 8. Las dietas de Curc o TC mejoraron la activación glial dependiente de Tg2576. Las micrografías demuestran que, a diferencia de los cerebros de los ratones Tg- (A y B), los cerebros de los ratones Tg+ (C y D) demostraron un incremento de la tinción para GFAP. A diferencia de los ratones Tg+ alimentados con la dieta de control, los ratones Tg+ alimentados con Curc (E y F) o TC (G y H) en la comida demostraron una GFAP reducida (activación glial). La cuantificación del porcentaje de tinción de GFAP demostró una atenuación significativa de la gliosis dependiente de transgen, tanto con la TC como con la Curc. Los valores mostrados son la media \pm SD. **p<0,01 representa una diferencia significativa del tratamiento de la Curc (n=9) o la TC (n=7) en los ratones en comparación con la dieta de control (n=5). Barra de aumento=75 μ m.

Fig. 9. En los ratones APPsw Tg2576, tanto la dieta de Curc como la de TC redujeron la IL-1 β y la fosforilación de la quinasa N-terminal de cJun (pJNK), mientras que la Curc, aunque no así la TC, redujo los carbonilos. (A) A diferencia de los ratones Tg+ con la dieta de control, los ratones alimentados con Curc o TC demostraron una reducción del 25% de los niveles de IL-1 β medidos mediante un ensayo ELISA de fase doble de la fracción supernatante extraída del TBS del homogeneizado del cerebro. (B) A diferencia de los ratones Tg+ con la dieta de control, la presencia de Curc en el cerebro redujo los carbonilos medidos por Western blot con anticuerpo anti-DNP de los extractos de solución tampón con detergente de los homogeneizados del cerebro. A pesar de que los ratones alimentados con TC mostraron una tendencia a la reducción, esta no fue estadísticamente significativa. (C) A diferencia de los ratones alimentados con la dieta de control, los alimentados con TC o Curc demostraron una pJNK reducida: las líneas representativas muestran las bandas de 46 y 56 KDa. La cuantificación densitométrica demostró que en comparación con los ratones Tg+ alimentados con la dieta de control, los ratones alimentados con Curc y TC mostraron reducciones en la pJNK, registrando la TC una mayor reducción. Los valores mostrados son la media \pm SD. * p<0,05, ***p<0,01 y ****0,001 representan una diferencia significativa del tratamiento de la Curc (n=9) o la TC (n=7) en los ratones Tg+ con la dieta de control (n=5).

Fig. 10. Bioconversión de la Curc a TC *in vivo* y sus sinergias reduciendo la iNOS, la toxicidad de A β y la agregación de A β *in vitro*. (A) Se recogieron muestras de plasma de ratones alimentados durante 4 meses *ad libitum* con Curc en la comida (500 ppm, n=5). Los cromatogramas del plasma en columnas de HPLC de fase reversa C₁₈ muestran máximos de Curc y TC utilizando longitudes de onda de 262 y 280 nm, respectivamente. Las flechas muestran tiempos de retención máximos de la auténtica Curc y TC a 5,7 y 10,9 min, respectivamente, y el estándar interno (ISD) a R= 11,8 y 21.1 min., respectivamente. (B) Sinergia antiinflamatoria de la Curc y la TC sobre la iNOS. Los cultivos de neuronas corticales primarias (B) y la línea de células microgliales BV-2 (no mostrada), fueron tratados con LPS (50 μ g/ml), y los niveles de proteína de iNOS inducidos se midieron en la fracción soluble en detergente con o sin Curc (2,5 μ M), TC (2,5 μ M), Curc+TC (1,25 μ M de cada), o vehículo. El panel superior mostró las líneas representativas del Western blot de la iNOS y β -actina (control endógeno). La cuantificación densitométrica de la banda de iNOS mostró la inducción de iNOS por LPS esperada, que fue atenuada por la Curc (50%) y la TC (80%), pero completamente suprimida por la combinación de Curc + TC (95%). (C) El impacto de la exposición previa con Curc y/o TC sobre el oligómero AP42 (500 nM) -indujo la muerte celular del neuroblastoma SH-SY5Y, tras 48 horas de exposición, utilizando la LDH de los medios como índice de toxicidad. El tratamiento del A β incrementó la liberación de LDH (normalizada conforme al porcentaje de LDH máximo), que se podría haber atenuado con Curc (en un 40%) o TC (en un 20%). Sin embargo, la Curc junto con la TC suprimieron la toxicidad del A β (en un 70%), reduciendo notablemente la supresión alcanzada por cualquiera de ellas individualmente. (D) El efecto de la Curc y/o TC sobre los oligómeros preagregados (11 μ M) en un ensayo libre de células. La Curc, TC, Curc+TC (ratio molar de 1,45 a 1), o el vehículo fueron coincubados y agitados durante 72 horas a temperatura ambiente con el oligómero del A β , antes de cargar 500 ng de proteína en una membrana de nitrocelulosa en un aparato de Dot blot. El impacto sobre la oligomerización se determinó mediante un anticuerpo de oligómero específico, A11, mientras que el A β total se midió en inmunoensayos separados, utilizando el anticuerpo

del A β 6E10. Los paneles superiores muestran inmunoensayos Dot blot representativos y los gráficos del panel inferior el análisis cuantitativo de las densidades ópticas (OD) de los Dot blot. La TC fue mejor que la Curc reduciendo la tinción del agregado del oligómero del A β y juntas obtuvieron el mayor efecto, aparentemente desagregando el oligómero del A β . Los valores mostrados son las medias \pm SD; * p<0,5, ** p<0,01, y ***p<0,001 representan diferencias significativas en comparación con el control positivo (n=4) y los tratamientos (n=4).

5

Referencias

1. Nolan, Y., Martin, D., Campbell, V. A., and Lynch, M. A. (2004) *J Neuroimmunol* 151(1-2), 12-23
2. Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., and Rhodes, P. G. (2003) *Brain Res* 975(1-2), 37-47
3. Sheng, J. G., Griffin, W. S., Royston, M. C., and Mrak, R. E. (1998) *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(4), 278-283
4. Atwood, C. S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W. D., Ling, K. Q., Huang, X., Moir, R. D., Wang, D., Sayre, L. M., Smith, M. A., Chen, S. G., and Bush, A. I. (2004) *Biochemistry* 43(2), 560-568.
5. Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Montine, K. S., Horner, P. J., and Montine, T. J. (2003) *J Neurochem* 87(6), 1518-1526.
6. Ayasolla, K., Khan, M., Singh, A. K., and Singh, I. (2004) *Free Radic Biol Med* 37(3), 325-338
7. Hsu, H. Y., and Wen, M. H. (2002) *J Biol Chem* 277(25), 22131-22139
8. Hara, A., and Radin, N. S. (1978) *Anal Biochem* 90, 420-426
9. Montine, T. J., Markesbery, W. R., Zackert, W., Sanchez, S. C., Roberts, L. J., and Morrow, J. D. (1999) *Am J Pathol* 155, 863-868
10. Shen, H. M., and Liu, Z. G. (2006) *Free Radic Biol Med* 40(6), 928-939
11. Ferrer, I., Gomez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribe, E., Dalfo, E., and Avila, J. (2005) *Curr Alzheimer Res* 2(1), 3-18
12. Savage, M. J., Lin, Y. G., Ciallella, J. R., and Flood, D. G. S. R. W. (2002) *J. Neurosci* 22(9), 3376-3385
13. Puig, B., Gomez-Isla, T., Ribe, E., Cuadrado, M., Torrejon-Escribano, B., Dalfo, E., and Ferrer, I. (2004) *Neuropathol Appl Neurobiol* 30(5), 491-502
14. Nathan, C. (1997) *J Clin Invest* 100(10), 2417-2423
15. Floyd, R. A. (1999) *Proc Soc Exp Biol Med* 222(3), 236-245
16. Law, A., Gauthier, S., and Quirion, R. (2001) *Brain Res Brain Res Rev* 35(1), 73-96
17. Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lippa, C. F., and Sporn, M. B. (1996) *J Exp Med* 184(4), 1425-1433
18. Haas, J., Storch-Hagenlocher, B., Biessmann, A., and Wildemann, B. (2002) *Neurosci Lett* 322(2), 121-125
19. Akama, K. T., Albanese, C., Pestell, R. G., and Van Eldik, L. J. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10), 5795-5800
20. Suh, H. W., Kang, S., and Kwon, K. S. (2006) *Mol Cell Biochem*
21. Pendurthi, U. R., Williams, J. T., and Rao, L. V. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(12), 3406-3413
22. Soliman, K., and Mazziro, E. (1998) *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 218(4), 390-397
23. Chan, M. M., Huang, H. I., Fenton, M. R., and Fong, D. (1998) *Biochem Pharmacol* 55, 1955-1962
24. Kakar, S. S., and Roy, D. (1994) *Cancer Lett* 87(1), 85-89
25. Singh, S., and Aggarwal, B. B. (1995) *J Biol Chem* 270(42), 24995-25000
26. Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2001) *J. Neurosci* 21, 8370-8377
27. Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P. P., Kaye, R., Glabe, C. G., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2005) *J Biol Chem* 280(7), 5892-5901
28. Frautschy, S. A., Hu, W., Miller, S. A., Kim, P., Harris-White, M. E., and Cole, G. M. (2001) *Neurobiol Aging* 22, 991-1003

10

29. Garcia-Alloza, M., Dodwell, S. A., Borelli, L. A., Raju, S., and Backsai, B. J. (2006) *Alz & Dementia (ICAD)* 2(3) Suppl I, S617
30. Egan, M. E., Pearson, M., Weiner, S. A., Rajendran, V., Rubin, D., Glockner-Pagel, J., Canny, S., Du, K., Lukacs, G. L., and Caplan, M. J. (2004) *Science* 304(5670), 600-602
31. Ammon, H. P., and Wahl, M. A. (1991) *Planta Med* 57(1), 1-7
32. Kelloff, G. J., Boone, C. W., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubert, R., and Sigman, C. C. (1994) *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 3, 85-98
33. Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Hawk, E. T., Steele, V. E., Lubet, R. A., Boone, C. W., Covey, J. M., Doody, L. A., Omenn, G. S., Greenwald, P., Hong, W. K., Parkinson, D. R., Bagheri, D., Baxter, G. T., Blunden, M., Doeltz, M. K., Eisenhauer, K. M., Johnson, K., Knapp, G. G., Longfellow, D. G., Malone, W. F., Nayfield, S. G., Seifried, H. E., Swall, L. M., and Sigman, C. C. (1996) *J Cell Biochem Suppl* 26, 72-85
34. Christen, S., Woodall, A. A., Shigenaga, M. K., Southwell-Keely, P. T., Duncan, M. W., and Ames, B. N. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3217-3222
35. Chan, M. M., Ho, C. T., and Huang, H. I. (1995) *Cancer Letters* 96, 23-29
36. Cappell, M. S., and Schein, J. R. (2000) *Gastroenterol Clin North Am* 29(1), 97-124, vi
37. McGettigan, P., and Henry, D. (2000) *Curr Pharm Des* 6(17), 1693-1724
38. Bjorkman, D. (1998) *Am J Med* 105(5A), 17S-21S
39. Pan, M. H., Huang, T. M., and Lin, J. K. (1999) *Drug Metab Dispos* 27(4), 486-494
40. Wang, Y. Y., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y., and Lin, J. K. (1997) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15(12), 1867-1876
41. Ireson, C. R., Jones, D. J., Orr, S., Coughtrie, M. W., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P., and Gescher, A. J. (2002) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(1), 105-111
42. Sugiyama, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T. (1996) *Biochem Pharmacol* 52(4), 519-525
43. Pan, M. H., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. (2000) *Biochem Pharmacol* 60(11), 1665-1676
44. Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Tanaka, T., Toyokuni, S., Uchida, K., and Osawa, T. (2001) *J Nutr* 131(8), 2090-2095.
45. Weber, W. M., Hunsaker, L. A., Gonzales, A. M., Heynekamp, J. J., Orlando, R. A., Deck, L. M., and Vander Jagt, D. L. (2006) *Biochem Pharmacol* 72(8), 928-940
46. Weber, W. M., Hunsaker, L. A., Roybal, C. N., Bobrovnikova-Marjon, E. V., Abcouwer, S. F., Royer, R. E., Deck, L. M., and Vander Jagt, D. L. (2006) *Bioorg Med Chem* 14(7), 2450-2461
47. Pan, M. H., Huang, T. M., and Lin, J. K. (1999) *Drug Metabolism and Disposition* 27(4), 486-494
48. Liu, A., Lou, H., Zhao, L., and Fan, P. (2006) *J Pharm Biomed Anal* 40(3), 720-727
49. Lao, C. D., Ruffin, M. T. t., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., and Brenner, D. E. (2006) *BMC Complement Altern Med* 6, 10
50. Ireson, C., Orr, S., Jones, D. J., Verschoyle, R., Lim, C. K., Luo, J. L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W. P., and Gescher, A. (2001) *Cancer Res* 61(3), 1058-1064
51. Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., Marczyklo, T. H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S. M., Pirmohamed, M., Gescher, A. J., and Steward, W. P. (2004) *Clin Cancer Res* 10(20), 6847-6854
52. Back, D. J., and Rogers, S. M. (1987) *Aliment Pharmacol Ther* 1(5), 339-357
53. Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J., Vinters, H. V., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (1998) *Am J Pathol* 152, 379-389
54. Saha, R. N., and Pahan, K. (2006) *Antioxid Redox Signal* 8(5-6), 929-947
55. Small, C. I., Lyles, G. A., and Breen, K. C. (2004) *Neurobiol Dis* 17(1), 70-76
56. Son, M. C., and Brinton, R. D. (1998) *Brain Res* 793(1-2), 244-254

57. Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., and Bistoni, F. (1990) *J Neuroimmunol* 27(2-3), 229-237
58. Heath, D. D., Pruitt, M. A., Brenner, D. E., and Rock, C. L. (2003) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 783(1), 287-295
59. Heath, D. D., Pruitt, M. A., Brenner, D. E., Begum, A. N., Frautschy, S. A., and Rock, C. L. (2005) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 824(1-2), 206-212
60. Lim, G. P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K. H., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2000) *J Neurosci* 20(15), 5709-5714
61. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) *Science* 300(5618), 486-489
62. Jourdan, K. B., Evans, T. W., Curzen, N. P., and Mitchell, J. A. (1997) *Br J Pharmacol* 120(7), 1280-1285
63. Reich, E. E., Markesbery, W. R., Roberts, L. J., 2nd, Swift, L. L., Morrow, J. D., and Montine, T. J. (2001) *Am J Pathol* 158(1), 293-297.
64. Montine, K. S., Quinn, J. F., Zhang, J., Fessel, J. P., Roberts, L. J., 2nd, Morrow, J. D., and Montine, T. J. (2004) *Chem Phys Lipids* 128(1-2), 117-124.
65. Pratico, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2001) *J Neurosci* 21(12), 4183-4187.
66. Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Bella, R., Foresti, R., Bates, T. E., Giuffrida Stella, A. M., and Pennisi, G. (2002) *J Neurosci Res* 70(4), 580-587
67. Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Lynn, B., Markesbery, W. R., and Butterfield, D. A. (2003) *J Neurochem* 85(6), 1394-1401
68. Khana, M. (1981) *Indian drugs* 19, 31
69. Ravindranath, V., and Chandrasekhara, N. (1981) *Toxicology* 22(4), 337-344
70. Kaye, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., and Glabe, C. G. (2004) *J Biol Chem* 279(45), 46363-46366
71. Kitani, K., Yokozawa, T., and Osawa, T. (2004) *Ann N Y Acad Sci* 1019, 424-426
72. Asai, A., and Miyazawa, T. (2000) *Life Sci* 67(23), 2785-2793
73. Basu, N. K., Kole, L., Kubota, S., and Owens, I. S. (2004) *Drug Metab Dispos* 32(7), 768-773
74. Toothaker, R. D., and Welling, P. G. (1980) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20, 173-199
75. Ryu, E. K., Choe, Y. S., Lee, K. H., Choi, Y., and Kim, B. T. (2006) *J Med Chem* 49(20), 6111-6119
76. Chainani-Wu, N. (2003) *J Altern Complement Med* 9, 161-168
77. Mai, A., Rotili, D., Tarantino, D., Ornaghi, P., Tosi, F., Vicidomini, C., Sbardella, G., Nebbioso, A., Miceli, M., Altucci, L., and Filetici, P. (2006) *J Med Chem* 49(23), 6897-6907
78. Marcu, M. G., Jung, Y. J., Lee, S., Chung, E. J., Lee, M. J., Trepel, J., and Neckers, L. (2006) *Med Chem* 2(2), 169-174
79. Kang, G., Kong, P. J., Yuh, Y. J., Lim, S. Y., Yim, S. V., Chun, W., and Kim, S. S. (2004) *J Pharmacol Sci* 94(3), 325-328.
80. Hong, J., Bose, M., Ju, J., Ryu, J. H., Chen, X., Sang, S., Lee, M. J., and Yang, C. S. (2004) *Carcinogenesis* 25(9), 1671-1679
81. Hashimoto, T., Kihara, M., Yokoyama, K., Fujita, T., Kobayashi, S., Matsushita, K., Tamura, K., Hirawa, N., Toya, Y., and Umemura, S. (2003) *Hypertens Res* 26(2), 177-184
82. Kim, J. E., Kim, A. R., Chung, H. Y., Han, S. Y., Kim, B. S., and Choi, J. S. (2003) *Phytother Res* 17(5), 481-484
83. Thiagarajan, M., and Sharma, S. S. (2004) *Life Sci* 74(8), 969-985
84. Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2006) *Exp Neurol* 197(2), 309-317
85. Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R.

- D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., and Bush, A. I. (2001) *Neuron* 30(3), 665-676
86. Chen, J., Tang, X. Q., Zhi, J. L., Cui, Y., Yu, H. M., Tang, E. H., Sun, S. N., Feng, J. Q., and Chen, P. X. (2006) *Apoptosis* 11(6), 943-953
87. Osawa, T., Sugiyama, Y., Inayoshi, M., and Kawakishi, S. (1995) *Biosci Biotechnol Biochem* 59(9), 1609-1612
88. Kim, H., Park, B. S., Lee, K. G., Choi, C. Y., Jang, S. S., Kim, Y. H., and Lee, S. E. (2005) *J Agric Food Chem* 53(22), 8537-8541
89. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2004) *J Neurosci Res* 75(6), 742-750
90. Ono, K., and Yamada, M. (2006) *J Neurochem* 97(1), 105-115
91. Ono, K., Hirohata, M., and Yamada, M. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 336(2), 444-449
92. Baum, L., and Ng, A. (2004) *J Alzheimers Dis* 6(4), 367-377; discussion 443-369
93. DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15), 8850-8855
94. Morgan, D. (2005) *Neurodegener Dis* 2(5), 261-266
95. Forloni, G., Santambrogio, S., Colombo, A., Repici, M., Centeno, C., Crisitina, P., and Borsello, T. (2006) *Society for Neuroscience* 32
96. Schliebs, R., Schulze, U., Heinitz, K., Kouznetsova, E., Herdegen, T., Castro, L., and Peinado, M. A. (2006) *Society for Neuroscience* 32, 170.174
97. Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. (1991) *Annals Neurol* 30, 572-580
98. Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J., and Roher, A. E. (1996) *J Biol Chem* 271, 4077-4081
99. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6448-6453
100. Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2004) *J Neurosci* 24(45), 10191-10200
101. Walsh, D. M., Klyubin, I., Shankar, G. M., Townsend, M., Fadeeva, J. V., Betts, V., Podlisny, M. B., Cleary, J. P., Ashe, K. H., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2005) *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5), 1087-1090
102. Kokubo, H., Kaye, R., Glabe, C. G., and Yamaguchi, H. (2005) *Brain Res* 1031(2), 222-228
103. Bierhaus, A., Zhang, Y., Quehenberger, P., Luther, T., Haase, M., Muller, M., Mackman, N., Ziegler, R., and Nawroth, P. P. (1997) *Thromb Haemost* 77(4), 772-782
104. Chen, Y. R., and Tan, T. H. (1998) *Oncogene* 17(2), 173-178
105. Kumagai, Y., Zhang, Y., Kim, O. J., and Miller, C. A. (1999) *Brain Res Mol Brain Res* 67(1), 10-17
106. Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J., and Anwyl, R. (2004) *J Neurosci* 24(13), 3370-3378.

Tabla 1

La Curc y la TC se pueden detectar en el cerebro tras la administración por sonda o inyección, y en plasma solamente tras la administración por inyección.

Estos datos mostraron los niveles cerebrales y plasmáticos de Curc o TC, 4 horas después de la administración (por sonda, i.p., o i.m.). Los datos se presentan como la media \pm SD. Las diferentes letras de los superíndices significan diferencia estadística de medias entre sí, entre columnas (tratamientos), dentro de las filas o entre filas (vías) dentro de los tratamientos. $p < 0,05$ SD; desviación estándar; ND; no detectable.

Tratamiento	Dosis μg	Curc		TC	
		Plasma ($\mu\text{g/ml}$)	Cerebro ($\mu\text{g}/10 \text{ mg de proteína}$)	Plasma ($\mu\text{g/ml}$)	Cerebro ($\mu\text{g}/10 \text{ mg de proteína}$)
Con	0,0	ND	ND	ND	ND
Gav	147,0	ND	$0,042 \pm 0,019^a$	ND	$0,027 \pm 0,002^a$
i.p.	147,0	$0,127 \pm 0,035^d$ ($0,345 \mu\text{M}$)	$0,074 \pm 0,003^b$	$0,847 \pm 0,019^a$ ($2,302 \mu\text{M}$)	$0,076 \pm 0,003^b$
i.m.	73,5	$0,238 \pm 0,048^c$ ($0,647 \mu\text{M}$)	$0,116 \pm 0,009^d$	$0,971 \pm 0,092^a$ ($2,639 \mu\text{M}$)	$0,223 \pm 0,023^c$

Tabla 2

Tras la administración crónica de Curc o TC en la dieta, los respectivos niveles plasmáticos son fácilmente detectables, particularmente en el caso de la TC.

Los ratones APPsw fueron alimentados con Curc o TC en la comida a 500 ppm durante 4 meses, antes de analizar la presencia de Curc o TC en plasma, respectivamente. Los datos se presentan como la media \pm SD. Las diferentes letras de los superíndices significan diferencia estadística de las medias entre sí; $p < 0,001$. SD; desviación estándar, ND; no detectable.

Tratamiento	Dosis en mg/kg de comida (consumo diario mg/día)	Plasma ($\mu\text{g/ml}$)
Con	0,0 (0)	ND
Curc	500 (2,5)	$0,035 \pm 0,014^a$ ($0,095 \mu\text{M}$)
TC	500 (2,5)	$0,270 \pm 0,003^b$ ($0,734 \mu\text{M}$)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de curcuminoide que ofrece una biodisponibilidad oral mejorada, que comprende:
 un curcuminoide;
 un antioxidante;
 un vehículo farmacéuticamente aceptable, solubilizante en agua, que comprende:
- 10 (a) micelas lipídicas donde la composición se proporciona en forma de microemulsión, nanopartículas lipídicas sólidas o micelas lipídicas; o
 (b) un aceite microencapsulado donde la composición se proporciona como un aceite microencapsulado;
- 15 opcionalmente, un inhibidor de la glucuronidación,
 y donde la composición es adecuada para la administración oral.
- 20 2. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el curcuminoide se selecciona del grupo compuesto por curcumina, tetrahydrocurcumina, demetoxicurcumina, bide-metoxicurcumina, ésteres de curcumina y combinaciones de los mismos.
- 25 3. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el curcuminoide es un éster de curcumina que comprende el producto de la esterificación de la curcumina y un ácido monocarboxílico.
- 30 4. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 3, donde el ácido monocarboxílico comprende un ácido graso esencial.
5. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 4, donde el ácido graso esencial comprende un ácido graso Omega-3.
- 35 6. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 5, donde el ácido graso Omega-3 es ácido docosahexaenoico.
7. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el vehículo comprende micelas lipídicas y estas micelas lipídicas están formadas por uno o más ácidos grasos, fosfolípidos, ácidos biliares, aceites comestibles, mezclas de los mismos, y/o sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o conjugados de los mismos.
- 40 8. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 7, donde el vehículo comprende fosfatidilcolina.
9. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 7, donde el vehículo comprende un aceite comestible seleccionado del grupo compuesto por aceite de oliva, aceite de colza, aceite de pescado y combinaciones de los mismos.
- 45 10. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el vehículo comprende un aceite microencapsulado y el aceite microencapsulado es un aceite comestible seleccionado del grupo compuesto por aceite de oliva, aceite de colza, aceite de pescado y combinaciones de los mismos.
- 50 11. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el antioxidante se selecciona del grupo compuesto por ácido ascórbico, ácido ascórbico soluble en grasa acilada, vitamina C, ácido alfa-lipoico, N-acetilcisteína, glutatona reducida, tetrahydrocurcumina y combinaciones de los mismos.
- 55 12. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el antioxidante comprende ácido ascórbico.
13. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el antioxidante es tanto soluble en agua como soluble en lípidos.
- 60 14. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el inhibidor de la glucuronidación se selecciona del grupo compuesto por tetrahydrocurcumina, piperina, probenecid, diclofenaco y combinaciones de los mismos.
- 65 15. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, que comprende:
 curcumina;
 tetrahydrocurcumina;

fosfatidilcolina;
 ácido docosahexaenoico; y
 un antioxidante,

5 donde la composición se proporciona en forma de una pluralidad de micelas lipídicas.

16. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, que comprende:

10 curcumina;
 fosfatidilcolina;
 ácido docosahexaenoico; y
 un antioxidante;

15 donde la composición se proporciona en forma de micelas lipídicas.

17. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, que comprende:

20 curcumina;
 ácido docosahexaenoico;
 un antioxidante;

donde la composición se proporciona en forma de micelas lipídicas.

25 18. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1, donde el curcuminoide comprende un producto de la esterificación de curcumina y ácido docosahexaenoico.

19. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 1 que tiene la forma de nanopartículas lipídicas sólidas que comprenden un lípido en fase interna, un tensioactivo y un cotensioactivo.

30 20. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 19, donde el lípido en fase interna se selecciona del grupo compuesto por triacilglicérol, como tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, tristearina; acilglicérol, como monoestearato de glicerol, behenato de glicerol, palmitoestearato de glicerol; ácidos grasos, como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido decanoico, ácido behénico; ceras, como palmitato de cetilo; complejos cíclicos, como ciclodextrina, para-acil-calix-arenos; y combinaciones de los mismos.

35 21. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 20, donde el tensioactivo se selecciona del grupo compuesto por fosfolípidos, como lecitina de soja, lecitina de huevo, fosfatidilcolina; copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, como Poloxámero 188, Poloxámero 182, Poloxámero 407, Poloxamina 908; copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno de sorbitán, como Polisorbato 20, Polisorbato 60, Polisorbato 80; polímeros de alcohol polieter alquilarilo, como tiloxapol.

40 22. Una composición curcuminoide como la mencionada en la reivindicación 21, donde el cotensioactivo se selecciona del grupo compuesto por colato de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio y taurodesoxicolato de sodio.

45 23. Una composición curcuminoide de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con la edad, donde dicha composición se administra por vía oral.

50 24. Una composición como la mencionada en la reivindicación 23, donde el curcuminoide se selecciona del grupo compuesto por curcumina, tetrahidrocurcumina, demetoxicurcumina, bidemetoxicurcumina, ésteres de curcumina y combinaciones de los mismos.

55 25. Una composición como la mencionada en la reivindicación 23, donde la dosis terapéuticamente efectiva es suficiente para conseguir una concentración de curcuminoide en sangre de 0,1-2 micromolares.

60 26. Una composición curcuminoide de conformidad con la reivindicación 10, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable solubilizante en agua comprende un aceite comestible encapsulado para su uso en la formación de micelas lipídicas *in vivo*, donde la composición se administra a un sujeto durante el uso.

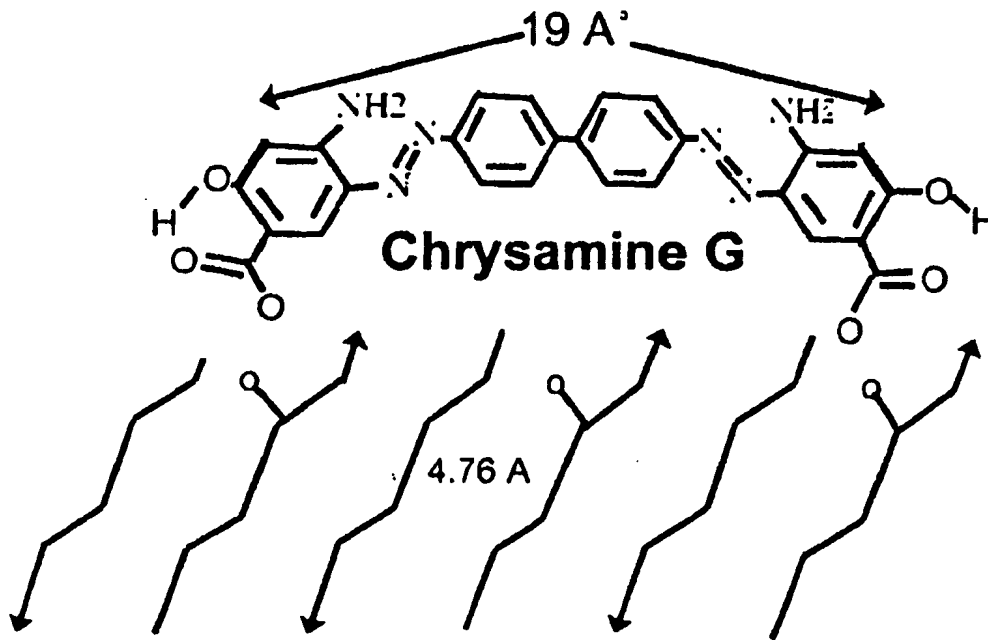
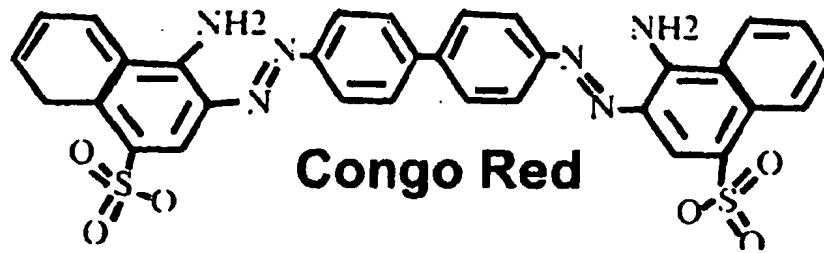
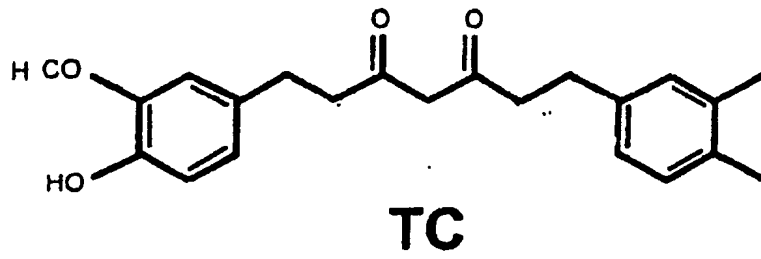
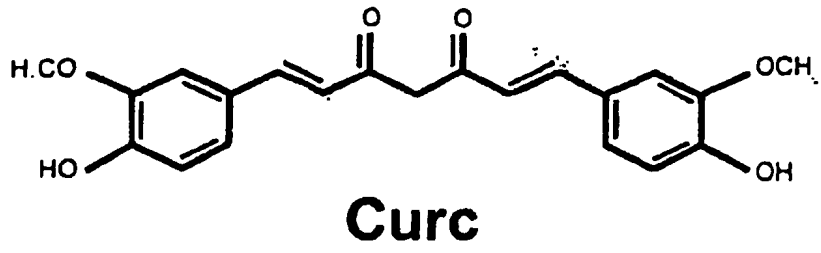


FIG 1

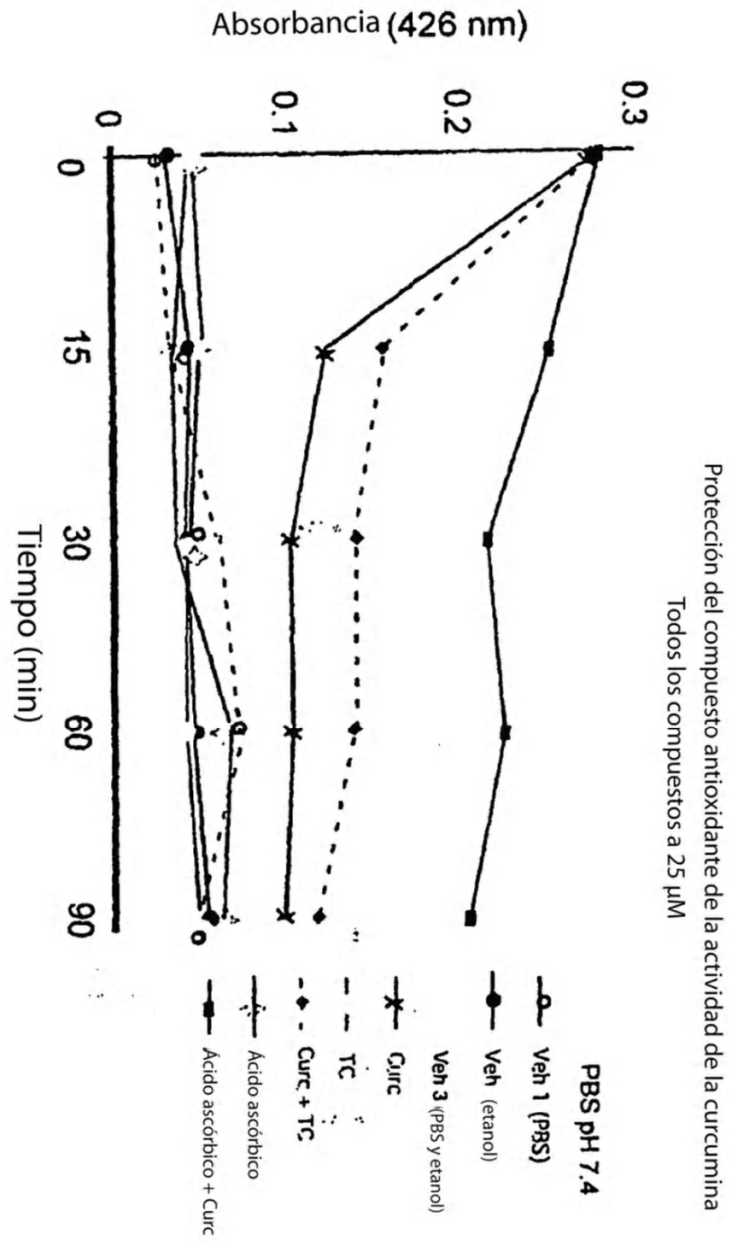


Figura 2

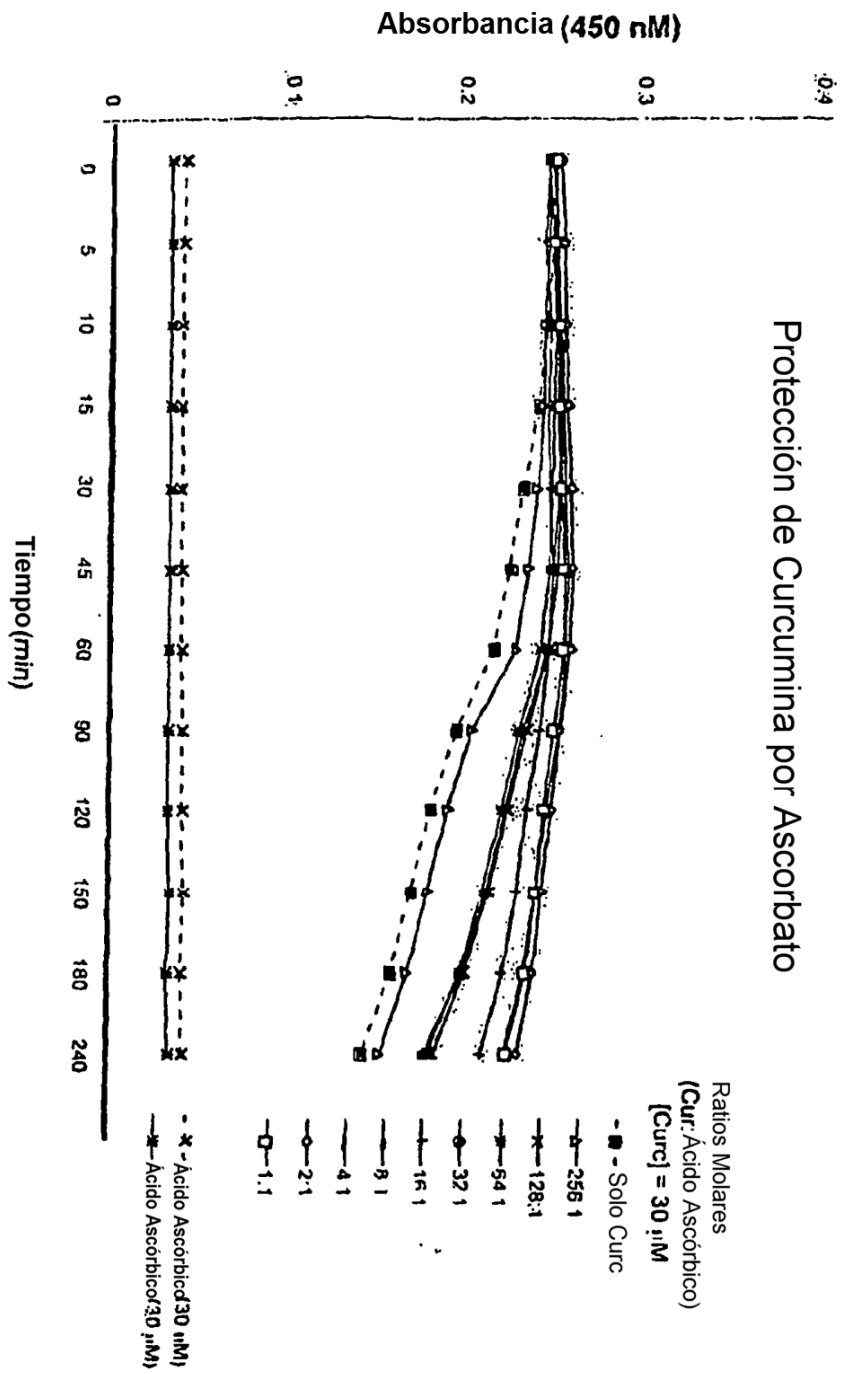


Figura 3

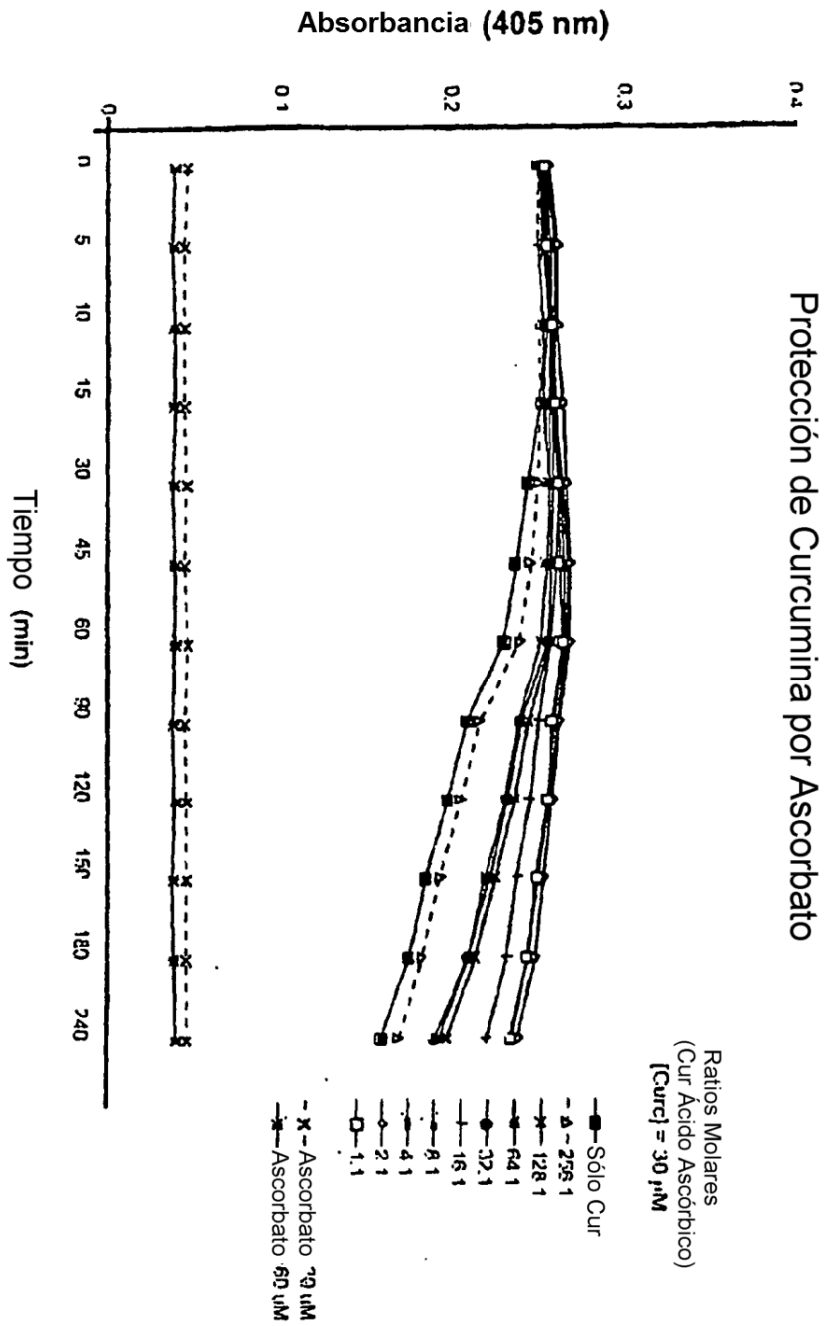
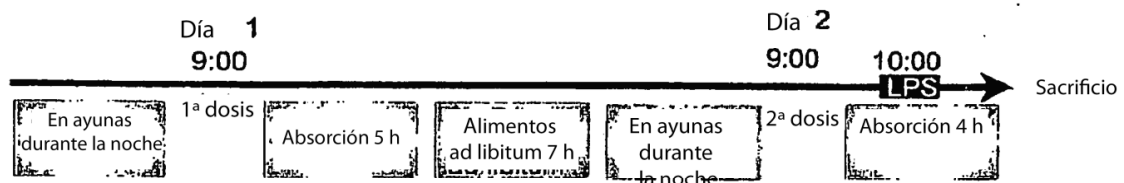


Figura 4

Fig 5

A

Dosis aguda de Curc o TC

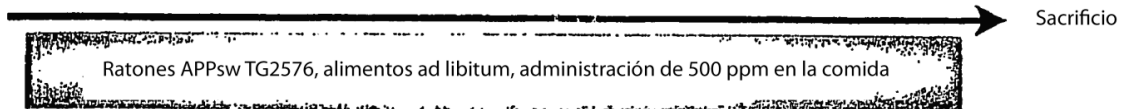


B

Dosis crónica de Curc o TC

14,5 meses

18,5 meses



Fig

6

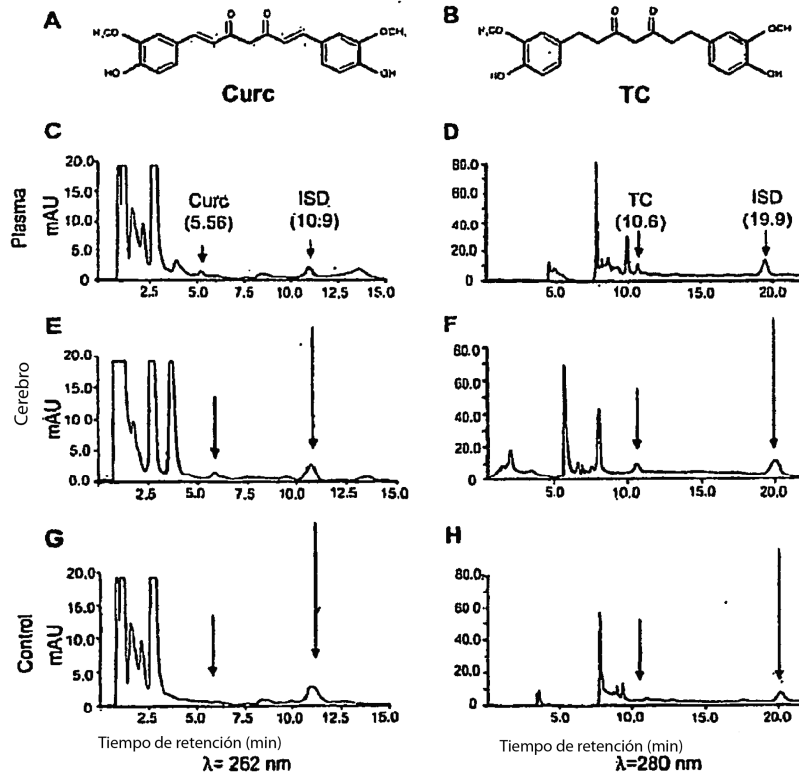


Fig 7

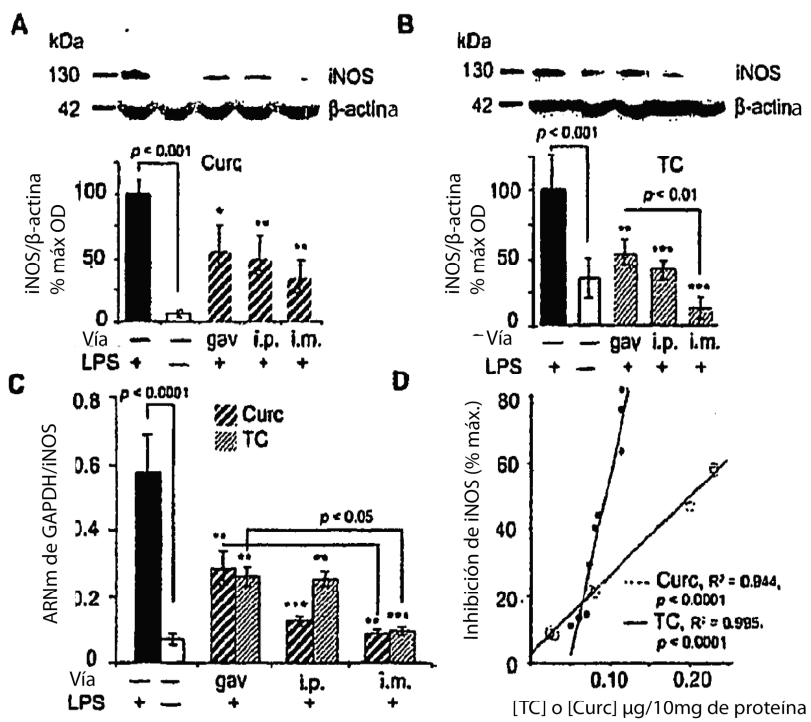


Fig 8

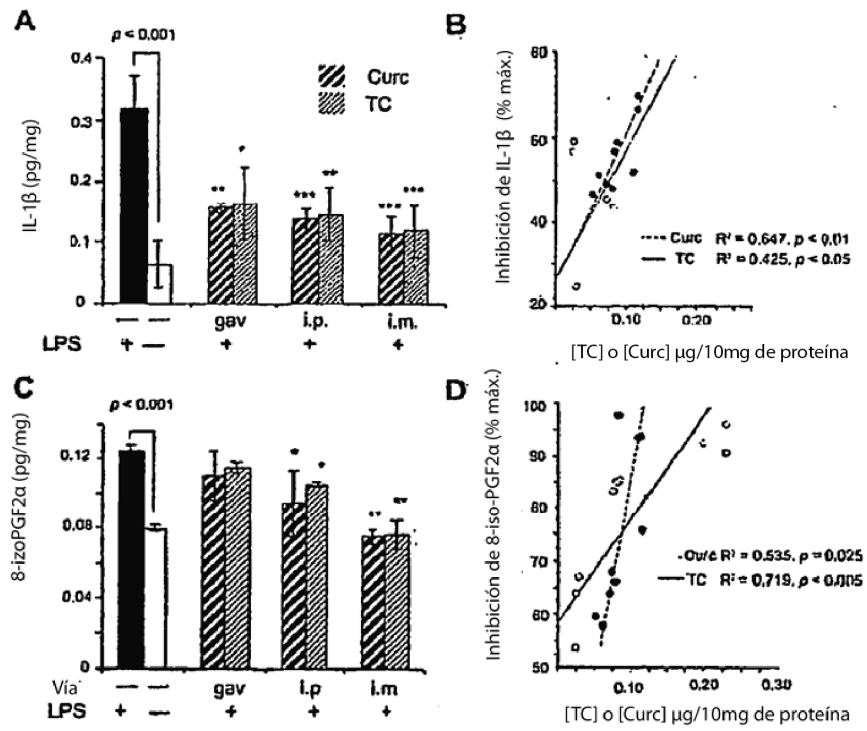


Fig 9

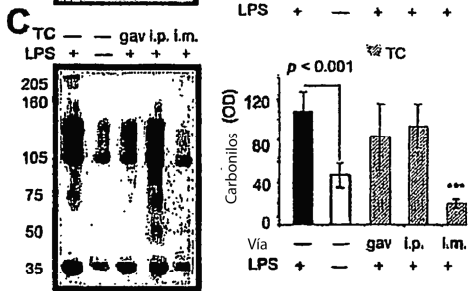
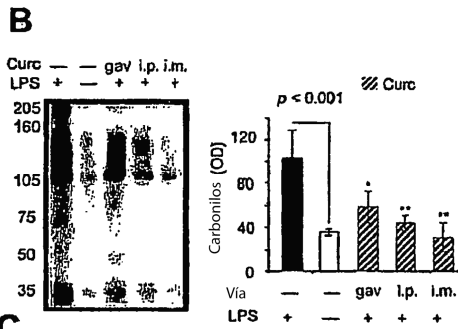
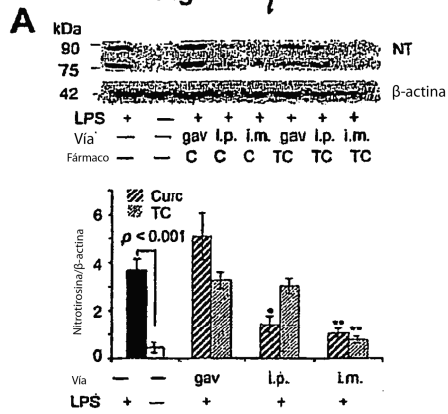


Fig 10

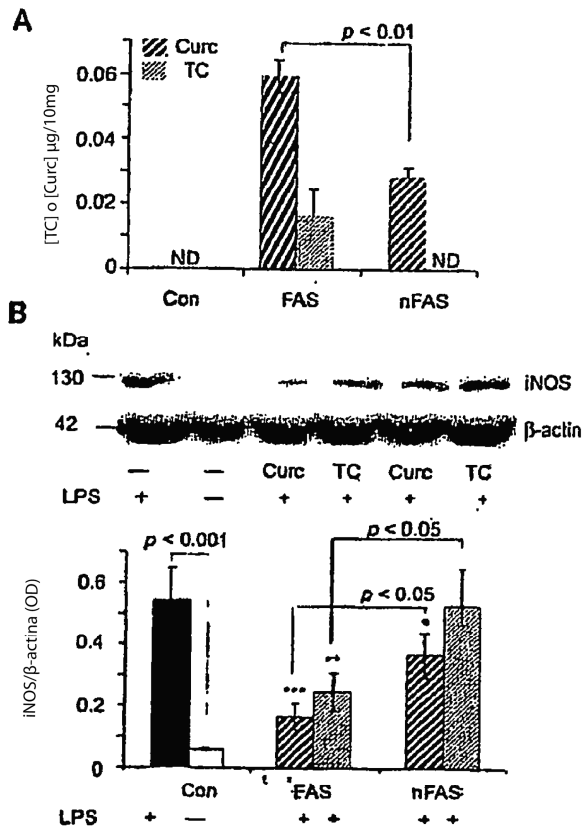


Fig 11

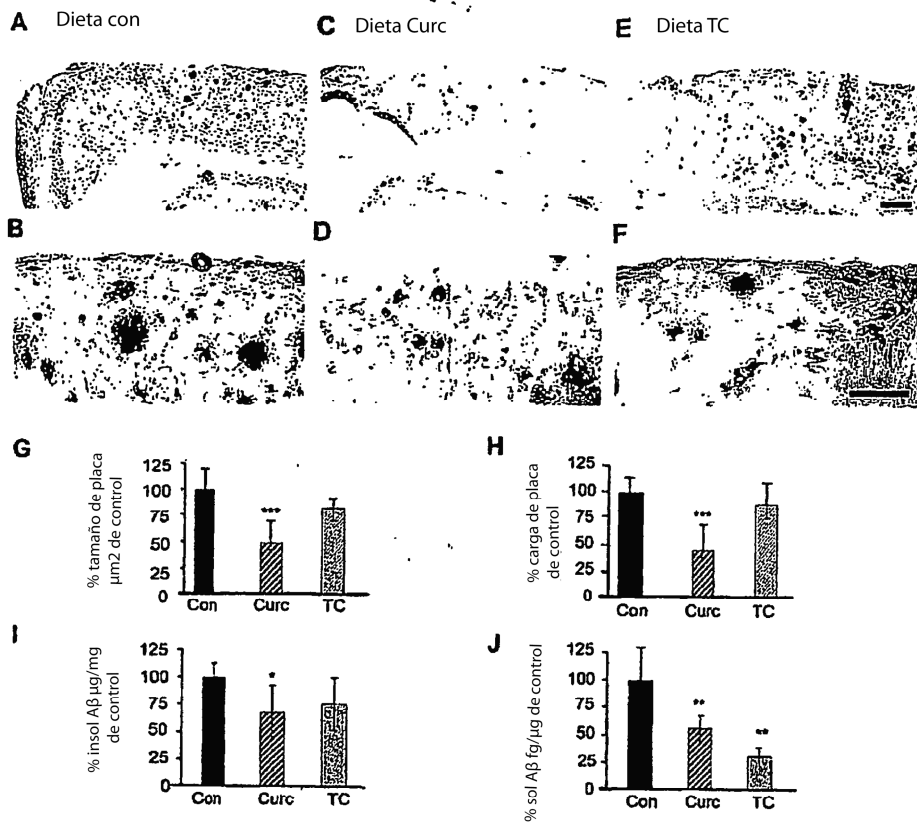


Fig 12

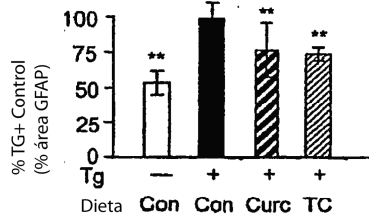
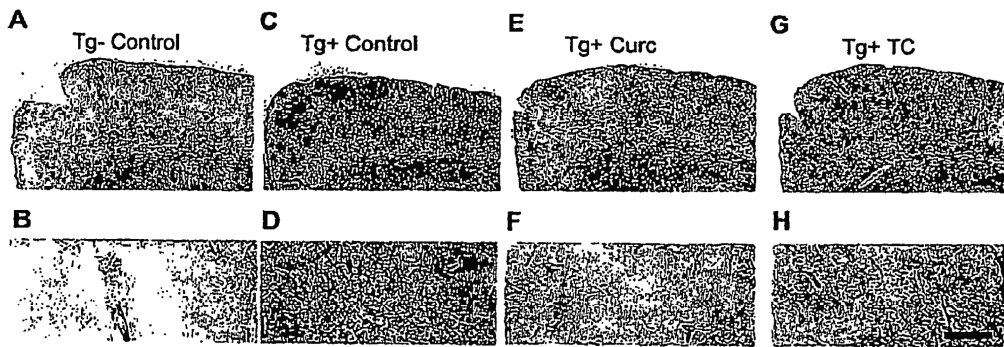


Fig 13

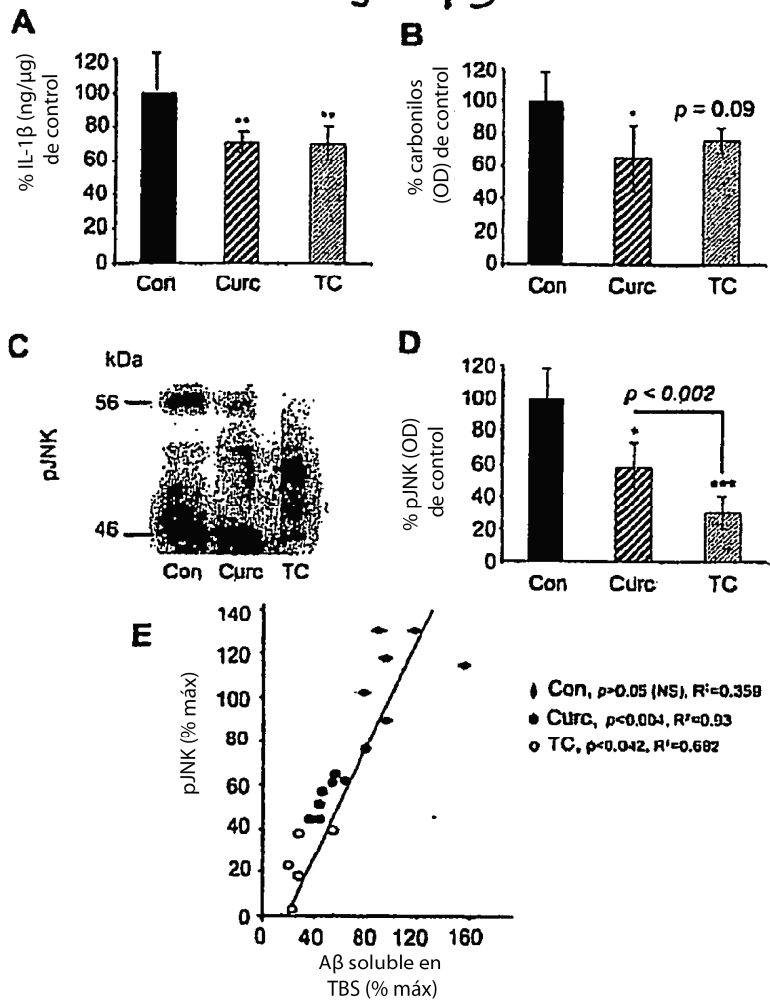


Fig 14

