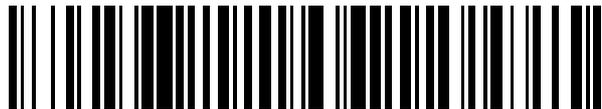


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 966**

51 Int. Cl.:

A61K 36/896 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2009 E 09823871 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 2349304**

54 Título: **Usos de extractos de Curculigo latifolia (C. latifolia)**

30 Prioridad:

28.10.2008 MY 0804284

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

12.11.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA (100.0%)
UPM Serdang
43400 Selangor Darul Ehsan, MY**

72 Inventor/es:

**ISMAIL, MAZNAH;
ISHAK, NUR AKMAL y
HAMID, MUHAJIR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 428 966 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

Usos de extractos de *Curculigo latifolia* (*C. latifolia*)

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a los usos de extractos de *Curculigo latifolia* (*C. latifolia*) en el tratamiento y prevención de los trastornos metabólicos.

10 Antecedentes de la invención

Los trastornos metabólicos heterogéneos tales como la diabetes mellitus de tipo 2 están causados principalmente por la falta de capacidad de las células β productoras de insulina de satisfacer la demanda y por la resistencia a la insulina que se produce en tejidos periféricos tales como el hígado y los tejidos adiposo y muscular. Aparte de lo anterior, las combinaciones de estilo de vida sedentario, hábitos dietéticos no saludables y la predisposición genética son los motivos principales de este problema. En el caso de que no se controle la condición, puede conducir a otros problemas de salud, tales como obesidad, enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal y pérdida de visión.

Recientemente, la hipoadiponectina, la resistencia a la insulina y los defectos en la actividad de incorporación de la glucosa se han convertido en cuestiones centrales en la patogénesis del tipo 2. La adiponectina es una citoquina secretada exclusivamente por el tejido adiposo durante la diferenciación de los adipocitos. Desempeña un papel en el metabolismo de la sensibilidad mejorada a la insulina, la tolerancia a la glucosa y el perfil de lípidos. Sin embargo, en la diabetes, el nivel de adiponectina se encuentra reducido y puede contribuir a la resistencia a la insulina y a la aparición de hiperinsulinemia. Puede definirse la resistencia a la insulina como la eliminación de glucosa mediada por la insulina hacia el interior de los tejidos diana, los cuales son tejidos periféricos. En la situación normal, la insulina induce la incorporación de glucosa en estos tejidos mediante la unión a las proteínas receptoras de insulina en estos tejidos en la superficie de la célula. A continuación, activa una serie de proteínas dentro de la célula para que trasloquen GLUT4 hasta la superficie celular para incorporar la glucosa presente en el flujo sanguíneo dentro de las células, aunque ello no ocurre en la condición diabética de tipo 2, en la que la actividad de incorporación de glucosa es defectuosa y la glucosa permanece en el flujo sanguíneo. Estos mecanismos subrayan que la hipoadiponectina, la hiperinsulinemia y la hiperglucosemia son síntomas de la diabetes de tipo 2.

Los compuestos etnobotánicos han sido ampliamente utilizados durante muchos años en país del este asiático, principalmente en países en desarrollo. Durante este tiempo, en los países occidentales, el uso de los suplementos herbales se ha incrementado constantemente durante las últimas décadas. Sin embargo, se ha publicado evidencia científica limitada de la eficacia de estos compuestos etnobotánicos. Recientemente, la utilización de compuestos etnobotánicos en el tratamiento de la diabetes mellitus se ha incrementado vigorosamente. Este creciente interés ha conducido a trabajos colaborativos entre científicos en la búsqueda y estudio de plantas que podrían presentar potencial como agentes antidiabéticos. Muchos estudios han demostrado que algunos de los compuestos etnobotánicos podrían mejorar los niveles de glucosa en sangre en los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 y también mejorar las complicaciones a largo plazo relacionadas con la diabetes. Algunos estudios adicionales han demostrado que los agentes antidiabéticos en estos componentes vegetales muestran características de sensibilización a la insulina en tejidos periféricos y/o acción insulínica de las células β pancreáticas.

Madhavan y colaboradores (Madhavan V. et al., *Pharmaceut. Biol.* 45:18-21, 2007) han informado de que algunos extractos alcohólicos y acuosos del tubérculo radicular de *Curculigo orchioides* causan un efecto hipoglucémico significativo en ratas diabéticas, resultando en una reducción pronunciada de los niveles de glucosa en sangre.

C. latifolia es una hierba sin tallo que crece en Malasia Occidental y sus frutos han sido utilizados por los nativos como edulcorante. Resulta interesante que el sabor dulce procede de la proteína aislada, la curculina, en el fruto de *C. latifolia*. Esta proteína muestra actividades tanto de saborizante dulce como de modificador del sabor. Sin embargo, no existen estudios adecuados sobre su uso potencial ni como agente antidiabético ni como edulcorante artificial para pacientes diabéticos, ya que se ha demostrado que los frutos de *C. latifolia* son 9.000 veces más dulces que la sacarosa.

En la actualidad, algunos trabajos han demostrado que el consumo de edulcorantes artificiales como la sacarina, el aspartamo y el ciclamato presentan efectos secundarios, tales como problemas psicológicos, trastornos mentales, cáncer de vejiga, insuficiencia cardíaca y tumores cerebrales. Con el fin de superar este problema, la búsqueda de edulcorantes no carbohidratos procedentes de fuentes naturales ha conducido al descubrimiento de muchos edulcorantes de intenso sabor dulce superior al de los edulcorantes artificiales. Debido a que son naturales, podrían resultar más seguros que el aspartamo y otros edulcorantes. Éste es un nuevo enfoque al tratamiento potencial de la diabetes, de la obesidad y de otros trastornos metabólicos.

Descripción resumida de la invención

5 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona extractos de *Curculigo latifolia* (*C. latifolia*), en los que los extractos extraídos de diferentes partes de una planta, tales como frutos, raíces y hojas, individualmente y en cualesquiera combinaciones de los mismos, caracterizados porque los extractos se utilizan como agente para el tratamiento y la prevención de trastornos metabólicos, tales como la diabetes mellitus, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis.

10 La presente invención consiste de varias nuevas características y una combinación de partes descritas totalmente posteriormente y que se ilustran en la descripción y dibujo adjuntos, entendiéndose que pueden llevarse a cabo diversos cambios de detalle sin apartarse del alcance de la invención o sin sacrificar ninguna de las ventajas de la presente invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá completamente a partir de la descripción detallada proporcionada posteriormente en la presente memoria y de los dibujos adjuntos, los cuales se proporcionan únicamente a título ilustrativo y que, de esta manera, no son limitativos de la presente invención, en la que:

20 la figura 1a muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la viabilidad de líneas celulares pancreáticas de BRIN-BD11;

25 la figura 1b muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la viabilidad de las líneas celulares de adipocitos 3T3-L1;

la figura 1c muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la viabilidad de las líneas celulares de miotubos L6;

30 la figura 2 muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre las células BRIN-BD11 en la secreción de insulina tras un tratamiento de 30 minutos;

la figura 3a muestra el efecto de extractos de frutos de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

35 la figura 3b muestra el efecto de extractos de raíces de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

la figura 3c muestra el efecto de extractos de hojas (agua caliente) de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

40 la figura 3d muestra el efecto de extractos de hojas de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

45 la figura 4a muestra el efecto de extractos de frutos de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en miotubos L6 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

la figura 4b muestra el efecto de extractos de raíces de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en miotubos L6 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

50 la figura 4c muestra el efecto de extractos de hojas de *C. latifolia* (agua caliente) sobre la actividad de incorporación de glucosa en miotubos L6 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

la figura 4d muestra el efecto de hojas de raíces de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en miotubos L6 diferenciados, en presencia y en ausencia de insulina;

55 la figura 5 muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la actividad de secreción de adiponectina en adipocitos 3T3-L1 diferenciados tras un tratamiento de 30 minutos en ausencia de insulina;

60 la figura 6 muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la actividad de secreción de adiponectina en adipocitos 3T3-L1 diferenciados tras un tratamiento de 30 minutos en presencia de insulina;

la figura 7a muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el peso corporal de ratas con diabetes inducida por alimentación con una dieta rica en grasas o inducida con una dosis baja de STZ;

65 la figura 7b muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el nivel de glucosa en ayuno en ratas con diabetes inducida por alimentación con dieta rica en grasas;

la figura 7c muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el nivel de insulina en ratas con diabetes inducida por alimentación con dieta rica en grasas;

5 la figura 7d muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el nivel de adiponectina en ratas con diabetes inducida por alimentación con dieta rica en grasas.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

10 La presente invención se refiere a los usos de extractos de *Curculigo latifolia* (*C. latifolia*). A continuación, la presente memoria describe la presente invención según realizaciones preferentes de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la limitación de la descripción a las realizaciones preferentes de la invención meramente facilita el comentario de la presente invención y se encuentra contemplado que el experto en la materia pueda diseñar diversas modificaciones y equivalentes sin apartarse del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

15 Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para mejorar la glucosa en sangre, la actividad de incorporación de glucosa y el nivel de insulina y de adiponectina. El tratamiento implica la administración de extractos de *C. latifolia*.

20 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, es un objetivo de la presente invención proporcionar extractos de *C. latifolia* que puedan modular la diabetes mellitus mediante la administración de una cantidad efectiva de extractos de *C. latifolia* en el sujeto, en el que la cantidad de extractos de *C. latifolia* modula los síntomas de la diabetes mellitus.

25 Con el fin de conseguir el objetivo anteriormente indicado, se han llevado a cabo estudios extensivos in vitro e in vivo. En los estudios in vitro, se ha sometido a ensayo una cantidad efectiva de extractos de *C. latifolia* en las líneas celulares BRIN-BD11, adipocitos 3T3-L1 y miotubos L6. Simultáneamente, en estudios in vivo, se han administrado extractos de *C. latifolia* por vía oral en sujetos.

30 De acuerdo con lo anterior, se describe en la presente memoria un método de citotoxicidad de BRIN-BD11, adipocitos 3T3-L1 y miotubos L6 tratados con extractos de *C. latifolia*, en el que se encuentra que la cantidad de los extractos de *C. latifolia* resulta no tóxica para dichas líneas celulares.

35 También se describe un método de incorporación de glucosa en líneas celulares de adipocitos 3T3-L1 y miotubos L6 tratados con extractos de *C. latifolia*, en el que se ha encontrado que la cantidad de extractos de *C. latifolia* incrementa la actividad de incorporación de glucosa en las líneas celulares de adipocitos 3T3-L1 y de miotubos L6.

40 Además, se describe un método de secreción de insulina en la línea celular BRIN-BD11 y de adiponectina en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 tratados con extractos de *C. latifolia*, en el que se ha encontrado que la cantidad de extractos de *C. latifolia* incrementa la secreción de insulina en la línea celular BRIN-BD11 y de adiponectina en los adipocitos 3T3-L1.

Según los objetivos anteriormente indicados, se ha inducido en el sujeto el desarrollo de diabetes mellitus mediante una combinación de una dieta rica en grasas (DRG) y una dosis baja de estreptozotocina (STZ).

45 La diabetes mellitus es la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). Los síntomas de la diabetes mellitus pueden seleccionarse de entre el grupo que muestra hiperglucemia, obesidad, nivel incrementado de insulina, polifagia, polidipsia y poliuria.

50 Todavía adicionalmente, se ha administrado en el sujeto por vía oral una dosis efectiva de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. Más concretamente, se le ha administrado en el sujeto durante 30 días.

Una realización de la presente invención se refiere a reducir el nivel de glucosa en sangre en un paciente con diabetes mellitus sometido a la administración de una cantidad efectiva de extractos de *C. latifolia*.

55 Según el método de mejora del nivel de glucosa en sangre descrito en la presente invención, se realiza un seguimiento del nivel de glucosa en sangre en ayuno y de tolerancia oral a la glucosa.

Se contempla que los extractos de *C. latifolia* reduzcan el nivel de glucosa en sangre e incrementen los niveles de insulina y de adiponectina en el sujeto.

60 Se contempla además en el presente estudio que los extractos de *C. latifolia* incrementen la tolerancia oral a la glucosa en el sujeto.

Los extractos de *C. latifolia* según la presente invención pueden prepararse según el procedimiento siguiente.

65

Ejemplo 1

Preparación de extracto vegetal

5 Extracto de fruto de C. latifolia

Se lavaron frutos frescos de C. latifolia con agua destilada. A continuación, se extrajeron 50 g de frutos de C. latifolia con 2 litros de agua destilada en un vaso de 5 litros durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente. Este extracto se filtró a través de papel de filtro Whatman nº 1. A continuación se recogió el filtrado y se liofilizó. La muestra liofilizada se conservó a -80°C hasta la utilización.

Extracto de hojas de C. latifolia

Se utilizaron dos tipos de extracto:

15 (1) Extracto en agua caliente
Se introdujeron cinco gramos de polvos de hojas de C. latifolia en 200 ml de agua (destilada) hirviendo. A continuación se retiraron de la fuente de calor y se dejaron infusionar durante 15 minutos. Esta suspensión se filtró a través de papel de filtro Whatman nº 1. Seguidamente se recogió el filtrado y se liofilizó. La muestra liofilizada se conservó a -80°C hasta la utilización.

(2) Extracto en agua normal

25 Se extrajeron cinco gramos de polvos de hojas de C. latifolia con 200 ml de agua destilada y se dejaron sumergidas durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente. Este extracto se filtró a través de papel de filtro Whatman nº 1. A continuación se recogió el filtrado y se liofilizó. La muestra liofilizada se conservó a -80°C hasta la utilización.

30 Extracto de raíces de C. latifolia

Se extrajeron cinco gramos de polvos de raíces de C. latifolia con 200 ml de agua destilada y se sumergieron durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente. Se filtró este extracto a través de papel de filtro Whatman nº 1. A continuación se recogió el filtrado y se liofilizó. La muestra liofilizada se conservó a -80°C hasta la utilización.

Ejemplo 2

40 Estudio de citotoxicidad in vitro de extractos de C. latifolia sometidos a ensayo en líneas celulares de adipocitos 3T3-L1, miotubos L6 y pancreáticas BRIN-BD11

Cultivo celular

45 Se cultivó la línea celular BRIN-BD11 y se mantuvo en medio RPMI 1640 suplementado con suero de feto bovino al 10%, penicilina-estreptomina al 1% y glutamina al 1% a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Simultáneamente, se cultivaron células adipocitos 3T3 y miotubos L6 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con los antibióticos estreptomina/penicilina y suero de feto bovino al 10%. Ambas células se mantuvieron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Las células se subcultivaron cada 2 a 3 días hasta una confluencia de aproximadamente 80% utilizando tripsina-EDTA para desenganchar las células del matriz de cultivo. El recuento celular se llevó a cabo utilizando un hemocitómetro. Para la diferenciación, se transfirieron células L6 a DMEM con suero de feto bovino al 2%, 4 a 6 días después de la confluencia. Se determinó el grado de diferenciación mediante observación de la multinucleación de las células y se consideró un nivel de >90% de fusión de mioblastos en miotubos. Simultáneamente, se diferenciaron los preadipocitos 3T3 en las placas, alcanzando la confluencia en 3 días. En este punto (día 0) las células se cambiaron a medio de diferenciación (DMEM, FBS al 10%, dexametasona 0,25 µM, IBMX 0,25 mM e insulina 1 µg/ml) durante 3 días, con un cambio intermedio del medio. El día 3, se eliminaron la dexametasona y la IBMX, dejando la insulina sobre las células durante 4 días adicionales, cambiando el medio cada 2 días. A continuación se mantuvieron las células en el DMEM de propagación original, cambiando el medio cada 2 a 3 días, hasta la utilización. Las placas en las que las células se encontraban >90% diferenciadas se utilizaron para experimentos 9 a 12 días después de la inducción.

60 Ensayo de viabilidad celular

Hasta ahora se han desarrollado y aplicado diversos métodos para medir la viabilidad celular. El ensayo de proliferación celular no radioactivo acuoso CellTiter 96® (Promega, Madison, WI) es uno de ellos. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2x10⁵ células/pocillo en 100 µl de medio de cultivo y se dejó

que se adhiriesen durante 24 horas. Se lavaron las monocapas celulares con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las células no adheridas; las células adheridas se incubaron en medio fresco libre de suero con diferentes concentraciones de extractos de frutos, hojas y raíces de *C. latifolia* durante 72 horas. A continuación, las células se incubaron con 20 µl de solución de sal de tetrazolio durante cuatro horas. Se midió la absorbancia de cada celda a 490 nm utilizando un lector de microplacas (Opsys MR, Thermolabsystems) con el fin de cuantificar el producto formazán. El número de células vivas es proporcional a la cantidad de producto formazán presente.

Las figuras 1a, 1b y 1c muestran el efecto de los extractos de *C. latifolia* sobre las líneas celulares de BRIN-BD11, adipocitos 3T3-L1 y miotubos L6, respectivamente.

Ejemplo 3

Secreción de insulina in vitro

Se utilizó la línea celular BRIN-BD11 para evaluar la secreción de insulina. Se determinó la actividad de secreción de insulina utilizando placas de 24 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 que contenía suero de feto bovino al 10%, antibiótico al 1% y glutamina al 1% y se dejó que se adhiriesen durante la noche. A continuación, las células se lavaron tres veces con tampón Krebs-Ringer-bicarbonato de (KRB, NaCl 115 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 1,28 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 24 mM, ácido sin Hepes 10 mM, 1 g/l de albúmina de suero bovino, glucosa 1,1 mM, pH 7,4) y se preincubaron durante 40 minutos en tampón KRB a 37°C. Seguidamente las células se incubaron durante 30 minutos con 1 ml de tampón KRB en ausencia y en presencia de extractos de *C. latifolia* y glibenclamida a modo de control positivo. Se extrajeron alícuotas de cada pocillo y se almacenaron a -20°C para el ensayo posterior de la insulina.

Ensayo de insulina

Con el fin de cuantificar la concentración de insulina, se utilizaron las alícuotas de evaluación de la secreción de insulina del estudio in vitro y se sometieron a ensayo utilizando el protocolo de ELISA de insulina de rata Mercodia (Uppsala, Suecia). Se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Opsys MR, Thermolabsystems) con el fin de cuantificar la concentración de insulina.

La figura 2 muestra el efecto de los extractos de *C. latifolia* sobre la secreción de insulina de las células BRIN-BD11 tras un tratamiento de 30 minutos.

Ejemplo 4

Incorporación de 2-desoxi-D-[1-³H]glucosa

Se midió la incorporación de glucosa en miotubos L6 totalmente diferenciados y en adipocitos 3T3. Las células se enjuagaron tres veces con tampón HEPES de Krebs-Ringer (pH 7,4) tratados previamente con extractos de *C. latifolia* en presencia y en ausencia de insulina (100 nM). Se dejó que procediese el tratamiento durante 30 minutos. Tras los 30 minutos, se añadió 1 µCi/ml de 2-desoxi-D-[1-³H]-glucosa y se dejó bajo incubación durante 30 minutos. Antes de la digestión de las células, se recogió el medio en viales y se congeló a -20°C para el análisis de adiponectina; el procedimiento de recolección se llevó a cabo sobre un lecho de hielo. A continuación, las placas se lavaron tres veces con tampón KRH helado y las células se digirieron con SDS al 0,1%. Se utilizó una alícuota para medir la radioactividad mediante la utilización de un contador de centelleo (Tri-Carb 2300TR, Perkin Elmer Life and Analytical Services, Boston, MA, USA) utilizando Ultima Gold™ LLT como cóctel de centelleo (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). La incorporación de glucosa se expresó en desintegraciones por minuto (dpm).

Las figuras 3a, 3b, 3c y 3d muestran el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en adipocitos 3T3 diferenciados, respectivamente, mientras que las figuras 4a, 4b, 4c y 4d muestran el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre la actividad de incorporación de glucosa en miotubos L6 diferenciados, respectivamente.

Ejemplo 5

Ensayo de adiponectina

Se utilizó el ensayo ELISA de adiponectina de rata BioVision (Mountain View, CA) para cribar los extractos de *C. latifolia* con el fin de potenciar la secreción de adiponectina en adipocitos 3T3 diferenciados. Se utilizaron las alícuotas recogidas del ensayo de incorporación de glucosa y el ensayo se llevó a cabo según el procedimiento del kit.

La figura 5 muestra el efecto de los extractos de *C. latifolia* sobre la actividad de secreción de adiponectina en adipocitos 3T3 diferenciados en ausencia de insulina, mientras que la figura 6 muestra el efecto de los extractos de *C. latifolia* sobre la actividad de secreción de adiponectina en adipocitos 3T3 diferenciados en presencia de insulina.

5 Ejemplo 6

Animales

10 Para el presente estudio se utilizó un total de 42 ratas Sprague-Dawley (SD) macho (160 a 200 g). Se alojaron individualmente en jaulas de polipropileno y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ambiente (22±2°C) y humedad (55±5%) en un ciclo 12:12 h de luz:oscuridad. Todas las ratas dispusieron de libre acceso a agua y dieta normal para ratas disponible comercialmente (NPD) previamente al periodo de aclimatación. Todos los protocolos experimentales de cuidados y usos animales habían sido autorizados por el comité de cuidados y usos animales (ACUC) de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universiti Putra Malaysia.

15 Diseño experimental

Etapa I

20 Preparación de dieta rica en grasas (RG)

La dieta RG se formuló basándose en la composición proporcionada por Levin et al., 1989. Se preparó a partir de una mezcla de 50% de alimento normal en pellets para ratas, 24% de aceite de maíz (marca Mazola), 20% de leche entera en polvo (marca Nespray de Nestlé) y 6% de azúcar.

25 Desarrollo de ratas con diabetes de tipo 2 alimentadas con DRG y dosis baja de STZ

30 Las ratas fueron asignadas a dos grupos basándose en los regímenes dietéticos: NPD y DRG, y fueron alimentadas durante un mes. Tras un mes bajo cualquiera de las dos dietas, las ratas alimentadas con DRG fueron anestesiadas con éter dietílico tras ayunar durante la noche y después recibieron una inyección de STZ (35 mg/kg) vía intravenosa. Las ratas continuaron recibieron sus dietas originales (normal o rica en grasas) y agua tras la inyección de STZ. Tras siete días de la inyección de STZ, se identificaron las condiciones diabéticas a partir de polidipsia, poliuria y mediante medición del nivel de glucosa en sangre en ayuno; aquéllas con nivel de glucosa >170 mg/dl fueron incluidas en el estudio.

35 Se determinó semanalmente el peso corporal, el consumo de alimentos y la glucosa en sangre en ayuno.

Etapa II

40 Los animales se asignaron aleatoriamente a siete grupos de tres animales cada uno.

- Grupo 1: ratas de control normales (dieta normal de pellets, no diabéticas, no tratadas).
- Grupo 2: ratas de control diabéticas (dieta rica en grasas, diabéticas, no tratadas).
- Grupo 3: ratas de control diabéticas (dieta rica en grasas, inducidas con STZ, diabéticas, no tratadas).
- 45 - Grupo 4: ratas de ensayo de diabetes (dieta rica en grasas, inducidas con STZ, diabéticas, tratadas), tratamiento con glibenclimida 600 µg/kg de peso corporal.
- Grupo 5: ratas de ensayo diabéticas (dieta rica en grasas, inducidas con STZ, diabéticas, no tratadas), tratamiento con extracto de frutos de *C. latifolia*, 100 mg/kg de peso corporal.
- Grupo 6: ratas de ensayo diabéticas (dieta rica en grasas, inducidas con STZ, diabéticas, no tratadas), tratamiento con extracto de raíces de *C. latifolia*, 100 mg/kg de peso corporal.
- 50 - Grupo 7: ratas de ensayo diabéticas (dieta rica en grasas, inducidas con STZ, diabéticas, no tratadas), tratamiento con una combinación de extractos de raíces y frutos de *C. latifolia*, 100 mg/kg de peso corporal.

55 Semanalmente se determinaron el peso corporal, el consumo de alimento y el nivel de glucosa en sangre en ayuno.

Ensayo de tolerancia a la glucosa oral (ETOG)

60 Se determinó el nivel de glucosa en sangre en ayuno de cada rata en el tiempo cero (tras el ayuno durante la noche con libre acceso a agua). Se administró por vía oral glucosa (2 g/kg de peso corporal) 30 minutos después de una administración oral de los extractos de *C. latifolia* o de glibenclimida. Se midió la concentración de glucosa en sangre inmediatamente antes y 30, 60 y 120 minutos después de la administración oral de la muestra de ensayo.

Ensayos biológicos

5 Se recogieron muestras de sangre al final de cada etapa de los tratamientos. Se recogió plasma mediante punción cardiaca para los diversos ensayos biológicos. Se obtuvieron parámetros físicos y bioquímicos, tales como cambios del peso corporal, ingesta de alimento, niveles de glucosa plasmática, insulina y adiponectina. El nivel de insulina se midió utilizando un kit ELISA de insulina (Mercodia AB, Uppsala, Suecia) con insulina de rata a modo de estándar. Se midió el nivel de adiponectina utilizando el ensayo ELISA de adiponectina de rata BioVision (Mountain View, USA).

10 La figura 7a muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el peso corporal en ratas con diabetes inducida mediante alimentación con una dieta rica en grasas y una dosis baja de STZ, mientras que la figura 7b muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el nivel de glucosa en sangre en ayuno en ratas con diabetes mediante alimentación con una dieta rica en grasas.

15 Por otra parte, la figura 7c muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el nivel de insulina en ratas con diabetes inducida con una dieta rica en grasas, mientras que la figura 7d muestra el efecto de extractos de *C. latifolia* sobre el nivel de adiponectina en ratas con diabetes inducida mediante alimentación con una dieta rica en grasas.

En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a:

20 realización 1: extractos de *Curculigo latifolia* (*C. latifolia*), en los que los extractos extraídos de diferentes partes de una planta, tales como frutos, raíces y hojas, individualmente y en cualesquiera combinaciones de los mismos, caracterizados porque los extractos se utilizan como agente para el tratamiento y la prevención de trastornos metabólicos tales como diabetes mellitus, obesidad, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis.

25 Realización 2: extractos de *C. latifolia* según la realización 1, en los que se extraen con agua destilada, frutos, raíces y hojas frescos y secos.

Realización 3: utilización de una cantidad efectiva de extractos de *C. latifolia* en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y prevención de trastornos metabólicos, tales como diabetes mellitus, obesidad, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis en un sujeto que necesita de los mismos.

30 Realización 4: utilización según la realización 3, en la que el sujeto sufre diabetes mellitus.

Realización 5: utilización según la realización 4, en la que la diabetes mellitus es diabetes de tipo I ó de tipo II.

Realización 6: utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que los extractos se administran por vía oral o intravenosa.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Extractos de *Curculigo latifolia* (*C. latifolia*) para la utilización en el tratamiento y prevención de trastornos metabólicos, en los que los extractos se extraen de diferentes partes de una planta, individualmente y en cualesquiera combinaciones.
2. Extractos de *C. latifolia* según la reivindicación 1, en los que las diferentes partes de una planta se seleccionan de entre el grupo que consiste de frutos, raíces y hojas.
- 10 3. Extractos de *C. latifolia* según la reivindicación 2, en los que se extraen frutos, raíces y hojas secos con agua destilada.
- 15 4. Extractos de *C. latifolia* para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que los trastornos metabólicos se seleccionan de entre el grupo que consiste de diabetes mellitus, obesidad, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis.
- 20 5. Extractos de *C. latifolia* para la utilización según la reivindicación 4, en los que el trastorno metabólico es la diabetes mellitus.
6. Extractos de *C. latifolia* según la reivindicación 5, en los que la diabetes mellitus es la diabetes de tipo I ó de tipo II.
- 25 7. Extractos de *C. latifolia* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en los que los extractos se administran por vía oral o intravenosa.
- 30 8. Extractos de *C. latifolia* para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en los que el tratamiento o la prevención implica cualquiera de entre la mejora del nivel de glucosa en sangre, de la actividad de incorporación de glucosa en sangre, de la actividad de incorporación de glucosa, del nivel de insulina y del nivel de adiponectina.

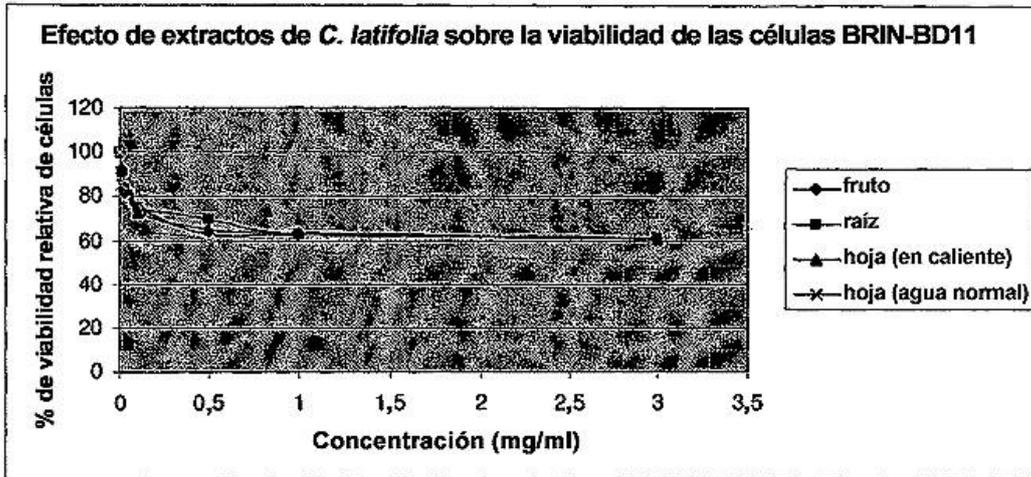


Figura 1a

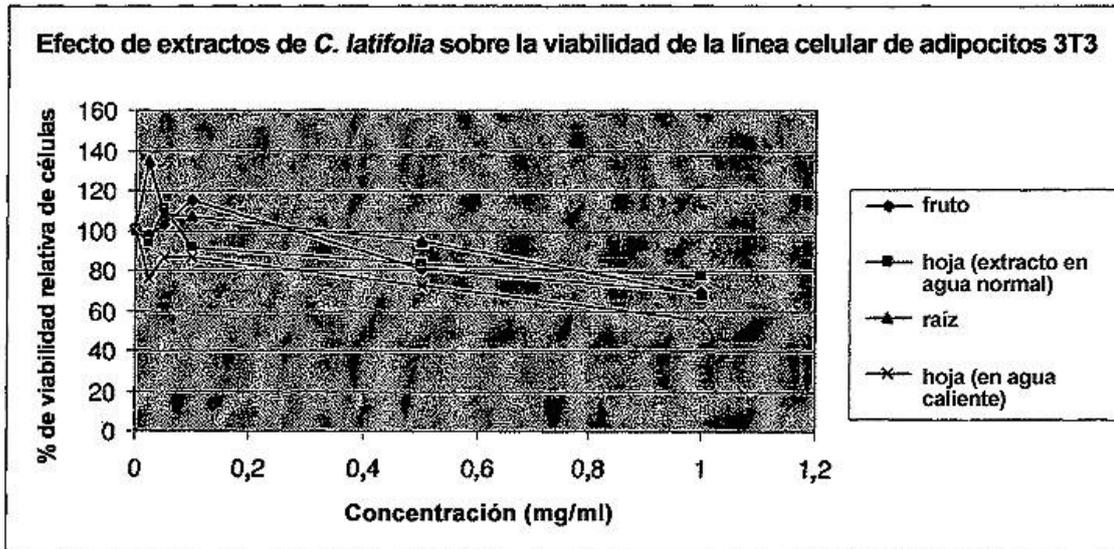


Figura 1b

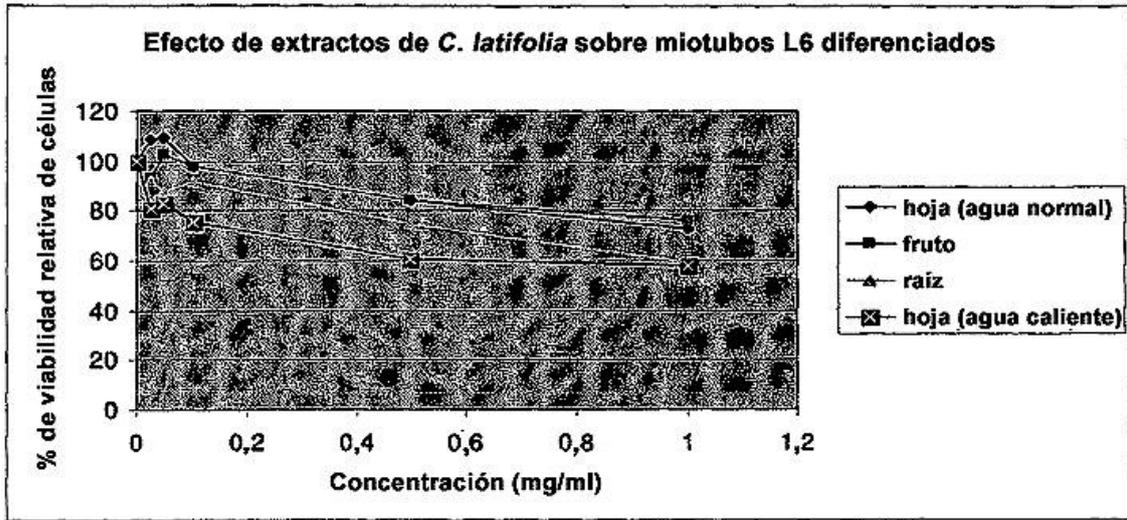


Figura 1c

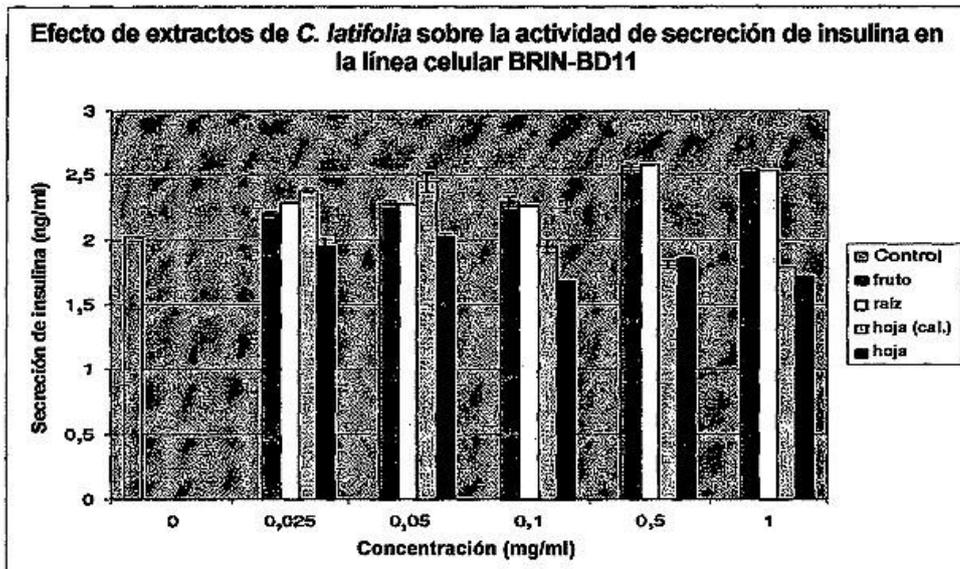


Figura 2

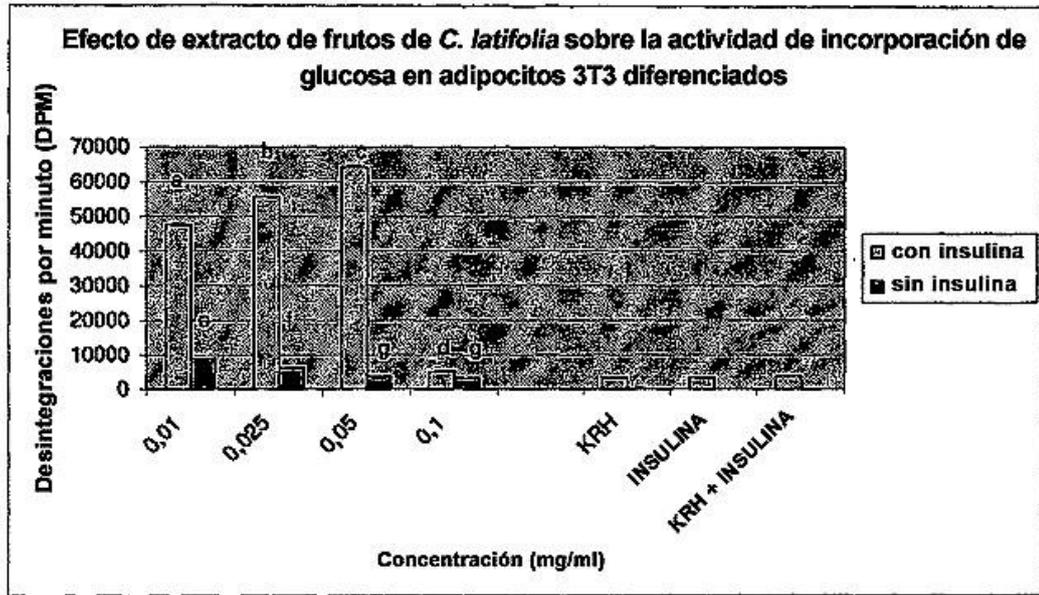


Figura 3a

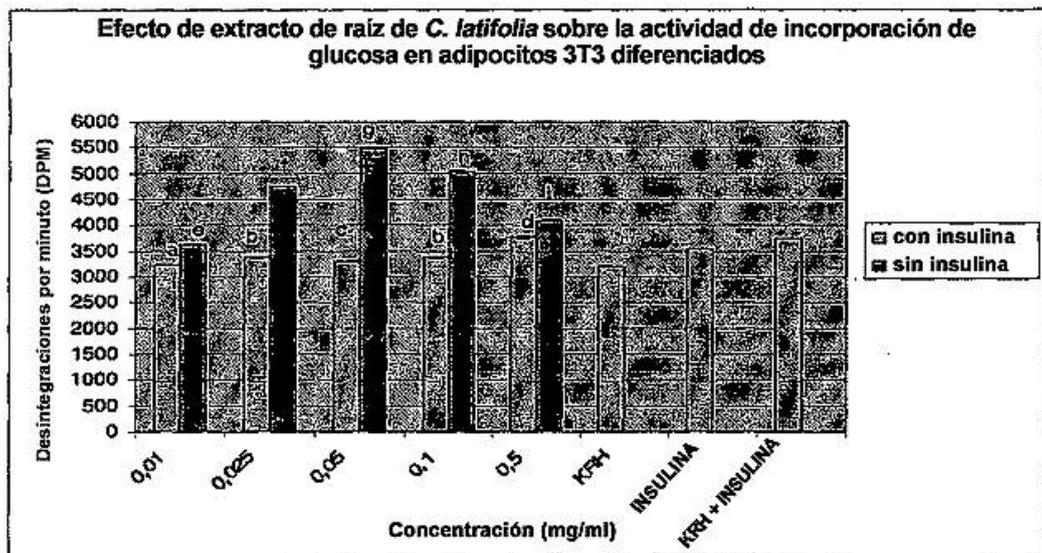


Figura 3b

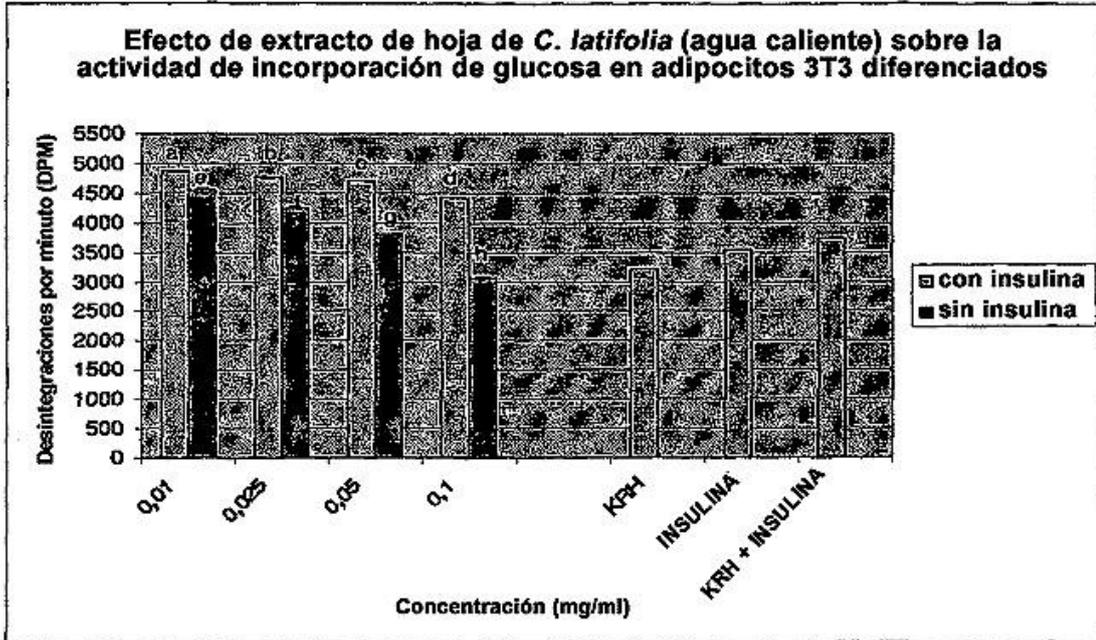


Figura 3c

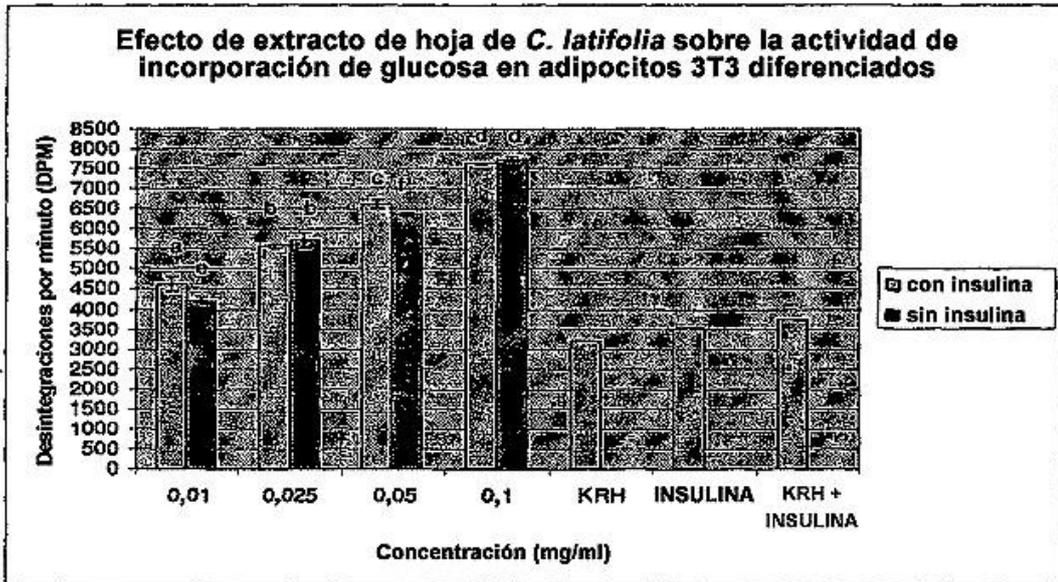


Figura 3d

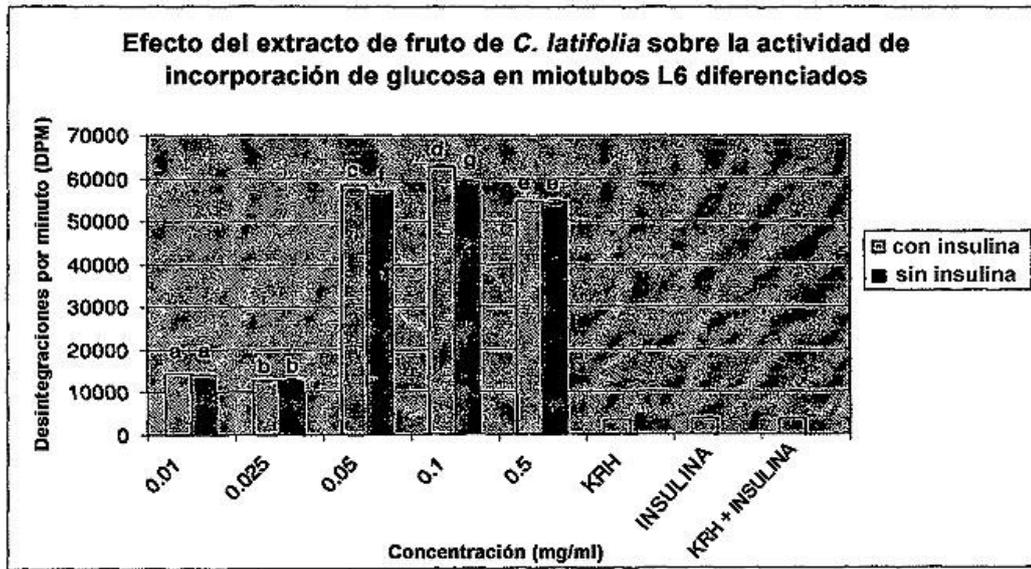


Figura 4a

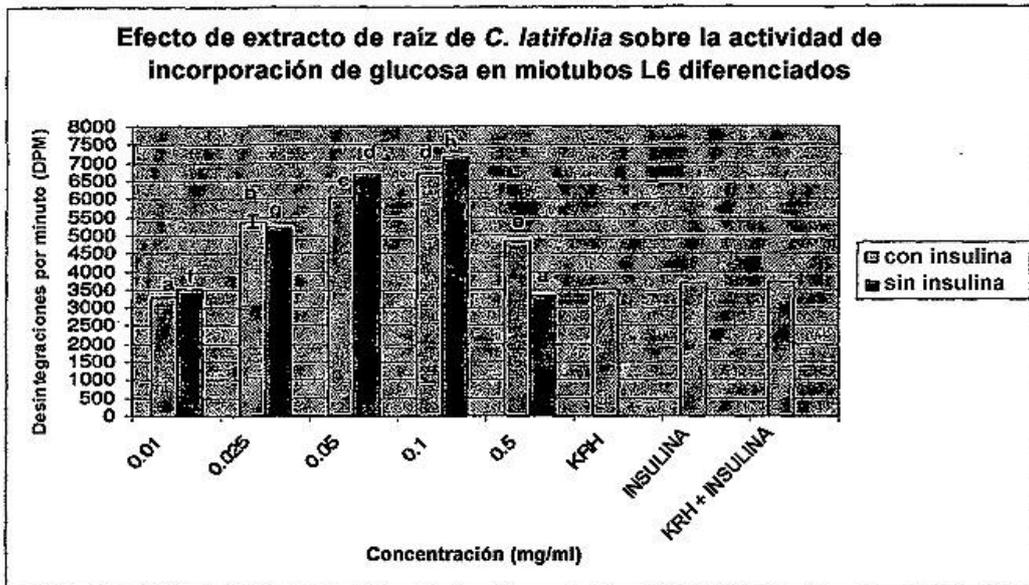


Figura 4b

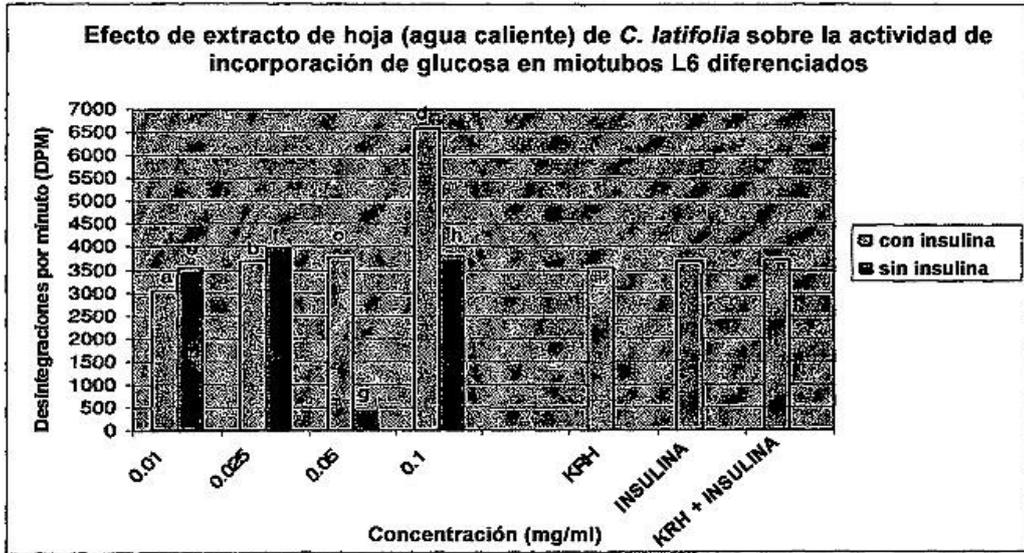


Figura 4c

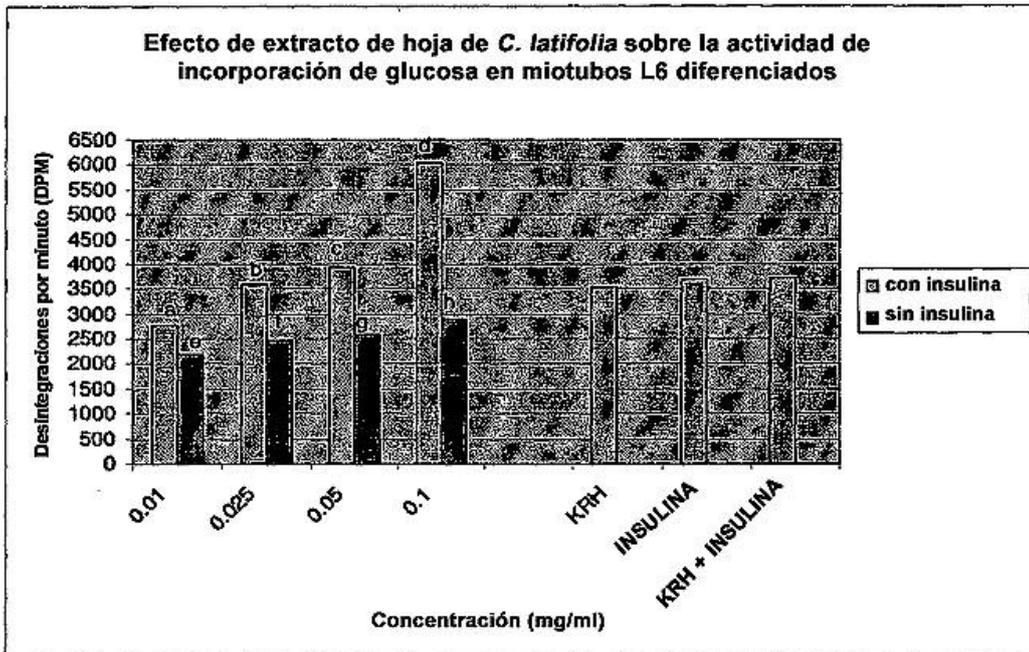


Figura 4d

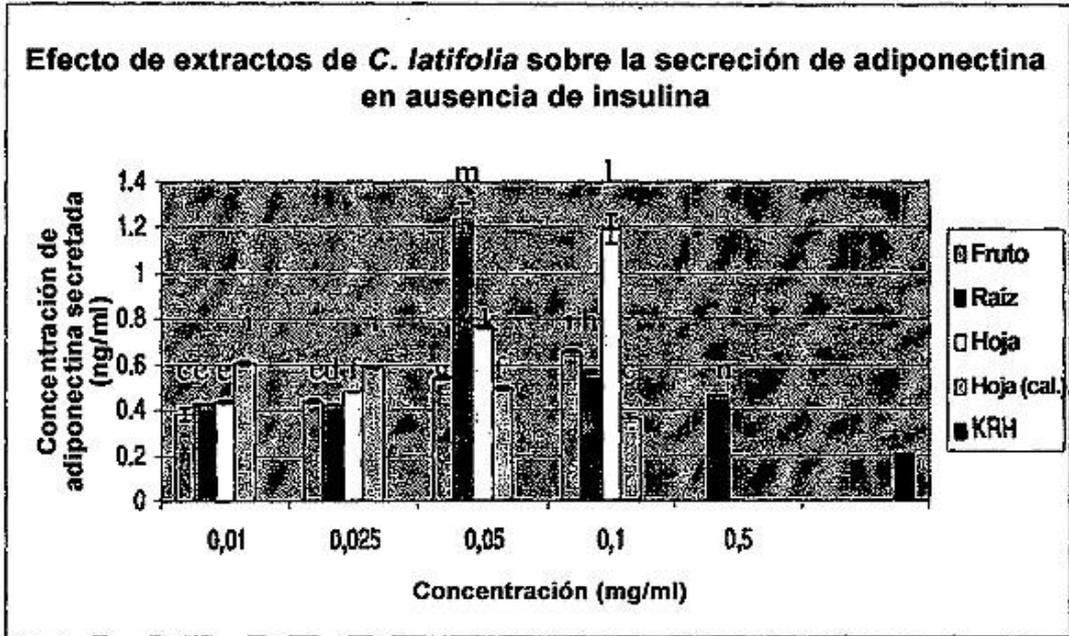


Figura 5

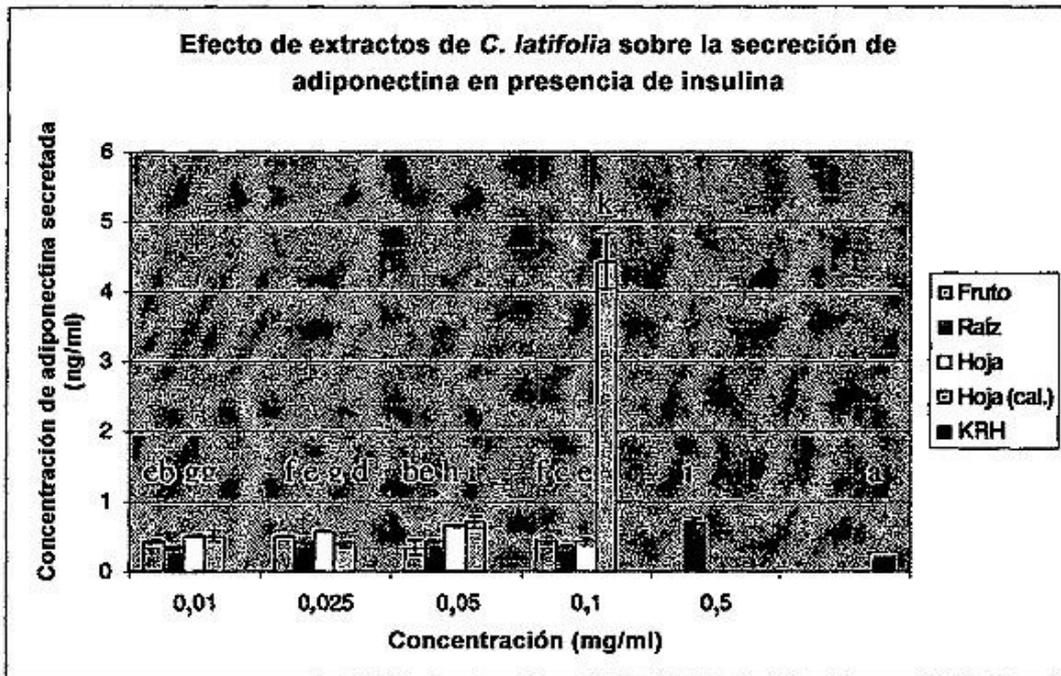


Figura 6

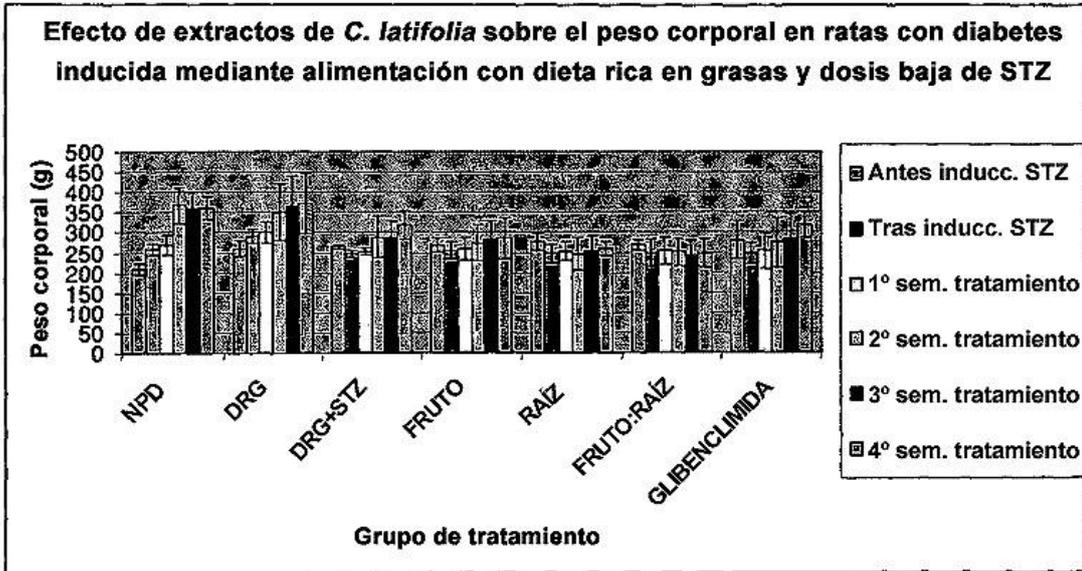


Figura 7a

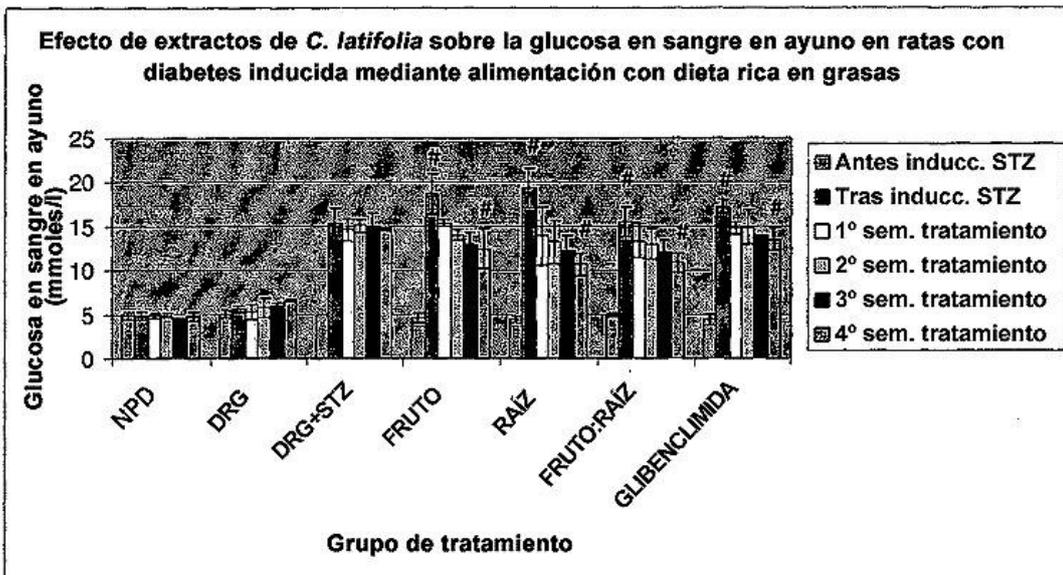


Figura 7b

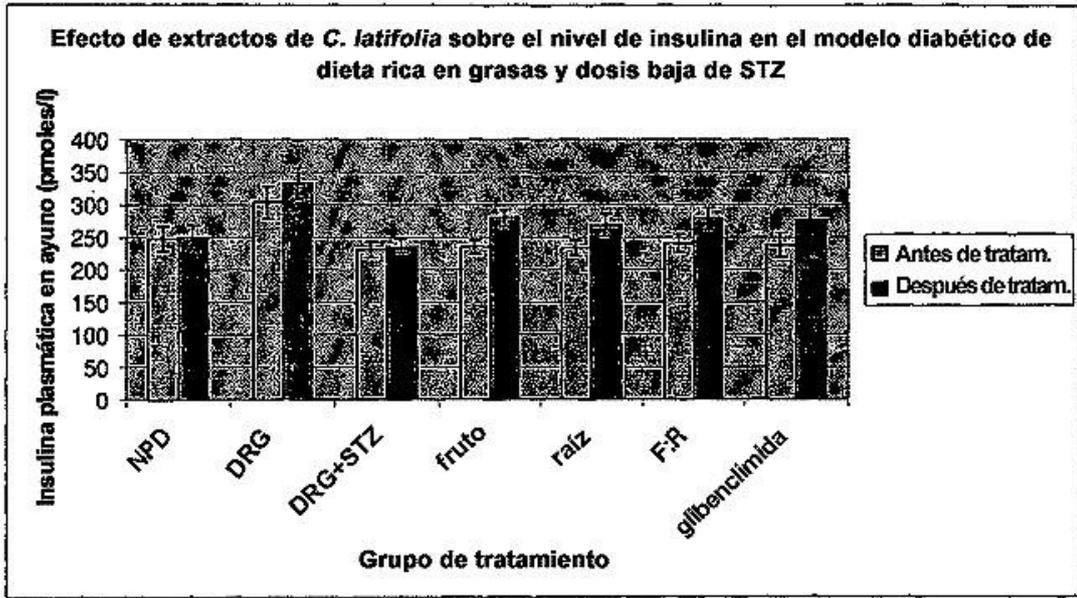


Figura 7c

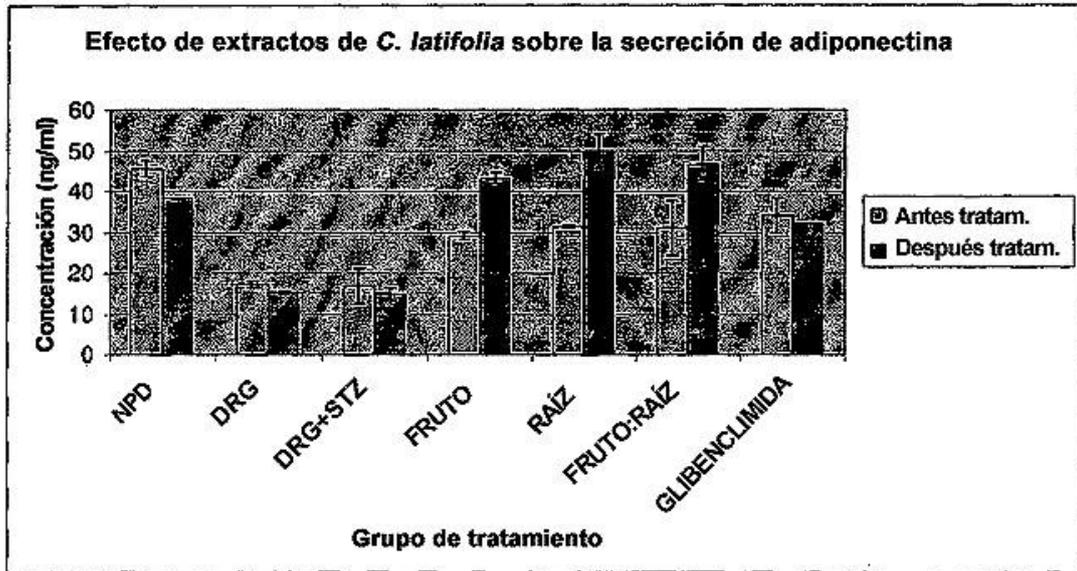


Figura 7d