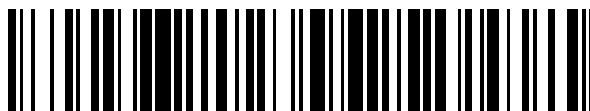


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 844**

51 Int. Cl.:

A61K 31/121 (2006.01)

A61K 36/9066 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2012 PCT/EP2012/063027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13004740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2012 E 12735494 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2729138**

54 Título: **Actividad anticonvulsiva de sesquiterpenoides de bisaboleno aislados de aceite de cúrcuma**

30 Prioridad:
04.07.2011 GB 201111319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2018

73 Titular/es:
DE WITTE, PETER A. M. (20.0%)
Predikherenberg 25
3010 Kessel-Lo, BE;
ESGUERRA, CAMILA V. (20.0%);
CRAWFORD, ALEXANDER D. (20.0%);
ORELLANA PAUCAR, ADRIANA MONSERRATH
(20.0%) y
UNIVERSIDAD DE CUENCA (20.0%)

72 Inventor/es:
DE WITTE, PETER A. M.;
ESGUERRA, CAMILA V.;
CRAWFORD, ALEXANDER D. y
ORELLANA PAUCAR, ADRIANA MONSERRATH

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 661 844 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

Actividad anticonvulsiva de sesquiterpenoides de bisaboleno aislados de aceite de cúrcuma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la actividad anticonvulsiva del aceite de cúrcuma y sus sesquiterpenoides de bisaboleno volátiles ar-turmerona, α -turmerona β -turmerona (curlona) y α -atlantona, como agente anticonvulsivo para el tratamiento de la epilepsia.

10

Antecedentes de la invención

La epilepsia es un trastorno neurológico extendido que afecta a aproximadamente 50 millones de personas en el mundo (1). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 1 % de la carga total de la enfermedad corresponde a diversas formas de epilepsia. Su tratamiento farmacológico comprende una serie de fármacos antiepilépticos (FAE) disponibles en la actualidad (2). El principal problema con respecto a los FAE es la alta incidencia de efectos secundarios que varían desde malestar gastrointestinal, hepatotoxicidad, depresión, deterioro cognitivo e incluso convulsiones refractarias (2) (3) (4) (5) (6). Además, aproximadamente un tercio de los pacientes que padecen epilepsia siguen siendo resistentes a los tratamientos disponibles (1) (2). Por tanto, existe una clara necesidad de continuar identificando FAE novedosos que controlen las convulsiones con efectos adversos mínimos. Las plantas medicinales y los compuestos químicos contenidos en el presente documento representan una fuente potencial de FAE novedosos. Se han publicado numerosos estudios acerca del uso de plantas etnomedicinales para el tratamiento de las convulsiones (7). Se ha demostrado que compuestos de molécula pequeña y aceites esenciales extraídos de plantas presentan propiedades anticonvulsivas (18) (19) (20). Un compuesto, losigamona, derivado de la planta kava kava y utilizado originalmente por los curanderos tradicionales en el Pacífico Sur como ansiolítico, está ahora en desarrollo clínico preliminar como fármaco antiepiléptico novedoso (8) (9). Otra planta, *Curcuma longa* L., es una hierba perenne medicinal de la familia Zingiberaceae nativa del sur de Asia. Se ha utilizado tradicionalmente como carminativo, laxante, antihelmíntico y como tratamiento para trastornos hepáticos. El polvo de sus rizomas, la *cúrcuma*, se ha utilizado no solo como condimento y aditivo colorante en alimentos, sino también en medicina tradicional contra la epilepsia (10). Ahmed T. et al., *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2009, vol. 91, n.º 4, 554-559, desvela el uso tradicional de la cúrcuma para el tratamiento de la epilepsia y la enfermedad de Alzheimer. Sus constituyentes químicos activos principales son los curcuminoides (3-5 %) y el aceite de cúrcuma volátil (2-7 %). El aceite de cúrcuma se compone principalmente de sesquiterpenoides de bisaboleno: ar-, α -, β -, turmerona, α -atlantona y curlona, mientras que los curcuminoides incluyen curcumina, monodemetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina. Casi todas las investigaciones acerca de las propiedades medicinales de la cúrcuma se han centrado en la curcumina, cuyas actividades anticonvulsivas se han demostrado en varios modelos en roedores tales como el modelo de epileptogénesis inducida por hierro (11), el modelo de electrochoque máximo (12), el modelo inducido por ácido kaínico (13) y el modelo sensibilizado experimentalmente por pentilentetrazol (14). Sin embargo, aunque se han realizado unos pocos estudios acerca de la actividad **neuroprotectora** del aceite de cúrcuma (15) (16) (17), no se ha evaluado una unión específica entre la actividad **anticonvulsiva** y compuestos no curcuminoides tales como aceite de cúrcuma o sesquiterpenoides de bisaboleno volátiles. Es decir, los estudios anteriores acerca de los constituyentes volátiles del aceite de cúrcuma eran limitados debido a las etapas de aislamiento complejas implicadas.

45

En el presente documento se describe un método práctico para aislar los constituyentes principales del aceite de cúrcuma a través de HPLC-FI. Los compuestos aislados se evaluaron individualmente en dos sistemas modelo en vertebrados: el pez cebra (*Danio rerio*) y el ratón (*Mus musculus*). Durante la última década, el pez cebra se ha convertido en un valioso modelo para estudios genéticos y la selección de fármacos. La solidez de este modelo *in vivo* se basa en su alta homología genética, fisiológica y farmacológica con los seres humanos. Su alta fecundidad y pequeño tamaño permiten la realización de ensayos con un rendimiento de medio a alto usando cantidades diminutas de compuesto (escala de microgramos). El pez cebra también es prometedora como modelo *in vivo* para identificar compuestos neuroactivos novedosos puesto que los sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y GABAérgicos se desarrollan en una fase temprana durante la embriogénesis y ya son funcionales en las larvas (21). Además, su rápido desarrollo fuera del útero y la transparencia óptica hacen posible detectar fácilmente los efectos morfológicos y conductuales de los compuestos de ensayo en embriones y larvas vivos (22).

55

Más recientemente, también se ha demostrado que el pez cebra es útil para la selección primaria de anticonvulsivos novedosos potenciales (23) (24) (25). Se ha descrito un modelo de convulsión aguda en pez cebra basado en el proconvulsivo pentilentetrazol (PTZ) (23). La exposición de larvas de pez cebra a PTZ provocó una secuencia de cambios conductuales, que se clasificaron en tres fases: un aumento notable en la actividad de natación (etapa I); movimientos de natación circulares "similares a un remolino" (etapa II) y movimientos clónicos con la pérdida de postura y la pérdida de movimiento posteriores durante 1-3 segundos, seguidas de contracciones tónicas (etapa III) (23). Además, los registros electrofisiológicos confirmaron que los cerebros de larvas de pez cebra tratados con PTZ mostraron una serie de descargas epilépticas e interepilépticas. Un estudio de seguimiento validó este modelo quimioconvulsionante en pez cebra mostrando que 13 de los 14 FAE clínicamente utilizados fueron capaces de suprimir comportamientos convulsivos inducidos por PTZ en el pez cebra (24).

65

En el curso de la selección de una serie de plantas medicinales por sus actividades anticonvulsivas potenciales en el modelo quimioconvulsivo de PTZ en pez cebra, los inventores confirmaron las propiedades anticonvulsivas publicadas de la curcumina. Sorprendentemente, sin embargo, los ensayos adicionales del aceite de cúrcuma y sus fracciones cromatográficas revelaron constituyentes adicionales capaces de suprimir comportamientos convulsivos inducidos por PTZ en larvas de pez cebra. La espectrometría de masas y el análisis por RMN de estas fracciones purificadas activas revelaron que éstos pertenecen a los sesquiterpenoides de bisaboleno ar-turmerona, α - β -turmerona (curlona) y α -atlantona. Las actividades anticonvulsivas identificadas usando el ensayo de PTZ en pez cebra después se confirmaron en el modelo de convulsión inducido por PTZ en ratón equivalente y el modelo de convulsión psicomotora 6 Hz de epilepsia parcial. Adicionalmente, se realizó una evaluación de la coordinación motora y el equilibrio en ratones usando el puente elevado después de la inyección i.v. de ar-turmerona con el fin de determinar cualquier efecto secundario que conduzca a un deterioro motor.

Ha habido algunas publicaciones que proporcionaron extractos de cúrcuma, para su uso en medicina, sin embargo, ninguna de ellas proporcionó el uso de la misma como agente anticonvulsivo en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central. Por ejemplo, el documento WO2007109210 y el documento WO2010045577 proporcionan extractos de plantas de cúrcuma y métodos de tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como trastornos asociados a la agregación de placa amiloide o la formación de fibrillas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), sin embargo, ninguna de las dos solicitudes de patente desvela ni sugiere un uso potencial de los extractos de cúrcuma como agentes anticonvulsivos. El documento WO2011080090 proporciona formulaciones de aceite de cúrcuma que tienen actividad antiinflamatoria, analgésica y/o antineoplásica, sin embargo, de nuevo, no desvela ni sugiere un uso potencial de los extractos de cúrcuma como agentes anticonvulsivos.

Aún más, se sabe que los sesquiterpenoides de tipo bisaboleno presentan actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (41), mientras que también se ha demostrado que los bloqueantes de la AChE, en general, inducen convulsiones y pueden conducir a un estado epiléptico, dando como resultado convulsiones espontáneas después de un período latente (42). Por tanto, fue sorprendente encontrar que los sesquiterpenoides de tipo bisaboleno son, de hecho, capaces de reducir el grado de las crisis epilépticas, haciéndolos adecuados como agentes anticonvulsivos en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente divulgación se refiere a un sesquiterpenoide de bisaboleno para su uso como un agente anticonvulsivo en trastornos del sistema nervioso central. La presente invención se refiere a un sesquiterpenoide de bisaboleno de aceite de cúrcuma para su uso como agente anticonvulsivo en el tratamiento de la epilepsia, un trastorno del sistema nervioso central. El aceite de cúrcuma puede ser de un género *Curcuma*, en particular, *Curcuma longa* L.

En una determinada realización, el sesquiterpenoide de bisaboleno de acuerdo con la presente invención se selecciona entre la lista que comprende ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona y α -atlantona. En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición líquida que comprende uno o más sesquiterpenoides de bisaboleno de acuerdo con la presente invención; para su uso como un agente anticonvulsivo en trastornos del sistema nervioso central. En un aspecto preferido, la composición líquida de acuerdo con la presente invención es el aceite de cúrcuma de un género *Curcuma*, en particular, *Curcuma longa* L.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a sesquiterpenoides de bisaboleno o a una composición que comprende uno o más sesquiterpenoide de bisaboleno para su uso como un agente terapéutico para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central; en los que dichos trastornos se seleccionan entre la lista que comprende: epilepsia, temblor, dolor, trastornos anímicos y enfermedades neurodegenerativas; en particular, la epilepsia. Dichos trastornos anímicos pueden ser depresión, trastorno bipolar, trastorno de déficit de atención con hiperactividad y esquizofrenia. Dichos trastornos neurodegenerativos podrían no incluir la enfermedad de Alzheimer.

Preferentemente, dichos trastornos del sistema nervioso central no son trastornos cerebrovasculares. Con trastornos cerebrovasculares se quiere decir los trastornos indicados como trastornos cerebrovasculares en la solicitud de patente WO03/051380 publicada el 26 de junio de 2003. Por tanto, con "trastorno cerebrovascular" se quiere decir un trastorno seleccionado entre un grupo que comprende isquemia, ictus, lesión post-ictus, hemorragia, lesión por reperfusión, trombosis, vasoconstricción, daño oxidativo por radicales libres inducidos por óxido nítrico, infarto, inflamación y enfermedad de Alzheimer.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama esquemático del procedimiento de videoseguimiento en una placa de 96 pocillos usando larvas de pez cebra de 7 días post-fertilización para la evaluación de la actividad anticonvulsiva (Fig. 1A). La placa se incubó en condiciones de oscuridad dentro de la Zebrabox con 100 μ l de vehículo o fármaco y una larva por pocillo. Después de 1 hora de incubación, se añadieron 100 μ l de vehículo de PTZ para el primer y el segundo pocillo, respectivamente, con el fin de controlar el comportamiento de las larvas en presencia del vehículo/compuesto y el proconvulsivo durante 30 minutos. La Fig. 1B muestra la Zebrabox, el sistema central y

la pantalla de comportamiento de las larvas.

Figura 2. Comparación de la actividad anticonvulsiva de A) curcuminoides (curcumina) y B) aceite de cúrcuma. La curcumina mostró una potente actividad en la inhibición de las convulsiones inducidas por PTZ ($p < 0,05$). El aceite de cúrcuma también presentó actividad anticonvulsiva ($p < 0,05$).

Sumario de la evaluación de la actividad anticonvulsiva de la cúrcuma en el ensayo de convulsiones por PTZ en pez cebra. (C) Extracto metanólico de cúrcuma; (D) curcuminoides y (E) aceite de cúrcuma. Las concentraciones sometidas a ensayo se indican a lo largo del eje x y la actividad locomotora bruta total que presentaron las larvas de pez cebra en 30 min se muestra a lo largo del eje y. Los datos se expresan como la media \pm DT ($n = 10-12$). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con vehículo y tratados con muestra (barras de color blanco) o los grupos tratados con PTZ y tratados con muestra más PTZ (barras de color gris) están marcados como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$.

Figura 3: Evaluación de los efectos anticonvulsivos de la fenitoína (A) y el diazepam (B), que sirvieron como controles positivos para el modelo de convulsión aguda en pez cebra inducida por PTZ.

Figura 4: Cromatograma de HPLC del aceite de cúrcuma y sus principales constituyentes. El pico 4 corresponde a ar-turmerona; el pico 5 a α -turmerona y β -turmerona (curlona) y el pico de 6 a α -atlantona.

Figura 5: Evaluación de la actividad anticonvulsiva de ar-turmerona: El eje x representa el tipo de tratamiento. El eje y indica la distancia total recorrida en 30 minutos. Para el grupo de PTZ, la significación estadística se identifica como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$; el grupo de control se indica con s para $p < 0,05$ y ss para $p < 0,01$.

Figura 6: Evaluación de la actividad anticonvulsiva de α -turmerona y β -turmerona (curlona). El eje x representa el tipo de tratamiento. El eje y indica la distancia total recorrida en 30 minutos. Para el grupo de PTZ, la significación estadística se identifica como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$; el grupo de control se indica con s para $p < 0,05$ y ss para $p < 0,01$.

Figura 7: Evaluación de la actividad anticonvulsiva de la α -atlantona. (A) El eje x representa el tipo de tratamiento. El eje y indica la distancia total recorrida en 30 minutos. Para el grupo de PTZ, la significación estadística se identifica como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$; el grupo de control se indica con s para $p < 0,05$ y ss para $p < 0,01$.

Sumario de la evaluación de la actividad anticonvulsiva de los sesquiterpenoides de bisaboleno en el ensayo de convulsiones por PTZ en pez cebra. (B) Ar-turmerona; (C) α, β -turmerona y (D) α -atlantona. El eje x representa la concentración sometida a ensayo para cada uno de los sesquiterpenoides. El eje y indica la actividad locomotora bruta total que presentaron las larvas de pez cebra en 30 min. Los datos se expresan como la media \pm DT ($n = 10-12$). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con vehículo y tratados con muestra (barras de color blanco) o los grupos tratados con PTZ y tratados con muestra más PTZ (barras de color gris) están marcados como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$.

Figura 8: Actividad anticonvulsiva del aceite de cúrcuma y la ar-turmerona en el ensayo de convulsiones inducidas por PTZ en ratón. Los gráficos representan la dosis de PTZ necesaria para provocar diferentes comportamientos convulsivos. La dosis de PTZ para el control se establece en el 100 % (heptágonos interiores en A y B) y los resultados obtenidos con el aceite de cúrcuma (heptágono exterior en A) y la ar-turmerona (heptágono exterior en B) se representan con respecto al control. La significación estadística entre el control y las dosis de PTZ experimentales necesarias para inducir cada comportamiento convulsivo se calcularon usando el ensayo t de Student desapareado. La significación estadística frente a los controles está marcada como (*) para $p < 0,05$ y (**) para $p < 0,01$.

Figura 9. Evaluación de la actividad anticonvulsiva del aceite de cúrcuma en el modelo de convulsiones por PTZ en ratón. Panel superior: tabla que enumera la o las dosis de PTZ necesarias para provocar los comportamientos convulsivos indicados después del tratamiento con aceite de cúrcuma o vehículo solamente. Los datos se expresan como la media \pm DT ($n = 5$). La representación gráfica de los resultados tabulados de (A) aceite de cúrcuma a 50 mg/kg y (B) a 100 mg/kg. Los resultados se expresan como valores relativos en comparación con el control (establecido como el 100 %). Las diferencias estadísticamente significativas entre la muestra (color gris oscuro) y el grupo de control (color gris claro) están marcadas como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$ (ensayo t de Student desapareado). Por claridad, las DT no se representan en los gráficos, pero se indican en las tablas. Sin embargo, el coeficiente de variación no superó nunca el 28 % (ensayo t de Student desapareado).

Figura 10. Evaluación de las actividades anticonvulsivas de α, β -turmerona y ar-turmerona en el modelo de convulsión por PTZ en ratón. Panel superior: tabla que enumera la o las dosis de PTZ necesarias para provocar los comportamientos convulsivos indicados después del tratamiento con sesquiterpenoide de bisaboleno o vehículo solamente. La representación gráfica de los resultados tabulados a partir de (A) α, β -turmerona a una dosis de 100 mg/kg y (B) ar-turmerona a 50 mg/kg. La columna 'Control A' corresponde a controles tratados con vehículo para α, β -turmerona; la columna 'Control B' corresponde a controles tratados con vehículo para ar-

5 turmerona. Los datos se expresan como la media \pm DT ($n = 5$). Con fines de claridad, las DT no se representan en los gráficos, pero se indican en las tablas. Los resultados se expresan como valores relativos en comparación con el control (establecido como el 100 %). Las diferencias estadísticamente significativas entre la muestra (color gris oscuro) y el grupo de control (color gris claro) están marcadas como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$ (ensayo t de Student desapareado). Por claridad, las DT no se representan. Sin embargo, el coeficiente de variación nunca superó el 28 % y el 37 % en el caso de la ar-turmerona y la α, β -turmerona, respectivamente.

10 **Figura 11.** Evaluación de la actividad anticonvulsiva del valproato de sodio (control positivo) en los ensayos de convulsiones por PTZ en pez cebra y ratón. (A) Ensayo de PTZ en pez cebra. El eje x representa la concentración del valproato de sodio evaluado. El eje y indica la actividad locomotora bruta total presentada por las larvas de pez cebra en 30 min. Los datos se expresan como la media \pm DT ($n = 10-12$). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con vehículo y tratados con muestra (barras de color blanco) o los grupos tratados con PTZ y tratados con muestra más PTZ (barras de color gris) están marcados como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$. (B) Ensayo de PTZ en ratón. Panel superior: tabla que enumera la o las dosis de PTZ necesarias para provocar los comportamientos convulsivos indicados después del tratamiento con valproato de sodio o vehículo solamente. Panel inferior: representación gráfica de resultados tabulados de tratamiento con valproato de sodio a una dosis de 50 mg/kg. Los resultados se expresan como valores relativos en comparación con el control (establecido como el 100 %). Las diferencias estadísticamente significativas entre la muestra (color gris oscuro) y el grupo de control (color gris claro) están marcadas como * para $p < 0,05$ y ** para $p < 0,01$ (ensayo t de Student desapareado). Por claridad, las DT no se representan. Sin embargo, el coeficiente de variación nunca superó el 45 %.

25 **Figura 12.** Datos establecidos a partir de los ratones C57B1/6 machos después de la inyección i.v. de vehículo (control negativo), diazepam 1 mg/kg (control positivo) y ar-turmerona 50 mg/kg en el aparato de puente elevado. Se muestran mediciones del número de resbalones (A), el número de caídas (B) y el tiempo total en la barra de equilibrio (C). El diazepam se seleccionó como control positivo debido a su efecto secundario bien conocido de deterioro motor después de la administración i.v./i.p. en ratones.

30 **Figura 13.** Evaluación de la actividad protectora de ar-turmerona en el modelo de 6 Hz. Se incluyeron vehículo (control negativo) y ácido valproico 300 mg/kg (control positivo) en la evaluación. Los puntos de datos indican el número de animales protegidos de las convulsiones a la dosis correspondiente ($n = 6$).

Descripción detallada de la invención

35 Un primer aspecto de la presente divulgación se refiere a un sesquiterpenoide de bisaboleno para su uso como un agente anticonvulsivo en trastornos del sistema nervioso central. Pueden usarse uno o más sesquiterpenoides de bisaboleno ya sea solos o en combinación. Los sesquiterpenoides de bisaboleno son sesquiterpenoides de aceite de cúrcuma. En algunas realizaciones, los sesquiterpenoides de bisaboleno se aíslan de aceite de cúrcuma. La planta *Curcuma longa* L puede ser una fuente de aceite de cúrcuma y/o sesquiterpenoides de bisaboleno. Otras fuentes para sesquiterpenoides de bisaboleno desveladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aceites esenciales de plantas (por ejemplo, *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (Amarillo Batai)), insectos, productos naturales producidos por organismos vivos (por ejemplo, extracto de nido de abeja), hongos, bacterias, y/o microorganismos. Los sesquiterpenoides bisaboleno también pueden producirse por síntesis química. Los "bisabolenos" son un grupo de compuestos químicos naturales estrechamente relacionados que se clasifican como sesquiterpenos (una clase de terpenos que consiste en tres unidades de isopreno). Las modificaciones bioquímicas tales como la oxidación o el reordenamiento producen los sesquiterpenoides relacionadas.

50 El término "cúrcuma" también es intercambiable con "ácido turmérico" e incluye plantas, clones, variantes y deportes de la familia vegetal *Zingiberaceae*. En particular, la cúrcuma incluye plantas, clones, variantes y deportes del género vegetal *Curcuma*; más en particular, *Curcuma longa* L. Por tanto, en una realización preferida, el aceite de cúrcuma es de un género *Curcuma*, en particular, *Curcuma longa* L. La cúrcuma y, en particular, sus rizomas, contiene aproximadamente el 3-5 % de curcuminoides, tales como curcumina, y aproximadamente el 2-7 % de aceite de cúrcuma. Un "rizoma" es un tallo de una planta que por lo general se encuentra bajo tierra, con frecuencia enviando raíces y brotes desde sus nódulos.

55 El "aceite de cúrcuma" puede obtenerse como se detalla en el presente documento a continuación en los ejemplos, tal como mediante hidrodestilación de polvo de rizoma seco de *Curcuma*. Sin embargo, también puede obtenerse a través de cualquier otra manera adecuada. El aceite de cúrcuma se compone principalmente de sesquiterpenoides de bisaboleno: ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona y α -atlantona y, por tanto, en una realización particular, la presente invención proporciona ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona y/o α -atlantona para su uso como agente anticonvulsivo en el tratamiento de la epilepsia, un trastorno del sistema nervioso central. En ciertas realizaciones, se administran ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona y α -atlantona por separado. En algunos aspectos puede administrarse ar-turmerona en combinación con α -turmerona, β -turmerona y/o α -atlantona. También pueden administrarse ar-turmerona con una o más de α -turmerona, β -turmerona y/o α -atlantona. En cierta divulgación, se administra α -turmerona en combinación con ar-turmerona, β -turmerona y/o α -atlantona. También puede administrarse α -turmerona en combinación con una o más de ar-turmerona, β -turmerona y/o α -atlantona. En algunos

aspectos, se administra β -turmerona en combinación con ar-turmerona, α -turmerona y/o α -atlantona. Puede administrarse β -turmerona en combinación con una o más de ar-turmerona, α -turmerona y/o α -atlantona. En ciertos aspectos, α -atlantona pueden administrarse en combinación con ar-turmerona, α -turmerona y/o β -turmerona. Puede administrarse α -turmerona en combinación con una o más de ar-turmerona, α -turmerona y/o β -turmerona. Cuando se administran dos o más compuestos, la administración puede ser simultánea o en serie.

El aceite de cúrcuma y/o los sesquiterpenoides de bisaboleno son lipófilos y cruzan la barrera hematoencefálica y otras membranas celulares, la calidad que puede potenciar la biodisponibilidad de los compuestos en el sistema nervioso. Por tanto, el uso de aceite de cúrcuma y/o sesquiterpenoides de bisaboleno confiere ventajas sobre el uso de otros compuestos tales como la curcumina. La curcumina también es un componente de la planta *Curcuma longa* L y un compuesto al que se le ha atribuido la actividad anticonvulsiva de *Curcuma* (11) (12) (32). Sin embargo, ciertas formulaciones de curcumina se convierten fácilmente en metabolitos solubles en agua en los intestinos y se excretan, de manera que poco del compuesto alcanza la sangre o el sistema nervioso.

Se entiende que la expresión "agente anticonvulsivo" como se usa en el presente documento incluye cualquier compuesto adecuado para el tratamiento de convulsiones epilépticas, trastornos bipolares, trastornos anímicos y/o dolor neuropático. Las convulsiones epilépticas pueden ser resultado de cualquier actividad neuronal anormal, excesiva o hipersincrónica en el cerebro. En algunas realizaciones, las convulsiones epilépticas que requieren tratamiento con anticonvulsivos son provocadas por infección, ictus, traumatismo, fiebre, tumores, uso de fármacos, daño de la barrera hematoencefálica y/o enfermedad neurodegenerativa. En ciertas realizaciones, las convulsiones epilépticas son provocadas por el estado emocional, por la respuesta a la luz y/o el sonido, el sueño, la privación del sueño, las hormonas, los trastornos metabólicos y/o los defectos congénitos. Las convulsiones epilépticas para las que los anticonvulsivos desvelados en el presente documento proporcionan tratamiento pueden clasificarse como convulsiones parciales, tales como convulsiones parciales simples y/o convulsiones parciales complejas, o pueden clasificarse como convulsiones generalizadas, tales como crisis de ausencia, convulsiones mioclónicas, convulsiones clónicas, convulsiones tónicas, tónicas tónico-clónicas y/o convulsiones atónicas o una convulsión mixta. Los anticonvulsivos que se describen en el presente documento, tales como aceite de cúrcuma, ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona y/o α -atlantona, también pueden proporcionar un tratamiento para las formas de convulsión resistentes a la terapia. En concreto, se ha utilizado el modelo de convulsión psicomotora 6 Hz de epilepsia parcial como modelo de formas de convulsiones resistentes a la terapia, incluyendo convulsiones límbicas (40).

Los pacientes que padecen convulsiones epilépticas pueden ser lactantes de 0-6 meses, 6-12 meses, 12-18 meses, 18-24 meses. En ciertas realizaciones, los pacientes que padecen convulsiones epilépticas son individuos de 65-70, 75-80, 85-90, 95-100, 100-105 y más años de edad. Los pacientes también pueden ser niños de 2-12 años, adolescentes de 13-19 años de edad o adultos de 20-64 años de edad.

Pueden usarse anticonvulsivos para el tratamiento de las convulsiones epilépticas, incluyendo el tratamiento de los síntomas asociados a las convulsiones epilépticas y/o epilepsia. Los anticonvulsivos también pueden usarse para tratar las convulsiones epilépticas que son resultado de trastornos del sistema nervioso central tales como enfermedades cerebrovasculares y/o enfermedades neurodegenerativas. Uno de los objetivos de un agente anticonvulsivo (es decir, un "anticonvulsivo") es suprimir el disparo rápido y excesivo de neuronas que inician una convulsión. Otro de los objetivos de un anticonvulsivo es prevenir la propagación de la convulsión dentro del cerebro y ofrecer protección frente a posibles efectos excitotóxicos, que puede dar como resultado daño cerebral. Los anticonvulsivos también se denominan fármacos antiepilépticos (abreviados "FAE") y a veces se denominan fármacos antiepilépticos. En la epilepsia, un área del cerebro y/o del sistema nervioso normalmente es hiperirritable. Los fármacos antiepilépticos actúan para ayudar a reducir esta área de irritabilidad y, por tanto, prevenir las convulsiones epilépticas.

La expresión "trastorno del sistema nervioso central" tiene por objeto incluir cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso central (SNC) incluyendo epilepsia, temblor, dolor, trastornos anímicos (incluyendo depresión, trastorno bipolar, trastorno de déficit de atención con hiperactividad, esquizofrenia); infecciones del SNC (por ejemplo encefalitis), enfermedades neurodegenerativas (esclerosis lateral amiotrófica, por ejemplo, enfermedad de Parkinson), enfermedades autoinmunes e inflamatorias (por ejemplo, esclerosis múltiple) y trastornos genéticos (por ejemplo, enfermedades de Huntington); en particular, epilepsia. En una realización particular, los trastornos neurodegenerativos de la presente invención no incluyen la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la enfermedad de Alzheimer y/u otras enfermedades neurodegenerativas conducen a convulsiones epilépticas, que pueden tratarse usando anticonvulsivos como se describen en el presente documento.

La presente divulgación proporciona adicionalmente una composición líquida que comprende uno o más sesquiterpenoides de bisaboleno de acuerdo con la presente invención; para su uso como un agente anticonvulsivo en trastornos del sistema nervioso central. En una realización particular, dicha composición líquida es aceite de cúrcuma de un género *Curcuma*, en particular, *Curcuma longa* L.

La composición líquida de acuerdo con la presente invención en particular comprende una cantidad eficaz de sesquiterpenoides de bisaboleno. Como es evidente para un experto en la materia, dicha cantidad eficaz puede

5 variar dependiendo del número y el tipo de sesquiterpenoides de bisaboleno utilizados. Por ejemplo, el aceite de cúrcuma como una composición líquida puede utilizarse puro o diluido adicionalmente a una concentración de aproximadamente 1-50 µg/ml, más en particular, aproximadamente 2,5-20 µg/ml, en particular aproximadamente 10 µg/ml. Pueden estar presentes ar-turmerona, α-turmerona, β-turmerona y α-atlantona ya sea en combinación entre sí o no, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 11-46 µM, más en particular, aproximadamente 23-46 µM.

10 Estas composiciones líquidas pueden formularse y administrarse sistémica o localmente. Las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" (Mack Publishing Co. Easton Pa.). Las vías adecuadas pueden, por ejemplo, incluir la administración oral o transmucosa, así como la entrega parenteral, incluyendo la administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal.

15 En una realización adicional, las composiciones pueden estar en forma de complementos nutricionales o dietéticos, incluyendo comprimidos, cápsulas, geles, pastas, emulsiones, soluciones, cápsulas y similares.

Ejemplos

20 Habiendo proporcionado una divulgación general, los siguientes ejemplos ayudan a ilustrar la divulgación general. Estos ejemplos específicos se incluyen meramente para ilustrar ciertos aspectos y realizaciones de la divulgación y no tienen por objeto ser limitantes en ningún aspecto. Ciertos principios generales descritos en los ejemplos, sin embargo, pueden ser aplicables en general a otros aspectos o realizaciones de la divulgación.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

25 Productos químicos y reactivos

30 Se adquirieron sulfóxido de dimetilo (99,9 %, calidad de espectroscopia) de Acros Organics (Bélgica); dietil éter (99,9 %, calidad de espectroscopia) de Aldrich Chemical; y acetonitrilo (100 %, calidad de HPLC) de Fisher Scientific (Reino Unido). Se obtuvo agua doblemente destilada (H₂O_{dd}) del sistema de purificación Milli-Q.

La mezcla de curcuminoides de la cúrcuma (cúrcuma al 98 %, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) y fenitoína se adquirió de Acros Organics. Se obtuvo PTZ de Sigma-Aldrich (Alemania) y diazepam de Roche.

35 Material vegetal

40 Se adquirió rizoma seco en polvo de *Curcuma longa* L. (cúrcuma) de un proveedor local en Bélgica con la India como la fuente de origen. Se completó una identificación microscópica por un investigador: R. Ansalloni, *Universidad de Cuenca*, Cuenca, Ecuador (26).

40 Animales de experimentación

45 Todos los procedimientos para experimentos con animales se realizaron de conformidad con las Regulaciones Europeas y Nacionales y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la *Universidad Católica de Lovaina*.

Pez cebra (*Danio rerio*)

50 Se criaron peces cebra adultos de la cepa Tg (*fl*i 1a: EGFP)y1 a 28,5 °C en un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas. Los huevos se recogieron a partir de reproducción natural y se albergaron en medio de embrión (NaCl 17 mM, KCl 2 mM, Ca(NO₃)₂ 1,8 mM, MgSO₄ 0,12 mM, tampón HEPES 1,5 mM pH 7,1-7,3 y azul de metileno 0,6 mM) en una incubadora a 28,5 °C. La clasificación de embriones de pez cebra y larvas y medio de refresco se realizó cada día hasta 7 días después de la fertilización. Todas las larvas se sacrificaron mediante la administración de una sobredosis de anestésico (tricaina).

55 Ratones (*Mus musculus*)

60 Se alojaron ratones C57B1/6 macho (20-30 g) de 8 semanas de edad en jaulas adecuadas en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas a 28 °C en una habitación tranquila. Los animales se alimentaron a demanda con una dieta de pienso y agua hasta que tuvieron de 10 a 12 semanas de edad.

Ejemplo 2: Destilación de aceite esencial de cúrcuma

65 Se obtuvo aceite volátil a partir de cúrcuma mediante hidrodestilación usando un aparato de tipo Clevenger de acuerdo con la Farmacopea Europea. Se extrajo una muestra de cúrcuma (100 g) con 2 litros de H₂O_{dd} durante 3 horas. Se completaron cuatro hidrodestilaciones (400 g) obteniéndose el aceite de color amarillento pálido y

odorífero (rendimiento del 2,14 %). El aceite de cúrcuma se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 3: Análisis por HPLC-FI de aceite de cúrcuma y aislamiento de sus constituyentes

5 Se disolvió una muestra de aceite de cúrcuma (334 mg) en 10 ml de acetonitrilo. El volumen de inyección fue de 300 µl. El análisis por HPLC-FI de aceite de cúrcuma y el posterior aislamiento de sus constituyentes se adaptaron de la obra original de He y sus colaboradores (27). El análisis por HPLC-FI se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento (Sistema LaChrom Elite HPLC, VWR Hitachi) equipado con un sistema de detección de diodos en serie (DDS). La separación por HPLC-FI de los constituyentes del aceite de cúrcuma en una escala preparativa se consiguió usando una columna de fase inversa Econosphere 10 µm C18 (250 mm x 10 mm) (Grace Davison Discovery Sciences, Bélgica) unida a una columna de seguridad Econosphere 10 µm C18 (250 mm x 7 mm) (Grace Davison Discovery Sciences, Bélgica). La columna funciona a un caudal de 5 ml/min a temperatura ambiente. El perfil de la elución en gradiente fue: agua doblemente destilada (H₂O_{dd}) (A) y acetonitrilo (B); 0-15 min, 40-60 % de B; 15-20 min, 60-100 % de B; 20-25 min, 100 % de B; 25-30 min, 100-40 % de B. Los analitos se controlaron con el DDS a 260 nm. Se recogieron ocho fracciones individualmente (Figura 4). Los disolventes de las fracciones recogidas se retiraron por separación entre dietil éter y H₂O_{dd}.

20 La fase de éter se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se retiró haciendo pasar una corriente lenta de nitrógeno sobre la muestra a temperatura ambiente. Las muestras concentradas se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Ejemplo 4: Elucidación de la estructura química de los sesquiterpenos de bisaboleno

25 Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN)

Se obtuvieron espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C de las fracciones 4, 5 y 6 del equipo Bruker 300 Avance y Bruker 600 Avance II⁺ usando cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

30 Análisis por espectroscopia de masas (EM)

El análisis por CL-EM se realizó en un sistema Agilent 1100 equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, automuestreador, detector de DDS de UV y módulo de columna termostatazada acoplada a EM Agilent 6110 de un solo cuadrupolo. La obtención de datos y la cuantificación se realizaron con el software Agilent LC/MSD ChemStation. Las fracciones 4, 5 y 6 se analizaron en una columna Gracia Prevail RP-C18 de 3 µm (150 mm x 2,1 mm) a un caudal de 0,2 ml/min. El gradiente de CL comprendía dos disolventes: agua bidestilada (H₂O_{dd}) + ácido fórmico al 0,1 % (A) y acetonitrilo (B); 0-17 min, 40-60 % de B; 17-32 min, 60-100 % de B; 32-55 min, 100 % de B.

40 El análisis por IEN-EM se completó en un aparato Thermo Electron LCQ Advantage con un sistema de bomba e inyección Agilent 1100 acoplado al software de análisis de datos Xcalibur.

Ejemplo 5: Evaluación toxicológica en modelo de pez cebra

45 El objetivo de este ensayo era determinar el intervalo de concentraciones adecuadas que habían de someterse a ensayo en el pez cebra para la evaluación de la actividad anticonvulsiva. Se colocaron peces cebra de siete días post-fertilización en una placa de 24 pocillos (placa de cultivo de tejidos, de fondo plano, FALCON®, EE.UU.), seis larvas por pocillo. Se incubaron con diferentes concentraciones de un compuesto de ensayo disuelto en 1 ml de medio de embrión (DMSO al 1 %). Las larvas se examinaron cada hora durante el período de 6 horas y se compararon con el grupo de control para detectar los siguientes signos de toxicidad: la ausencia de respuesta de sobresalto a golpecitos en la placa, los cambios en la frecuencia cardíaca o la circulación, la presencia de edema, la parálisis y la muerte. Por tanto, la concentración máxima tolerada (CMT) se definió como la concentración más alta a la que no se observaron signos de toxicidad en 6 de 6 larvas de pez cebra en 6 horas de exposición a un compuesto de ensayo.

55 Además, las larvas se examinaron durante un período de 24 h en la muestra y se compararon con el grupo de control para detectar toxicidad. Por tanto, la concentración máxima tolerada (CMT) también se definió como la concentración más alta a la que no se observaron signos de toxicidad en 6 de 6 larvas de pez cebra en 24 h de exposición a la muestra.

60 Ejemplo 6: Evaluación de la actividad anticonvulsiva en modelo de PTZ en pez cebra

Se siguieron larvas de pez cebra de 7 días post-fertilización usando el sistema ViewPoint VideoTrack System for Zebrafish™ (Versión 2.3.1.0, ViewPoint, Francia). El sistema consta en una fuente de luz infrarroja, una cámara de vídeo digital de alta resolución para capturar los movimientos de las larvas en un período de tiempo definido (30 minutos en la preparación experimental de los inventores) y el software para analizar la actividad locomotora de las

larvas (Figura 1).

La concentración más alta sometida a ensayo corresponde a la CMT determinada previamente. Se colocaron larvas de pez cebra en una placa de 96 pocillos (placa de cultivo de tejidos, de fondo plano, FALCON®, EE.UU.); una larva por pocillo. Cada fila de la placa (12 pocillos) comprendía diferentes grupos de tratamiento. Dos filas adyacentes contienen el mismo compuesto pero recibieron dos tratamientos diferentes: a) primera fila, medio de embrión (DMSO al 1 %) y b) la segunda fila, PTZ 20 mM. Las dos primeras filas de la placa (grupo de control de vehículo, donde vehículo era medio de embrión) contenían un volumen de 100 µl de medio de embrión (DMSO al 1 %) por pocillo. Los siguientes tres grupos de ensayo (dos filas cada uno) contenían 100 µl de diferentes concentraciones de compuesto de ensayo en medio de embrión. Las larvas tratadas de este modo se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y tranquilidad durante 1 hora. Se añadió medio de embrión (100 µl) a las primeras filas de cada uno de los cuatro grupos. Análogamente, se añadieron 100 µl de PTZ 40 mM a las segundas filas de cada grupo de tratamiento (concentración final de PTZ: 20 mM). Por tanto, el patrón de movimiento de las larvas de pez cebra expuestas se siguió por vídeo y se evaluó en presencia de medio de embrión (DMSO al 1 %) y PTZ 20 mM. El seguimiento de los vídeos de los movimientos de las larvas se inició 5 minutos después de la adición de medio de embrión o PTZ a los pocillos y se registró durante 30 minutos. Un total de 8 pocillos en cada placa se quedaron sin larvas (medio solamente) como control negativo, de manera que cada parámetro experimental consistió en un promedio de 10 a 12 larvas. El software de seguimiento midió tres periodos de 10 minutos del movimiento de las larvas. Los resultados se registran como el valor promedio del tiempo total del movimiento de las larvas durante 30 minutos. Las cifras mostradas son representativas de una serie de dos experimentos similares.

Las propiedades anticonvulsivas de los curcuminoides se evaluaron mediante el análisis del seguimiento por video de los movimientos de tipo convulsivo de las larvas de pez cebra. Las concentraciones más altas sometidas a ensayo correspondían a la CMT, por tanto, en cualquier caso las larvas no mostraron ningún signo de toxicidad a estas dosis. La CMT para los curcuminoides corresponde a 10 µg/ml. Los curcuminoides mostraron una actividad anticonvulsiva significativa ($p < 0,05$) a 2,5 µg/ml y a 5 y 10 µg/ml ($p < 0,001$) (Figura 2). Este hallazgo está en consonancia con las propiedades anticonvulsivas de la curcumina reveladas en modelos de roedores (11) (12) (13) (14). Por otro lado, un análisis adicional descubrió la actividad anticonvulsiva para el aceite de cúrcuma. Las larvas mostraron una disminución significativa ($p < 0,001$) de las convulsiones inducidas por PTZ después de la exposición a aceite de cúrcuma (10 µg/ml) (Figura 2). La actividad anticonvulsiva de los curcuminoides y el aceite de cúrcuma se comparó con la de la fenitoína y el diazepam, dos fármacos utilizados ampliamente para el tratamiento de la epilepsia. Las concentraciones más altas sometidas a ensayo corresponden a la CMT. La fenitoína mostró una actividad significativa a 75 µg/ml ($p < 0,05$) y 252,26 µg/ml ($p < 0,001$). El diazepam disminuyó los movimientos inducidos por PTZ en larvas a las concentraciones de 1,42 µg/ml y 14,23 µg/ml ($p < 0,001$) (Figura 3). La curcumina y el aceite de cúrcuma mostraron una actividad interesante para retrasar la generación de convulsiones a concentraciones significativamente más bajas que la fenitoína y a concentraciones equivalentes de diazepam.

El análisis por HPLC-FI del aceite de cúrcuma reveló ocho picos (Figura 4). Los picos se recogieron individualmente para evaluar la actividad anticonvulsiva y encontrar los constituyentes activos. Las fracciones 2 y 7 no se sometieron a ensayo en el modelo de pez cebra ya que las cantidades recogidas no fueron suficientes para la realización del ensayo. Se observó una disminución significativa de las convulsiones provocadas por PTZ con la fracción 4 ($p < 0,05$) a 10 µg/ml, la fracción 5 ($p < 0,001$) a 5 µg/ml y la fracción 6 a concentraciones de 5 µg/ml ($p < 0,001$) y 10 µg/ml ($p < 0,05$) (Figura 5, Figura 6, Figura 7A). Los sesquiterpenoides de bisaboleno presentaron propiedades anticonvulsivas a concentraciones más bajas en comparación con la fenitoína. La fracción 4 y la 6 mostraron una respuesta positiva a concentraciones similares a las del diazepam. La fracción 5 fue eficaz en la concentración más baja que el diazepam y la fenitoína.

Las fracciones 4, 5 y 6 que mostraron actividad positiva en el modelo de PTZ en pez cebra se analizaron adicionalmente para la elucidación de la estructura química. El tiempo de retención, el PM y la UVmáx de la fracción 4 son coherentes con el producto propuesto en la Figura 4. Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y ^{13}C de esta fracción están de acuerdo con los valores notificados para la ar-turmerona (29), posiblemente una mezcla de enantiómeros. El análisis por RMN indica que la **fracción 5** es una mezcla 1:1 de dos estructuras isoméricas, posiblemente mezcla de enantiómeros. Los compuestos de esta fracción se identificaron mediante análisis por RMN 1D y 2D como α -turmerona y β -turmerona (curlona) (30). No se observó isomerización al análogo aromático ar-turmerona por RMN después de una semana. La estructura de la **Fracción 6** se identificó como α -atlantona (probablemente el isómero E) basándose en el PM, los espectros de RMN 1D y 2D (29) (31) (Figura; Tabla 1).

Tabla 1 Datos de UV y EM de sesquiterpenoides de bisaboleno de aceite de cúrcuma. Los datos obtenidos del análisis se compararon con los valores del análisis de X.He y sus colaboradores (24) referidos entre corchetes [].

Fracción	T _R (lit.) (min.)	UVmáx (lit.) (min.)	Pico de masa	PM sugerido
4	24 [25,3]	238 [238]	217	216
5	27,2 [28,1]	229 [/]; 238 [238]	219	218
6	29,3 [/]	195 [/]; 269 [/]	219	218

Fracción 4: ar-turmerona; fracción 5: α, β-turmerona (curlona); fracción 6: α-atlantona

5 El análisis del extracto metanólico de cúrcuma (polvo de rizoma de *C. longa*) reveló una actividad anticonvulsiva en el ensayo de PTZ en larvas de pez cebra. Con el fin de identificar los constituyentes activos presentes en el extracto metanólico de cúrcuma, las propiedades anticonvulsivas de los curcuminoides y el aceite de cúrcuma también se evaluaron a través de análisis por videoseguimiento. Los curcuminoides mostraron actividad anticonvulsiva a 2,5 µg/ml (p <0,05) y a los 5 y 10 µg/ml (p <0,01) en el ensayo de PTZ en larvas. Un análisis adicional descubrió una actividad anticonvulsiva adicional para el aceite de cúrcuma. Las larvas mostraron una disminución (p <0,01) de las convulsiones inducidas por PTZ después de la exposición a aceite de cúrcuma (10 µg/ml) (Figura 2C-2E). En concreto, la exposición de las larvas de pez cebra a curcuminoides o a aceite de cúrcuma solos (es decir en ausencia de proconvulsivo) también dio lugar a un ligero aumento en la actividad locomotora en comparación con los controles tratados con vehículo. Sin embargo, no se observaron signos evidentes de toxicidad (medida mediante el cambio en la frecuencia cardíaca, la pérdida de la postura, la falta o el retraso en la respuesta a los estímulos táctiles o la muerte en estas larvas.

15 Las propiedades anticonvulsivas de los sesquiterpenoides de bisaboleno también se evaluaron a través del análisis por seguimiento con vídeo de los movimientos de tipo convulsivo de las larvas de pez cebra. Las concentraciones más altas sometidas a ensayo corresponden a la CMT, por tanto, en cualquier caso las larvas no mostrar ningún signo de toxicidad a estas dosis. No se observó ninguna disminución significativa en las convulsiones desencadenadas por PTZ para las fracciones de ar-turmerona, α,β-turmerona y α-atlantona. La ar-turmerona mostró una actividad anticonvulsiva a 46 µM (p <0,05), α,β-turmerona a 23 µM (p <0,01) y α-atlantona a concentraciones de 23 µM (p <0,05) y 46 µM (p <0,01) (Figura 7B-7D).

25 **Ejemplo 7: Generación de convulsiones inducidas por PTZ en ratones**

30 Se dividieron ratones aleatoriamente en grupos de cinco animales (vehículo (donde el vehículo era polietilenglicol 200 (PEG200):agua 1:1) y muestra). Los animales se precalentaron bajo una lámpara de infrarrojos durante 10 minutos para dilatar las venas de la cola. Después se colocaron en un retenedor y la vena lateral de la cola se cateterizó con una aguja de 1 cm de longitud, 29 de calibre. La aguja se fijó a la cola con cinta quirúrgica después de confirmar una colocación correcta. La aguja estaba unida a un tubo largo de polietileno de 0,7 m conectado a dos jeringas de 2,5 ml de vidrio que contenían: a) muestra (vehículo de control o compuestos de ensayo) y b) PTZ (7,5 mg/ml de H₂O₂). Estas jeringas se montaron en una bomba de infusión (ALADOIN-1000 11VDC, 0,75 Å, World Precision Instruments). Por tanto, se infundieron por VI 100 µl de vehículo de control (PEG 200:ddH₂O 1:1) o compuestos de ensayo (aceite de cúrcuma y ar-turmerona) a una velocidad de 50 µl/min durante 2 minutos. Diez minutos más tarde, los ratones se liberaron de la inmovilización y se colocaron en una jaula de plástico transparente para la observación.

40 Se infundió PTZ continuamente a una velocidad de 150 µl/min. Las etapas de la manifestación de las convulsiones en los ratones se puntuaron de acuerdo con el tiempo transcurrido entre el inicio de la infusión de PTZ y los siguientes eventos conductuales: contracción de oreja, cola y mioclónica, clono de las extremidades anteriores, caída, extensión tónica de las extremidades posteriores y muerte (28). El comportamiento se observó durante un máximo de 5 minutos de infusión de PTZ. En caso de que cualquier ratón sobreviviera, se sacrificó.

45 Las dosis de PTZ se calcularon de acuerdo con la fórmula: dosis de PTZ [mg/kg] = (concentración de PTZ [mg/ml] x velocidad de infusión [ml/s] x duración de la infusión [s] x 1000)/peso del ratón [g]). Todas las soluciones de trabajo contenían heparina (20 µl/ml).

50 La evaluación adicional del aceite de cúrcuma para controlar la generación de convulsiones inducidas por PTZ en ratones mostró un retraso en la aparición de los parámetros de convulsión en el ensayo de PTZ en ratón. Los ratones tratados con aceite de cúrcuma (50 mg/kg) mostraron un aumento significativo en las dosis de PTZ necesarias para activar todos los criterios de valoración conductuales: contracción de la cola (p <0,001), contracción de la oreja, contracción mioclónica, clono de las extremidades anteriores, caída, extensión tónica de las extremidades posteriores y muerte (p <0,05) en comparación con el grupo de control (Figura 8A). Curiosamente, la ar-turmerona a una dosis de 200 mg/kg también mostró en los ratones un aumento significativo de la dosis de PTZ para la generación de la contracción de la oreja, la cola y mioclónica, la extensión tónica de las extremidades posteriores y la muerte (p <0,05) en comparación con el control (Figura 8B).

55 Cuando se usó el vehículo PEG200:DMSO 1:1, los ratones tratados con aceite de cúrcuma (50 mg/kg) mostraron un

aumento significativo en la dosis de PTZ necesaria para activar todos criterios de valoración conductuales: clono de las extremidades anteriores, caída y extensión tónica de las extremidades posteriores ($p < 0,05$) y contracción de la oreja, mioclónica, de la cola y muerte ($p < 0,01$), en comparación con el grupo de control (Figura 9A).

5 Además, una dosis de 100 mg/kg de aceite de cúrcuma en el ensayo de PTZ ratón presentó una actividad significativa en el retraso de la generación de convulsiones para todos los parámetros de convulsión y la muerte en comparación con el control ($p < 0,01$) (Figura 9B). Con respecto a los sesquiterpenoides de bisaboleno activos, la ar-turmerona y la α,β -turmerona se evaluaron usando el modelo de convulsión de PTZ en ratón (Figura 10). Los ratones infundidos con una dosis de 50 mg/kg de ar-turmerona presentaron una resistencia significativa a la
10 generación de convulsiones que condujo a un aumento en la dosis necesaria de PTZ para activar todos los acontecimientos evaluados: extensión tónica de las extremidades posteriores ($p < 0,05$) y contracción de la oreja, mioclónica y de la cola, clono de las extremidades anteriores, caída y la muerte ($p < 0,01$). Análogamente, se evaluó la actividad anticonvulsiva de α,β -turmerona y también se encontraron resultados positivos con una dosis de
15 100 mg/kg para todos los parámetros de convulsión: clono de las extremidades anteriores, caída, contracción de la oreja y de la cola ($p < 0,05$) y contracción mioclónica, extensión tónica de las extremidades posteriores y muerte ($p < 0,01$). No se sometió a ensayo la α -Atlantone en el modelo de ratón puesto que la cantidad recogida no fue suficiente para realizar el ensayo.

El valproato de sodio se incluyó como control positivo en el método de infusión en cola de PTZ para la selección de FAE en ratones (Figura 11). Usando este ensayo, el valproato de sodio (50 mg/kg) fue capaz de retrasar la
20 extensión tónica de las extremidades posteriores ($p < 0,01$) y la muerte ($p < 0,05$). El valproato de sodio también fue capaz de controlar la generación de convulsiones en larvas de pez cebrá en la que también se usó como control positivo (Figura 11).

25 **Ejemplo 8: Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Los valores se presentan como media \pm desviación típica (DT). La actividad locomotora de las larvas de pez cebrá se analizaron usando ANOVA de una sola vía seguida de ensayo de comparación múltiple de Dunnett. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre un grupo tratado y los grupos de control equivalentes (vehículo o PTZ)
30 se consideraron indicativas de la disminución o el aumento de la actividad locomotora de las larvas de pez cebrá. Para experimentos con ratones, se calcularon diferencias significativas entre intervalos de tiempo estimados antes de las etapas de convulsión mencionadas anteriormente usando el ensayo de t de Student no pareado.

35 **Ejemplo 9: Evaluación de la actividad anticonvulsiva de ar-turmerona en el modelo de convulsión psicomotora de 6 Hz de epilepsia parcial**

Para evaluar la actividad anticonvulsiva de la ar-turmerona, se usó el modelo de convulsión psicomotora de 6 Hz de epilepsia parcial (Barton M.E. et al., 2001), aplicando de este modo los siguientes parámetros de estimulación: 6 Hz,
40 0,2 ms de ancho de pulso rectangular, 3 s de duración.

A cada ratón (NMRI macho +/- 30 g) se le administró el compuesto (ar-turmerona 50 mg/kg, 20 mg/kg, 1 mg/kg y 100 μ g/kg) o vehículo (PEG 200:DMSO 1:1) a través de inyección i.p. Después de 30 minutos de incubación, las convulsiones se indujeron mediante estimulación de la córnea usando el dispositivo Ugo-Basil. Antes de la colocación de electrodos corneales, se aplicó una gota de xilocaína al 0,5 % a los ojos del animal. Los animales se
45 restringieron de forma manual y se liberaron de inmediato en una jaula de plástico transparente después de la estimulación. Después, se observó el animal. La convulsión se caracterizó por aturdimiento, clono de las extremidades anteriores, contracción de las vibrisas, cola de Straub durante al menos 45 s. La protección se definió como la ausencia de una convulsión. Se usó un mínimo de seis animales por dosis. Seis de seis ratones mostraron protección con concentraciones de 100 μ g/kg y 1, 20, 50 mg/kg de ar-turmerona (Figura 13). Se incluyeron también
50 un control negativo (solo vehículo) y un control positivo (ácido valproico 300 mg/kg). Como era de esperar, 6 de cada 6 ratones tratados solo con vehículo no quedaron protegidos y 6 de cada 6 ratones tratados con ácido valproico quedaron protegidos.

55 **Ejemplo 10: Coordinación motora y equilibrio en el puente elevado**

En este ejemplo, la coordinación motora y el equilibrio de los ratones usando el puente elevado se observó como se describe en (Brooks et al, 2012).

El puente elevado mide la capacidad de un ratón (C57B1/6 macho +/- 25 g) para atravesar la barra de equilibrio sin perder su equilibrio (medida como resbalones). Cada ratón se entrenó hasta que fue competente para correr por la barra de equilibrio sin hacer una pausa durante el trayecto. Dos áreas de la barra de equilibrio se designan como las áreas 'inicio' y 'parada' para permitir que el iniciara y detuviera el cronometraje del tiempo que tardaba el animal en correr por la barra de equilibrio. Después del entrenamiento, a cada ratón se le administró el compuesto o vehículo a través de inyección i.v. Después de 10 minutos, el ratón se colocó en la punta de la barra de equilibrio en el inicio
60 mirando hacia la barra de equilibrio. El operador cronometró desde la línea de inicio hasta que el ratón llegó a la línea de parada. Se contó el número de resbalones (Figura 12A), de caídas (Figura 12B) y el tiempo total (Figura

12C) sobre la barra de equilibrio (desde el área de 'inicio' a la de 'parada'). En este ensayo, 5 de 5 ratones tratados con ar-turmerona 50 mg/kg mostraron un comportamiento comparable con el grupo de control (tratado con vehículo). Por tanto, a partir de los resultados obtenidos puede señalarse que la ar-turmerona no provoca deterioro motor o del equilibrio como efecto secundario de su actividad anticonvulsiva. Se incluyeron ratones tratados con diazepam debido al efecto secundario bien conocido de este FAE para provocar alteraciones motoras y del equilibrio en ratones después de la administración i.v./i.p.

DISCUSIÓN

El modelo de convulsión inducida por PTZ en pez cebra (24) se validó usando FAE de primera línea: fenitoína y diazepam. La validación adicional de este sistema de detección se consiguió mediante la identificación de las propiedades anticonvulsivas conocidas de los curcuminoideos. La curcumina con frecuencia se ha citado como la sustancia activa principal responsable de las propiedades anticonvulsivas de la cúrcuma (11) (12) (32). Aunque se han demostrado sus propiedades medicinales, los ensayos clínicos de Fase I han revelado limitaciones farmacocinéticas importantes para la curcumina. Cuando se administra por vía oral, la cantidad pequeña de curcumina absorbida por el intestino se convierte en su mayor parte en metabolitos hidrosolubles y se excreta. Por tanto, la cantidad de curcumina que alcanza la circulación es muy baja. Por tanto, los problemas de biodisponibilidad han limitado considerablemente sus aplicaciones terapéuticas. Por tanto, se han realizado varios estudios de formulación para potenciar la biodisponibilidad de la curcumina (33).

Por otra parte, estudios neuroprotectores en modelos de roedores han demostrado que el aceite de cúrcuma y sus sesquiterpenoides de bisaboleno principales cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica probablemente debido a su naturaleza lipófila que les permite pasar a través de las membranas celulares (18). Puesto que el aceite de cúrcuma y sus constituyentes presentan una biodisponibilidad mejor y cruzan las biomembranas con menos dificultad en comparación con la curcumina (15) (16) (33), la conclusión de los inventores de que el aceite de cúrcuma también muestra propiedades anticonvulsivas es, en efecto, interesante. Además, la seguridad de la cúrcuma está apoyada por el hecho de que se ha utilizado ampliamente como condimento de alimentos predominantemente en la India durante siglos y su uso se ha aprobado para el consumo humano. Además, estudios de toxicidad realizados en pacientes humanos sanos (34) y análisis informáticos (35) han predicho que la ar-turmerona es un candidato potencial seguro para el desarrollo adicional del fármaco. Los estudios previos acerca de los constituyentes volátiles del aceite de cúrcuma se vieron limitados debido a su aislamiento complejo. El trabajo de los inventores presenta un método práctico para aislar los constituyentes principales del aceite de cúrcuma a través de HPLC-FI. Los compuestos aislados se evaluaron individualmente en el modelo de epilepsia de PTZ en pez cebra (datos no mostrados para los picos 1, 3, 8). Este modelo reveló una actividad significativa para el aceite de cúrcuma y los principales sesquiterpenoides de bisaboleno: ar-, α , β -turmerona (curlona) y α -atlantona. Además, las propiedades anticonvulsivas del aceite de cúrcuma (50 y 100 mg/kg), ar-turmerona (200 mg/kg) y α - β -turmerona (100 mg/kg) se corroboraron satisfactoriamente en modelo de PTZ en ratones y modelo de convulsión psicomotora a 6 Hz de epilepsia parcial. Con respecto a la actividad del aceite de cúrcuma frente a ar-turmerona, parece ser una actividad aditiva, puesto que es necesaria una dosis mayor del sesquiterpenoide de bisaboleno aislado para observar propiedades anticonvulsivas en este modelo. Sin embargo, estos resultados revelan que los principales sesquiterpenoides de bisaboleno, especialmente la ar-turmerona, son posibles candidatos a fármacos anticonvulsivos que se han de investigar adicionalmente.

EQUIVALENTES

Aunque se han analizado realizaciones específicas de la presente invención, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. El alcance completo de la invención debería determinarse por referencia a las reivindicaciones.

REFERENCIAS

1. **World Health Organization**. *Atlas: Epilepsy Care in the World*. s.l.: WHO Press, 2005. ISBN 9241563036.
2. *Drug treatment of epilepsy: options and limitations*. Schimdt, D. 2009, *Epilepsy and Behavior*, Vol. 15, págs. 56-65.
3. *Life-threatening adverse events of antiepileptic drugs*. Arroyo, S. y de la Morena, A. 1-2, 2001, *Epilepsy Res*, Vol. 47, págs. 155-74.
4. *Complaints associated with the use of antiepileptic drugs: results from a community-based study*. Carpaya, J., Aldenkamp, A.P. y van Donselaar, C.A. 3, 2005, *Seizure*, Vol. 14, págs. 198-206.
5. *Patient-reported cognitive side effects of antiepileptic drugs: Predictors and comparison of all commonly used antiepileptic drugs*. Arifa, H., et al. 1, 2009, *Epilepsy & Behaviour*, Vol. 14, págs. 202-9.
6. *Cognitive and memory effects of the new antiepileptic drugs*. Meador, K. 2006, *Epilepsy Res*, Vol. 68, págs. 63-

7.

7. *Review on phytotherapy in epilepsy.* Nsour, W.M., CB-S., Lau y I.C.K., Wong. 2000, *Seizure*, Vol. 9, págs. 96-107.

5

8. *New anticonvulsant agents.* Malawska, B. 2005, *Current topic in medicinal chemistry*, Vol. 5, págs. 69-85.

9. Losigamone. Schwabe, W. y Willmore, L.J. 2001, *Curr. Op. Invet. Drugs*, Vol. 2, págs. 1763-66.

10

10. *WHO monographs on selected medicinal plants.* World Health Organization. s.l.: WHO Library Cataloguing in Publication Data, 1999, Vol. 1, págs. 115-24. ISBN 924154517 8.

11. *Curcumin protects against electrobehavioral progression of seizures in the iron-induced experimental model of epileptogenesis.* Jyoti, A., Sethi, P. y Sharma, D. 2009, *Epilepsy & Behavior*, Vol. 14, págs. 300-8.

15

12. *Protective role of curcumin in maximal electroshock induced seizures, memory impairment and neurotransmitters in rat brain.* Jithendra, C., Murthy, T. y Upadyay, L. 1, 2008, *Journal of Pre-Clinical and Clinical Res*, Vol. 2, págs. 35-9.

20

13. *Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin.* Sumanot, Y., et al. 2006, *Life Sci*, Vol. 78, págs. 1884-91.

14. *Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazol-kindled epileptic rat model.* Mehla, J., et al. 19-22, 2010, *Life Sci*, Vol. 87, págs. 596-603.

25

15. *Curcuma oil modulates the nitric oxide system response to cerebral ischemia/repe/fusion injury.* Dohare, P., Varma, S. y Ray, M. 2008, *Nitric Oxide*, Vol. 19, págs. 1-11.

30

16. *Neuroprotective efficacy and therapeutic window of curcuma oil: in rat embolic stroke model.* Dohare, P., et al. 55, 2008, *BCM Complement Altern Med*, Vol. 8.

17. *Curcuma oil: reduces early accumulation of oxidative product and is anti-apoptogenic in trasient focal ischemia in rat brain.* Rathore, P., et al. 2008, *Neurochem Res*, Vol. 33, págs. 1672-82.

35

18. *Anticonvulsant activity of furanocoumarins and the essential oil obtained from the fruits of *Heracleum crenatifolium*.* Tosun, F., et al. 3, 2008, *Food Chemistry*, Vol. 107, págs. 990-3.

19. *Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poacea) leaf essential oil in rodents.* Quintans-Júnior, L.J., et al. 8, 2008, *Phytomedicine*, Vol. 15, págs. 619-24.

40

20. *Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures.* Sayyah, M., Valizadeh, J. y Kamalinejad, M. 3, 2002, *Phytomedicine*, Vol. 9, págs. 212-6.

45

21. *Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening.* Lockwood, B., et al. 2009, *Pharmacology, Biochemistry y Behavior*, Vol. 77, págs. 647-54.

50

22. *In vivo drug discovery in the Zebrafish.* Zon, L. y Peterson, R. 2005, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 4, págs. 35-44.

23. *Pentylenetetrazole-induced changes in Zebrafish behavior, neural activity, and c-fos expression.* Baraban, S.C., Taylor, M.R.: Castro, P.A. y Baier, H. 3, 2005, *Neuroscience*, Vol. 131, págs. 759-68.

55

24. *Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants.* Berghmans, S., et al. 1, 2007, *Epilepsy Res*, Vol. 75, págs. 18-28.

25. *Validation of a larval Zebrafish locomotor assay for assesing the seizure liability of early-stage development drugs.* Winter, M.J., et al. 2008, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Vol. 57, págs. 178-87.

60

26. *Jackson, B. P. Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices.* Londres, Reino Unido: CRC Press, 1990. ISBN 0849377056.

27. *Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*).* He, X-G., et al. 1998, *Journal of Chromatography A*, Vol. 818, págs. 127-32.

65

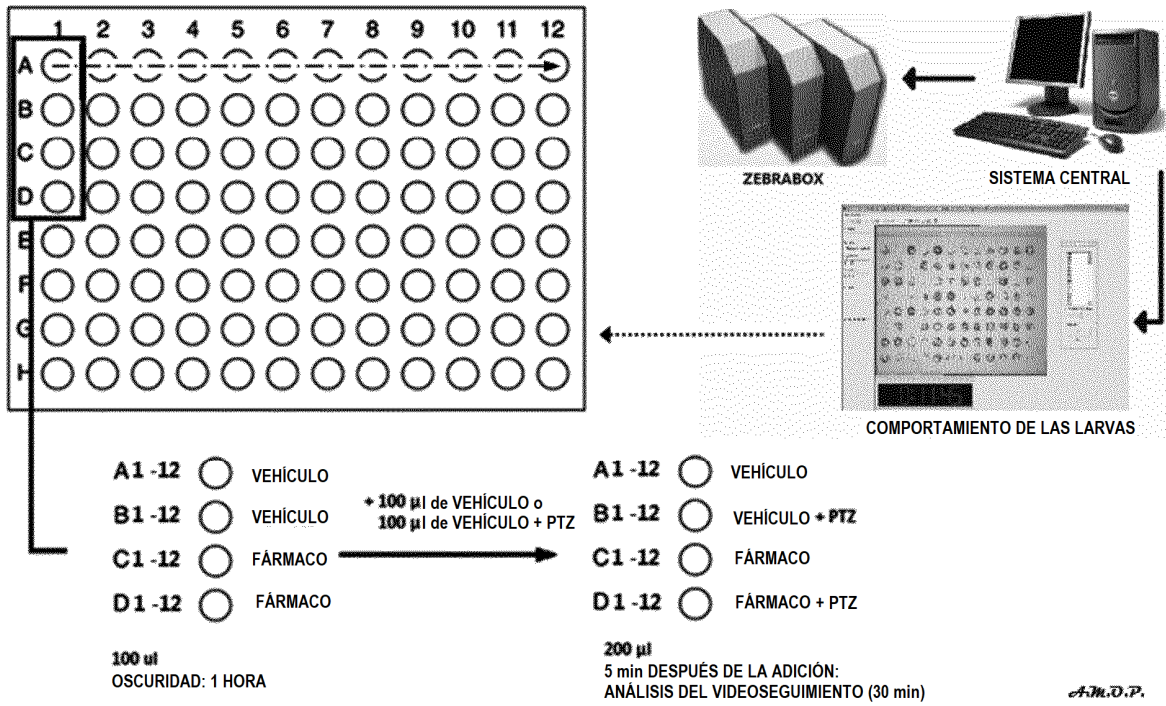
28. *Acute seizure tests in epilepsy research: electroshock- and chemical-induced convulsions in the mice.* Giardina, W.J. y Gasior, M. 5.22.27, 2009, *Curr. Protoc. Pharmacol*, Vol. 45.
- 5 29. *Total synthesis of (R)- and (S)-turmerone and (7S,9R)-bisacumol by an efficient chemoenzymatic approach.* Kamal, A., et al. 11, 2009, *Tetrahedron:Asymmetry*, Vol. 20, págs. 1267-71.
30. *New bisabolane sesquiterpenoids from the rhizomes of Curcuma xanthorrhiza (Zingiberacea).* Uehara, S., et al. 1989, *Chem Pharm Bull*, Vol. 37, págs. 237-40.
- 10 31. *Preparation of γ,δ -unsaturated β -ketophosphonates from tertiary α -allenic alcohols. The Synthesis of (6)-(E) α -Atlantone.* Friesen, R.W. y Blouin, M. 1996, *J.Org.Chem*, Vol. 61, págs. 7202-6.
- 15 32. *Curcumin has anticonvulsant activity on increasing current electroshock seizures in mice.* Bharal, N., et al. 2008, *Phytotherapy Res*, Vol. 22, págs. 1660-4.
33. *A pilot cross-over study to evaluate human oral bioavailability of BCM-95 CG (Biocurcumax), a novel bioenhanced preparation of curcumin.* Antony, B., et al. 4, 2008, *Indian J Pharm Sci*, Vol. 70, págs. 445-9.
- 20 34. *Early human safety study of turmeric oil (Curcuma longa oil) administered orally in healthy volunteers.* Joshi, J., et al. 2003, *JAPI*, Vol. 51.
- 35 35. *Toxicity prediction of compounds from turmeric (Curcuma longa L.).* Balaji, S. y Chempakam, B. 2010, *Food Chem Toxicol*, Vol. 48, págs. 2951-9.
- 25 36. *α -Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions.* Pereira, M., et al. 1, 2005, *Epilepsy Res*, Vol. 66, págs. 185-94.
- 30 37. *Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy.* Lores Arnaiz, S., et al. 12, *Neurochemical Res*, Vol. 23, págs. 1477-83.
38. *Projective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazol-kindled epileptic rat model.* Mehla J, Reeta K.H, Gupta P, Gupta Y. s.l.: *Life Sci*, 2010, Vols. 87, Issues 19-22, págs. 596-603.
- 35 39. El Jazouli M, Lage N, Masson S, Thuillier A. s.l.: *Bull Soc Chim Fr*, 1988, Vol. 5, págs. 883-8.
- 40 40. *Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy.* Barton ME, Klein BD, Wolf HH, White HS. *Epilepsy Res*. 2001 Dec;47(3):217-27.
- 40 41. *Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Volatile Oil from Peltophorum dasyrachis Kurz ex Bakar (Yellow Batai) and Bisabolane-Type Sesquiterpenoids.* Fujiwara M, Yagi N, Miyazawa M. *J. Agric Food Chem*. 2010, 58: 2824-2829.
- 45 42. *Cholinergic Dysfunction in Temporal Lobe Epilepsy.* Friedman A, Beherens C, Heinemann U. *Epilepsia* 2007, 48 (Suppl5): 126-130.

REIVINDICACIONES

1. Un sesquiterpenoide de bisaboleno aislado de aceite de cúrcuma para su uso como un agente anticonvulsivo en el tratamiento de la epilepsia, en donde dicho aceite de cúrcuma es de *Curcuma longa L.*
- 5 2. Un sesquiterpenoide de bisaboleno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sesquiterpenoide de bisaboleno se selecciona entre la lista que comprende ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona y α -atlantona.

Figura 1

(A)



(B)

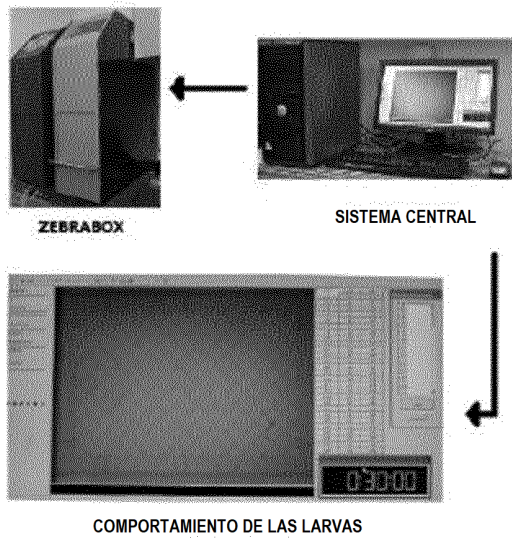
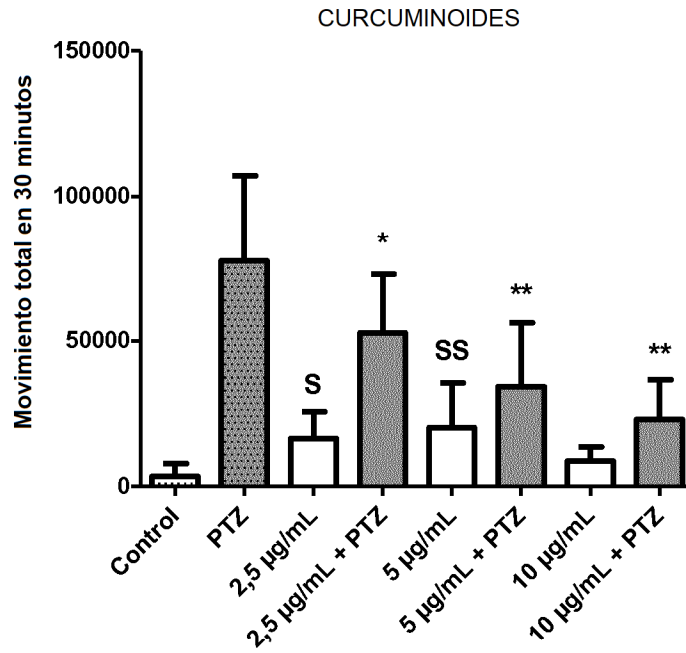


Figura 2.

A)



B)

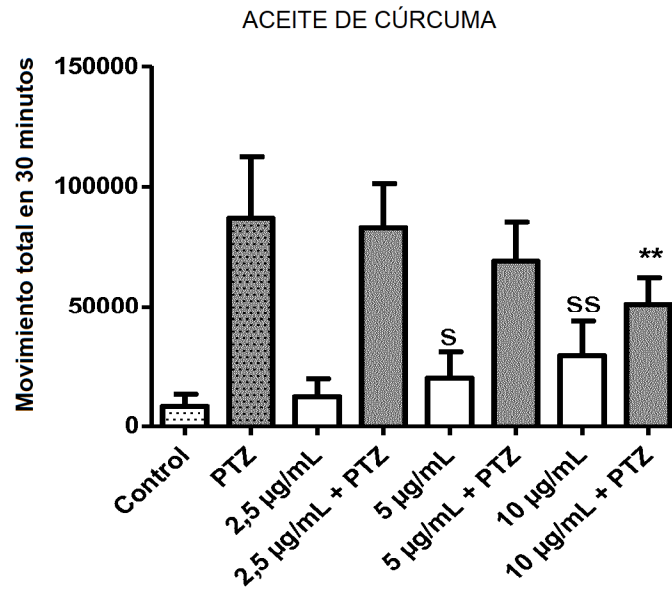


Figura 2 (continuación)

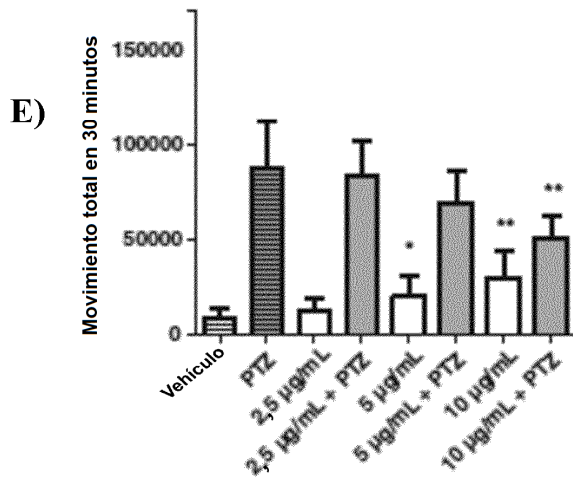
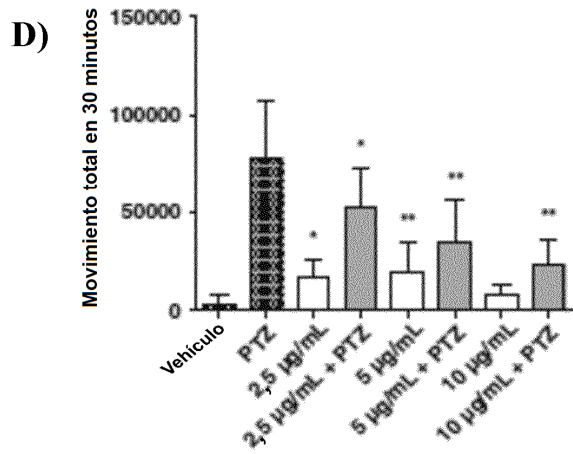
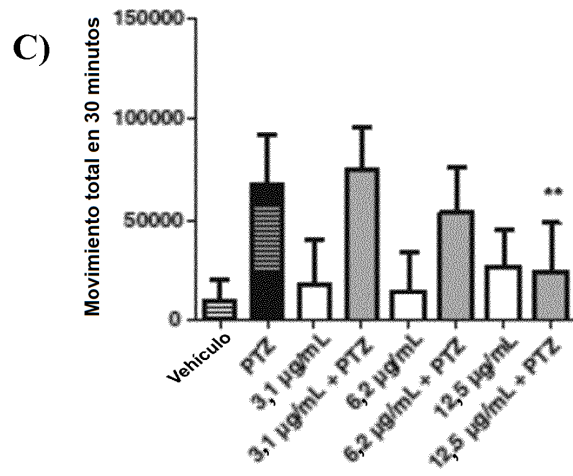
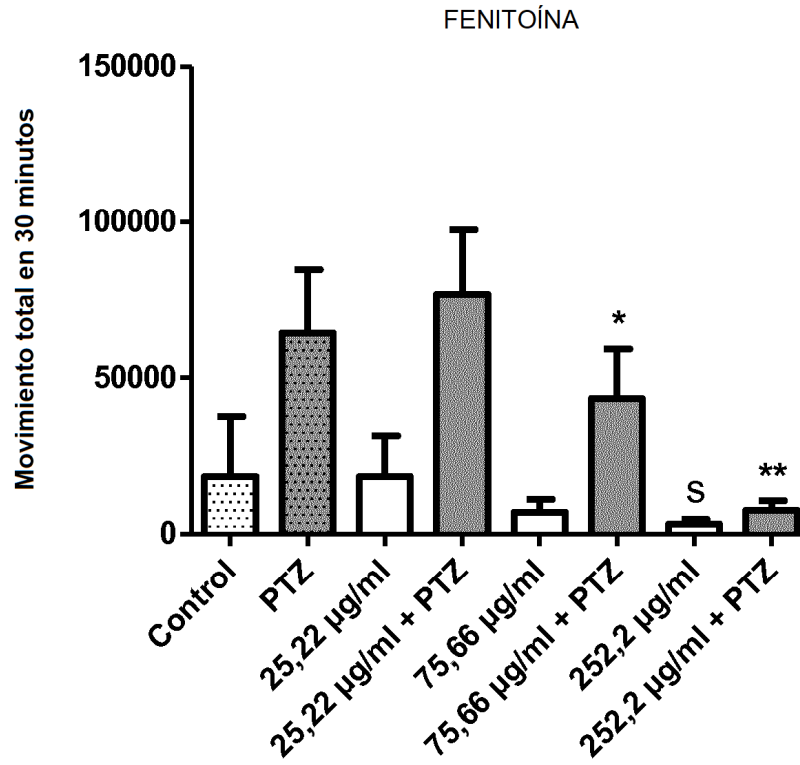


Figura 3

A)



B)

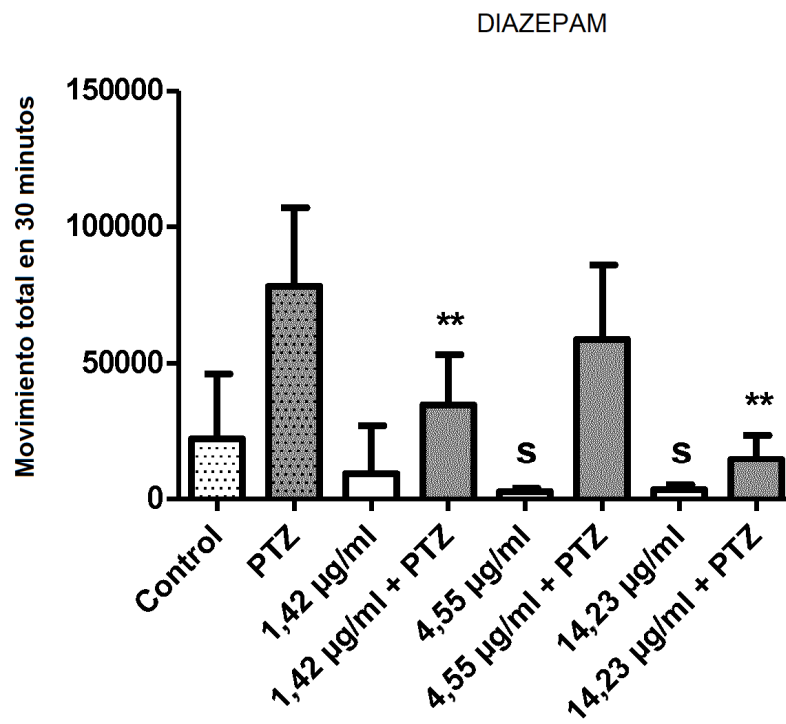


Figura 4

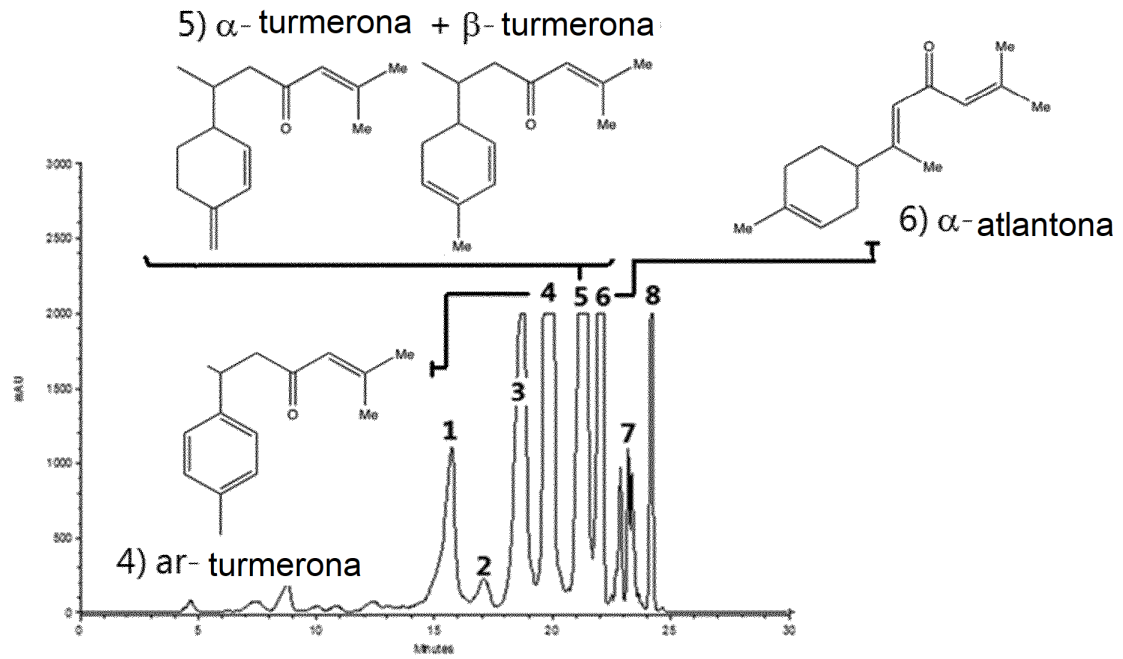


Figura 5

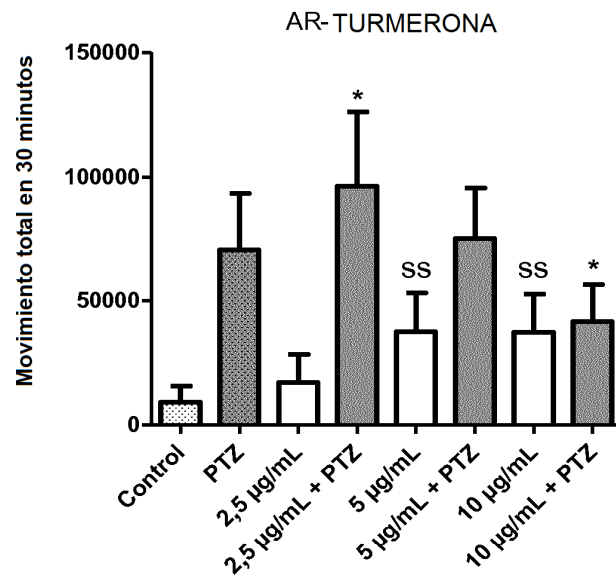


Figura 6

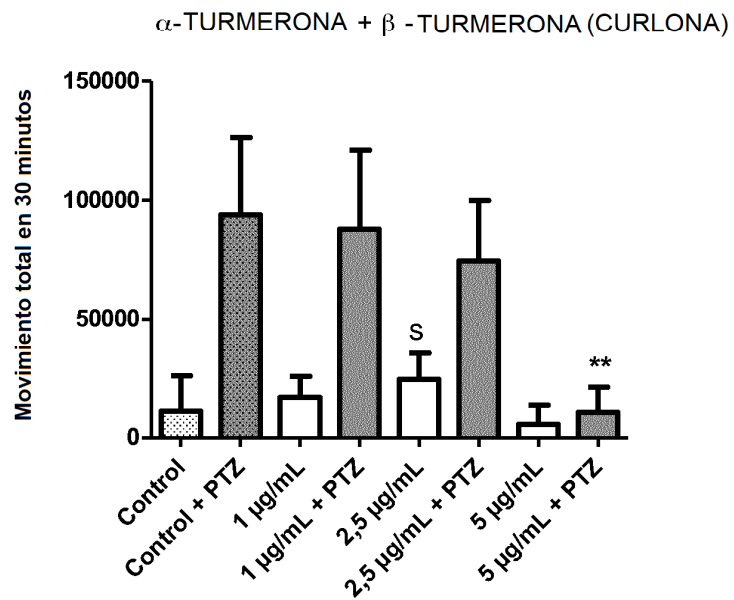


Figura 7

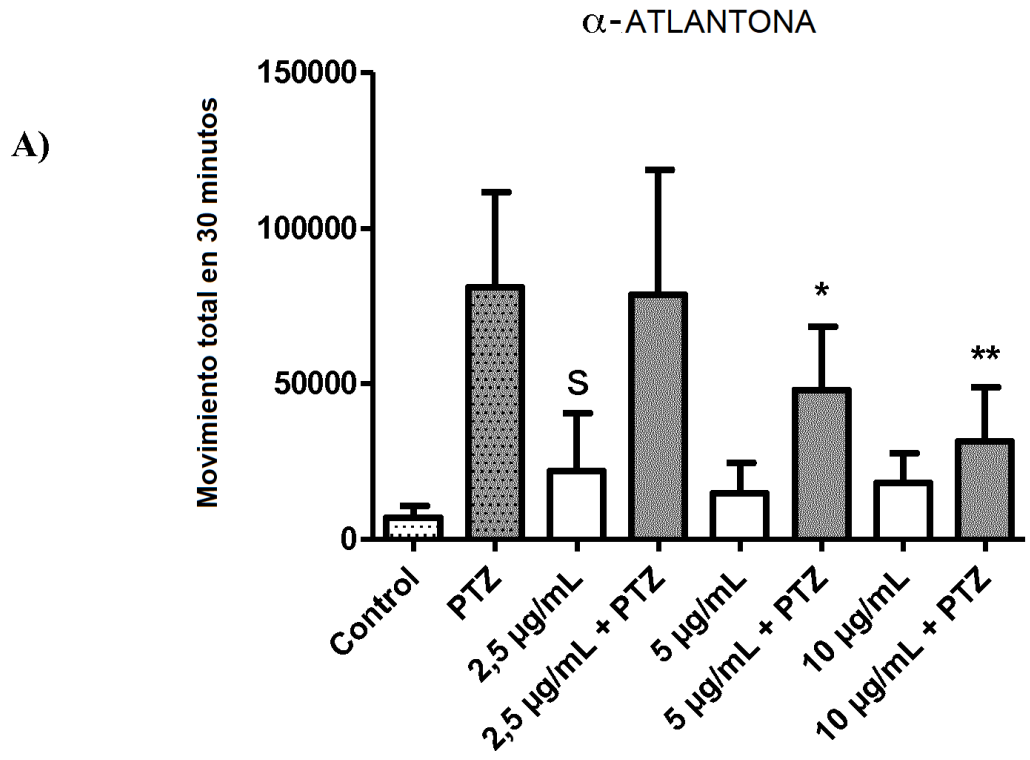


Figura 7 (continuación)

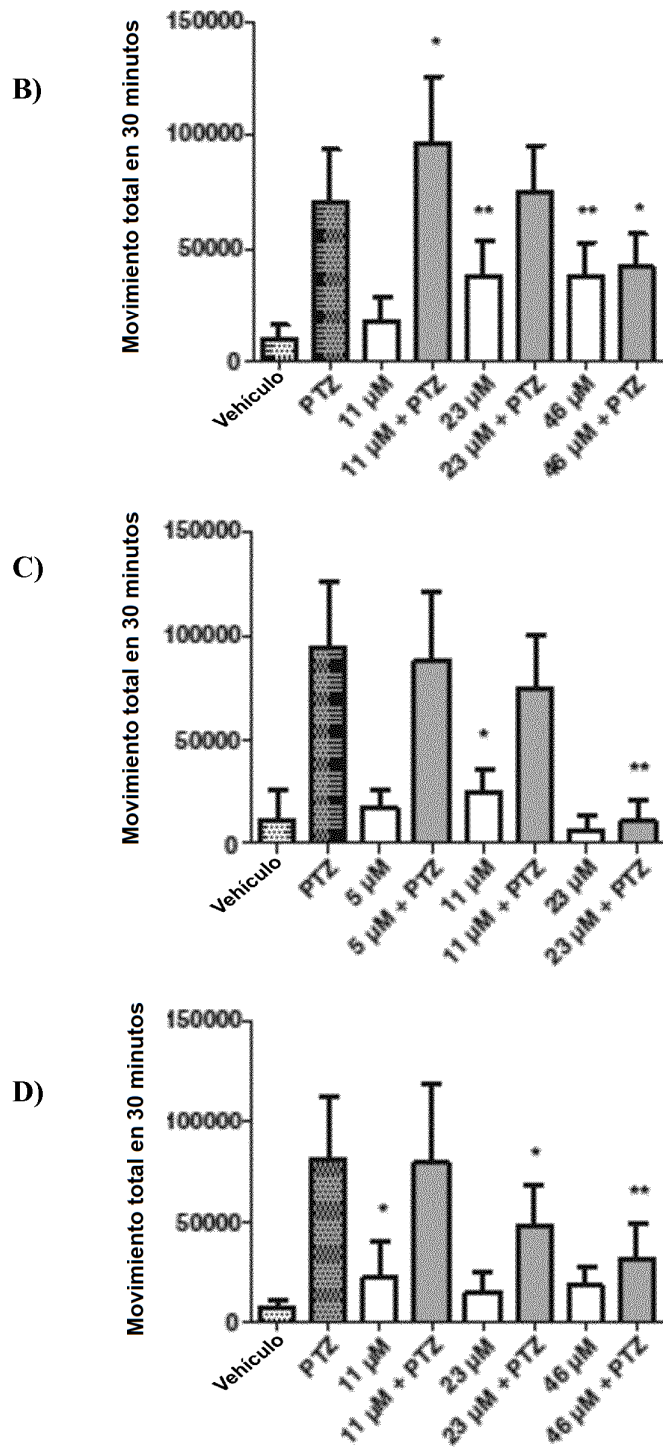
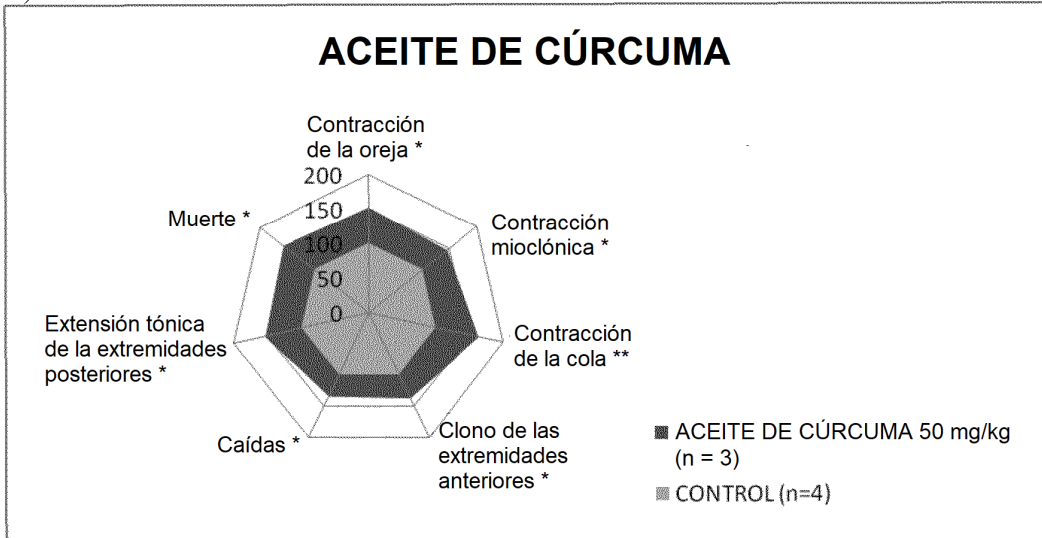


Figura 8

A)



B)

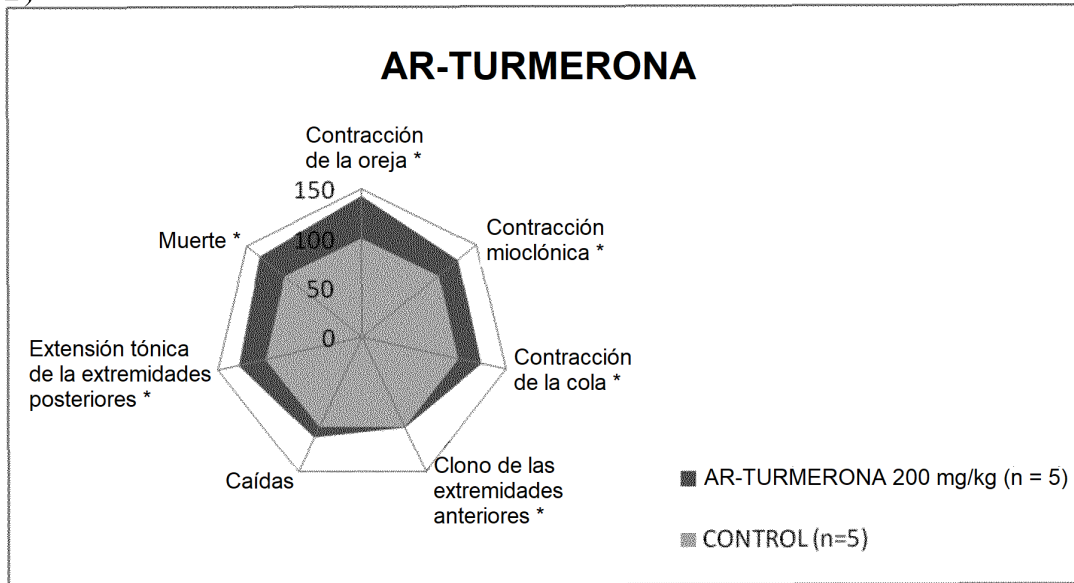


Figura 9

Parámetros de convulsión	Dosis requerida de PTZ para inducir parámetros de convulsión individuales (mg/kg)		
	Control (vehículo) n=5	Aceite de cúrcuma (50 mg/kg) n=5	Aceite de cúrcuma (100 mg/kg) n=5
Contracción de la oreja	47,2 ± 6,3	67,7 ± 12,1	86,7 ± 15,4
Contracción mioclónica	58,9 ± 7,6	90,9 ± 23,4	108,8 ± 19,6
Contracción de la cola	58,9 ± 7,6	90,9 ± 23,4	101,6 ± 8,6
Clono de las ext. anteriores	74,5 ± 15,9	103,0 ± 18,5	147,6 ± 23,5
Caídas	61,8 ± 10,7	86,2 ± 23,8	108,0 ± 20,3
Extensión tónica de las ext. post.	105,6 ± 22,7	157,4 ± 35,8	208,4 ± 26,4
Muerte	128,8 ± 27,1	188,6 ± 36,2	237,8 ± 23,9

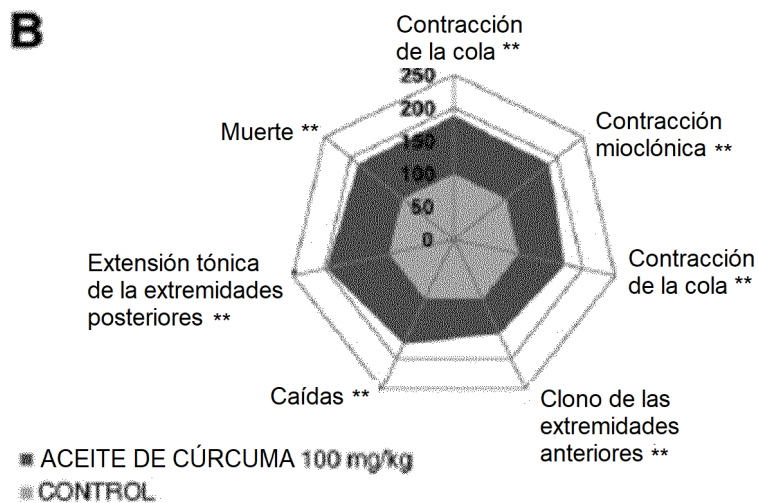
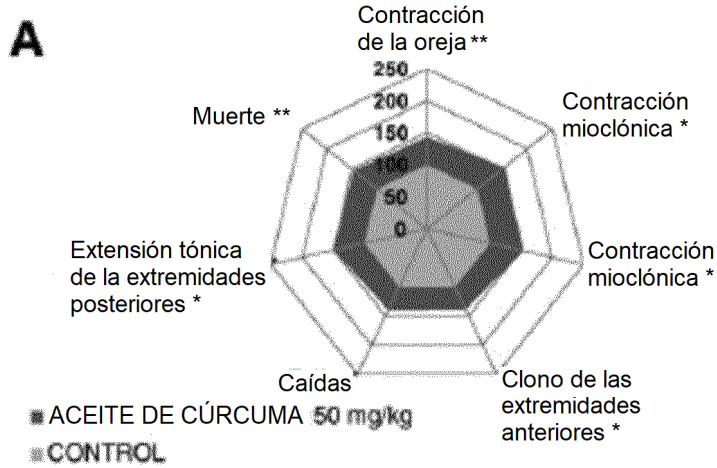


Figura 10

Parámetros de convulsión	Dosis requerida de PTZ para inducir parámetros de convulsión individuales (mg/kg)			
	Control A (vehículo) n=5	AB-turmerona (100 mg/kg) n=5	Control B (vehículo) n=5	Ar-turmerona (50 mg/kg) n=5
Contracción de la oreja	56,7 ± 11,4	98,3 ± 30,7	44,6 ± 11,6	70,5 ± 11,8
Contracción mioclónica	59,0 ± 11,2	112,6 ± 36,2	48,3 ± 11,7	74,1 ± 14,2
Contracción de la cola	58,0 ± 10,3	97,5 ± 30,0	48,3 ± 11,7	73,5 ± 13,9
Clono de las ext. anteriores	89,3 ± 12,1	137,4 ± 35,3	61,5 ± 11,0	121,7 ± 15,4
Caídas	80,6 ± 17,1	140,2 ± 50,7	57,1 ± 15,8	95,5 ± 21,4
Extensión tónica de las ext. post.	98,7 ± 22,5	215,2 ± 36,0	98,7 ± 23,3	131,5 ± 15,3
Muerte	122,1 ± 23,2	226,1 ± 30,2	122,1 ± 20,5	195,6 ± 49,2

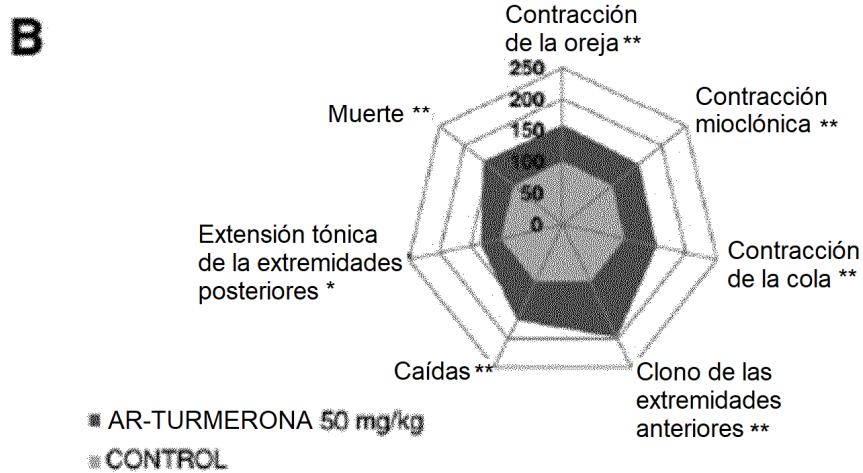
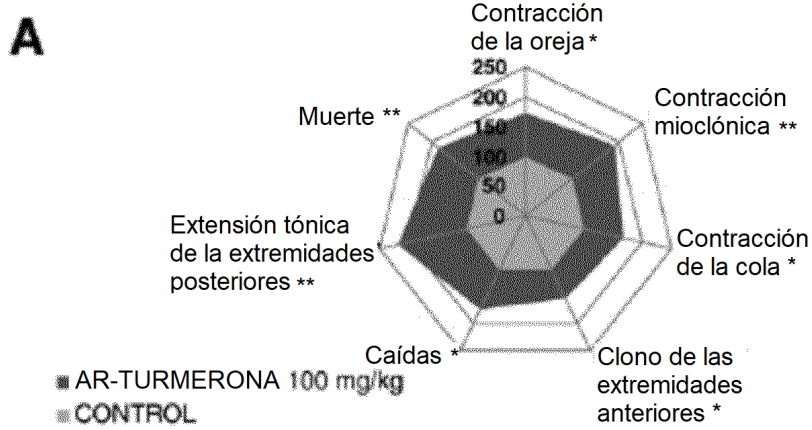
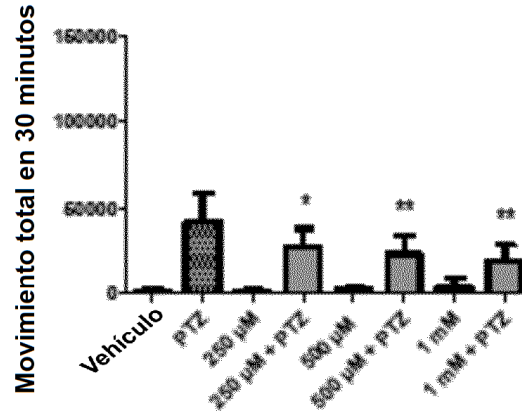


Figura 11

A



B

Parámetros de convulsión	Dosis requerida de PTZ para inducir parámetros de convulsión individuales (mg/kg)	
	Control (vehículo) n = 5	Valproato de sodio (50 mg/kg) n = 5
Contracción de la oreja	56,7 ± 11,4	67,8 ± 23,6
Contracción mioclónica	59,0 ± 11,2	72,2 ± 31,2
Contracción de la cola	58,0 ± 10,3	72,2 ± 31,2
Clono de las ext. anteriores	89,3 ± 12,1	98,1 ± 32,4
Caídas	80,6 ± 17,1	89,7 ± 39,6
Extensión tónica de las ext. post.	98,7 ± 22,5	143,6 ± 27,1
Muerte	122,1 ± 23,2	181,5 ± 33,5

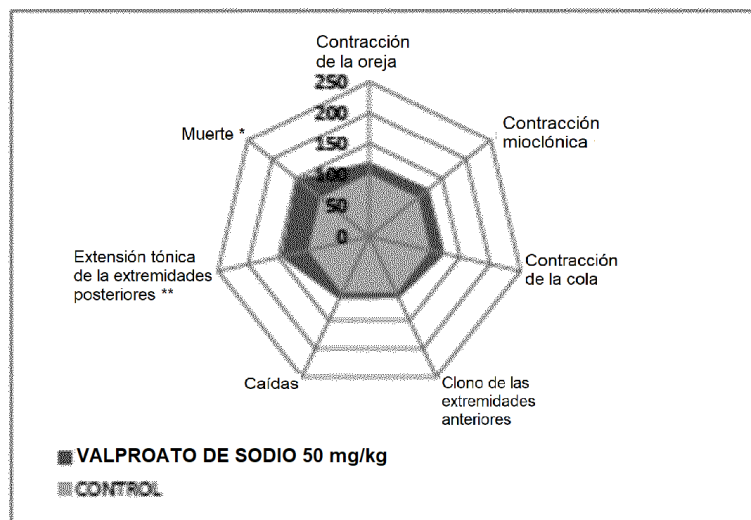


Figura 12

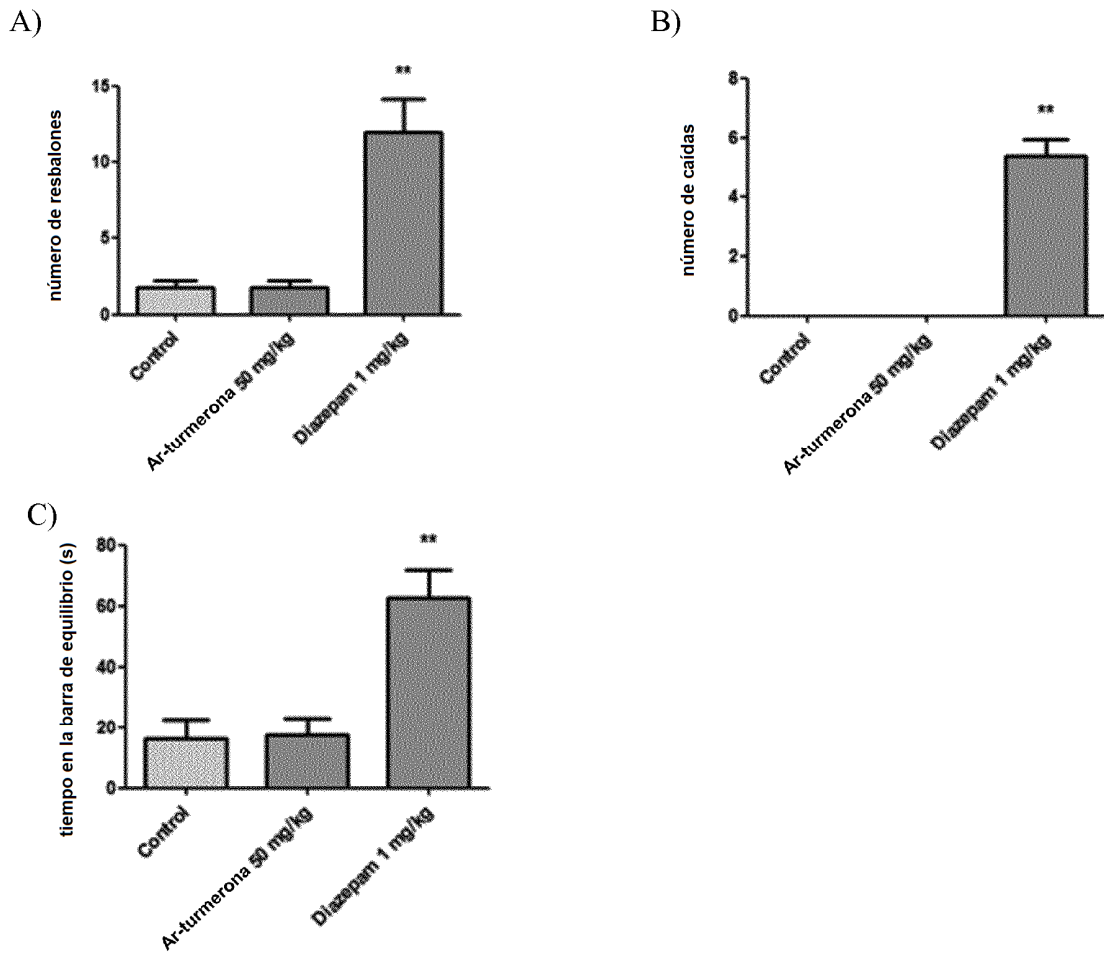


Figura 13

