

**COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE EXTRACTOS DE *GUADUA*
ANGUSTIFOLIA PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES DE LA RETINA**

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

10

La presente invención está relacionada con un nuevo uso de bambú Guaduaque inhibe o mejora la lesión isquémica, protege las células contra el estrés oxidativo e inhibe la apoptosis.

15

ANTECEDENTES

La muerte celular controlada (apoptosis), la muerte celular patológica (necrosis) que es distinta de la apoptosis espontánea y previsto dentro de la apoptosis celular (muerte celular programada), han sido propuestos como mecanismos de muerte celular. El estrés oxidativo, la alteración de la óxido nítrico sintetasa, inducen la alteración de diversos factores que conducen a la apoptosis celular mediada tanto por las mitocondrias (caspasa independiente), como por las caspasas, denominándose apoptosis caspasa-dependiente. Muchas enfermedades de los ojos son causadas por la muerte celular, por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad (Age-related macular degeneration) y el glaucoma. La inhibición de la enfermedad ocular y el tratamiento o supresión de la muerte celular que puede atenuar la progresión de estas enfermedades es el objetivo constante en las investigaciones con medicamentos en la actualidad.

30

La principal causa del glaucoma es el aumento de la presión intraocular (IOP, siglas en inglés), la cual causa lesión isquémica que se produce en la vista y, finalmente, causa la muerte de las células nerviosas. El glaucoma se produce a través del daño en el nervio óptico debido a la apoptosis de las células nerviosas de la retina. Además, en el glaucoma, las células nerviosas de la retina, sufren muerte celular causada por daños en el nervio óptico, produciendo la lesión glaucomatosa, característica que conlleva además del daño al nervio óptico, un daño en el campo visual. En el glaucoma, la apoptosis de las células nerviosas de la retina se conoce como apoptosis y tanto en modelos animales como en

35

pacientes con glaucoma post-mortem se evidencia que la causa es por la presión intraocular elevada. (Quigley HA *et al.*, InvestOphthalmol Vis Sci., 36, 774-786, 1995; Garcia-Valenzuela E *et al.*, ExpEye Res., 61, 33-44, 1995). El destino celular está determinado por el balance entre los mecanismos que inducen la apoptosis celular y los mecanismos que la inhiben. En glaucoma, el aumento o expresión de glutamato, citocromo C, factor de necrosis tumoral - alfa (TNF - α), Bad (promotor de la muerte celular asociada a BCL2) o un aumento en la expresión de proteínas apoptóticas en las células nerviosas de la retina y del estrés oxidativo intracelular son conocidas causas importantes de glaucoma. En el glaucoma, las células nerviosas de la retina bajo estrés oxidativo directo experimentan daños en el nervio óptico, así como en las células del canal compuesto por la red o malla trabecular (estructura del ojo que controla el flujo de líquidos), lo que resulta en el deterioro de las células de la malla trabecular, y finalmente ocurrirá apoptosis celular yaumentará la presión intraocular (Sacca' SC *et al.*, ArchOphthalmol., 123, 458-463, 2005; Zhou L *et al.*, J CellPhysiol., 180, 182-189, 1999). Adicionalmente, se sabe que el deterioro de la función de las células de la malla trabecular causa un aumento de la presión intraocular porque afecta la absorción de agua inherente en las células (pinocitosis). Primordialmente la disminución de la función de las células de la malla trabecular, es conocida como la causa principal del aumento de la presión intraocular (IOP), provocando glaucoma primario de ángulo abierto, y se sabe que pacientes con este tipo de glaucoma son más vulnerables al estrés oxidativo (Izzotti A *et al.*, Am J Med., 114, 638-646, 2003). Como resultado de un análisis del humor acuoso, la capacidad antioxidante total de los pacientes fue significativamente menor comparado con los sujetos normales (Ferreira SM *et al.*, Am J Ophthalmol. 137, 62-69, 2004), observándose además un aumento en la oxidación de la enzima plasmática que ayuda a controlar el estrés oxidativo, la glutatión - S - transferasa (Glutathione - S - transferasa) (Yang J *et al.*, InvestOphthalmol Vis Sci., 42, 1273-1276, 2001). Adicionalmente, es sabido que en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto, los daños en las células de la malla trabecular, parecen ser inhibidos por antioxidantes (Yuan He *et al.*, InvestOphthalmol Vis Sci., 49, 1447-1458, 2008). Por lo tanto, se ha propuesto como nuevo enfoque de investigación la inhibición de la apoptosis en las células nerviosas de la retina y en las células de la malla trabecular y la supresión del estrés oxidativo en estas células.

35

Estado de la técnica previa

Documentos distintos de patentes

1. Quigley HA et al., InvestOphthalmol Vis Sci., 36, 774-786, 1995; Garcia-Valenzuela E et al., ExpEye Res., 61, 33-44, 1995
2. Sacca' SC et al, Arch Ophthalmol., 123, 458-463, 2005; Zhou L et al., J Cell
5 Physiol., 180, 182-189, 1999
3. Izzotti A et al., Am J Med., 114, 638-646, 2003
4. Ferreira SM at al., Am J Ophthalmol. 137, 62-69, 2004)
5. Yang J et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 42, 1273-1276, 2001
6. Yuan He et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 49, 1447-1458, 2008

10

CONTENIDO DE LA INVENCIÓN

Problemas a resolver

- 15 En un aspecto, la presente invención está dirigida a inhibir o mejorar la lesión celular asociada a la isquemia.

En otro aspecto, la presente invención, está dirigida a proteger las células del estrés oxidativo.

20

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a inhibir la apoptosis.

- En otro aspecto, la presente invención tiene por objeto proteger las células oculares, tales como las células nerviosas de la retina o las células de la malla
25 trabecular.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a prevenir, mejorar o tratarla degeneración macular o enfermedades de la retina tales como el glaucoma.

Solución del problema

- En una realización, la presente invención puede ser una composición que comprende un extracto de bambú Guadua como un ingrediente activo para inhibir o mejorar la lesión celular asociada a la isquemia.

35

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición antioxidante que comprende un extracto de bambú Guadua como un ingrediente activo para su uso en la protección celular contra el estrés oxidativo.

En otra realización, la presente invención puede ser una composición que comprende un extracto de bambú Guadua como un ingrediente activo para inhibir la apoptosis.

5

En otra realización, la célula puede ser una célula ocular.

En una realización de la invención, la célula ocular puede ser una célula nerviosa de la retina o una célula de la malla trabecular.

10

En una realización de la invención, la composición puede ser una composición para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad de la retina.

En una realización de la invención, la enfermedad retinal puede ser la degeneración macular asociada a la edad o el glaucoma.

15

En un aspecto, la composición puede ser la composición de un alimento saludable para la prevención o el mejoramiento de enfermedades de la retina, o una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la retina.

20

En un aspecto, el bambú Guadua puede ser *Guadua angustifolia*.

En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede ser un extracto de partes aéreas del bambú Guadua.

25

En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede ser un extracto de hojas de bambú Guadua.

En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede ser un extracto que es obtenido usando como solvente de extracción agua, alcoholes C₁-C₆, acetona, o una mezcla de los mismos.

30

En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede ser un extracto metanólico o etanólico.

35

En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua es preparado como una fracción obtenida por una secuencia de fraccionamiento del extracto de

bambú Guadua, en donde al menos uno de los siguientes solventes: n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, n-butanol se utiliza después de la extracción con metanol o etanol y la suspensión en agua.

- 5 En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede ser una composición que se administra a una dosis diaria de 0,004 a 40 mg/kg.

En una realización de la invención, la composición puede ser en una forma para administración tópica.

10

En una realización de la invención, la composición puede ser en una formulación oftálmica.

- 15 En una realización de la invención, la composición puede ser una solución obtenida disolviendo en un solvente el producto liofilizado del extracto de bambú Guadua.

En una realización de la invención, el solvente que disuelve el liofilizado puede ser dimetilsulfóxido (DMSO).

20

En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede tener una concentración de 5 a 500 µg/ml basado en el peso total de la composición.

- 25 En una realización de la invención, el extracto de bambú Guadua puede tener una concentración de 10 a 250 µg/ml basado en el peso total de la composición.

Efectos de la Invención

- 30 La composición de la presente invención puede inhibir o mejorar el daño isquémico de las células. Adicionalmente, las células pueden ser protegidas del estrés oxidativo. Además, se puede suprimir la apoptosis. Específicamente, la composición de la presente invención es ventajosa que actúa sobre las células oculares tales como las células nerviosas de la retina (células ganglionares de la retina) (RGCs por sus siglas en inglés) y se puede utilizar de manera útil como una
- 35 composición o un alimento funcional o material medicinal para prevenir y tratar enfermedades de la retina tales como la degeneración macular asociada a la edad (AMD, por sus siglas en inglés) y el glaucoma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1a y 1b. Son gráficas que muestran el efecto del extracto, de fracciones y compuestos aislados del bambú *Guadua* sobre la viabilidad celular de células apoptóticas retinales, medido mediante el ensayo de MTT.

Figura 2. Muestra los resultados de las medidas de viabilidad celular usando tinción celular.

Figuras 3a a 3f. Son gráficas que muestran la capacidad de los extractos, fracciones o compuestos aislados del bambú *Guadua* para secuestrar especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Figura 4. Es una fotografía de la medición de la cantidad de PARP clivada que indica el grado de muerte celular, determinado por análisis de Western blot.

Figura 5. Es una fotografía de una retina teñida con fluorescencia después del tratamiento con extracto metanólico de *Guadua angustifolia* en un modelo en rata con lesión por compresión del nervio óptico (ONC, siglas en inglés).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La *Guadua* pertenece a la subfamilia de las gramíneas Bambusoideae del orden de las Poales; es una planta monocotiledónea, es un género neotropical. A continuación se listan algunos ejemplos de especies del género *Guadua* (*Guadua* sp).

Guadua amplexifolia, *Guadua angustifolia*, *Guadua calderoniana*, *Guadua chacoensis*, *Guadua chaparensis*, *Guadua glomerata*, *Guadua incana*, *Guadua latifolia*, *Guadua longifolia*, *Guadua macclurei*, *Guadua macrospiculata*, *Guadua macrostachya*, *Guadua maculosa*, *Guadua magna*, *Guadua paniculata*, *Guadua paraguayana*, *Guadua refracta*, *Guadua sarcocarpa*, *Guadua superba*, *Guadua tagoara*, *Guadua trinii*, *Guadua uncinata*, *Guadua velutina*, *Guadua venezuelae*, *Guadua virgata*, *Guadua weberbaueri*. Por ejemplo, bambú *Guadua* puede ser *Guadua angustifolia*.

La *Guadua angustifolia* es nativa de la selva tropical de la cuenca del río Amazonas y del río Orinoco, se encuentra en áreas de baja montaña a menos de

1.500 metros sobre el nivel del mar pero se ha encontrado hasta los 2500 metros sobre el nivel del mar.

En la presente invención, el término “extracto” se refiere a una sustancia obtenida al extraer una parte de una planta a partir de una planta usando un solvente o similar, e incluye un extracto obtenido añadiendo primero una planta al agua o a un disolvente orgánico, o también incluye a un compuesto obtenido por extracción o fraccionamiento a partir del extracto anterior y el cual es un ingrediente eficaz que exhibe una función. También comprende sustancias sometidas a procesos tales como fermentación, liofilización y similares después de la extracción o el fraccionamiento anterior. Además comprende no extraídos con solventes de extracción pero incluye extraídos con agua y plantas pulverizadas.

El extracto del bambú Guadua en la presente invención se puede producir mediante las siguientes etapas, pero no se limitan a;

- 1) Se realiza extracción de bambú Guadua seco, con un solvente de extracción;
- 2) luego de la etapa 1, se filtra el extracto líquido; y
- Opcionalmente 3) luego de la etapa 2, el extracto filtrado, se concentra a presión reducida para producir el extracto seco; y
- Opcionalmente 4) posteriormente se hace extracción del extracto de la etapa 3 con un solvente orgánico para producir una fracción.

En este método, el bambú Guadua puede ser usado sin limitación ya sea si se cultiva, cosecha o comercializa. La planta entera se puede utilizar para obtener el extracto del bambú Guadua, y se pueden usar hojas, tallos, partes aéreas o raíces, pero no se limita a ellos. Por ejemplo, se pueden usar hojas.

El solvente de extracción puede ser seleccionado entre agua, alcohol, o una mezcla de los mismos, preferiblemente un alcohol de bajo peso molecular C_1 a C_6 , acetona o una mezcla de los mismos. Por ejemplo, se puede extraer con 100% metanol o etanol, pero no está limitado a ellos. Se puede usar una solución acuosa de metanol o etanol. La cantidad de solvente de extracción puede ser de 1 a 30 veces, o 10 - 20 veces el peso seco del bambú Guadua, pero no se limita a ello. El método de extracción puede ser un método de extracción tal como extracción en caliente, extracción por inmersión, extracción en frío, extracción por reflujo y enfriamiento, y extracción por ultrasonido, y puede ser extraído por ejemplo por extracción en frío. Por ejemplo, la extracción en frío se puede repetir dos o más veces. Por ejemplo, es posible repetir dos etapas de extracción en frío. La temperatura de extracción puede ser entre -114°C a

100 °C pero la temperatura no se limita a ellas. El tiempo de extracción puede ser entre 30 min y 7 días. Por ejemplo, entre 1 y 24 horas, o entre 8 a 16 horas pero la presente invención no se limita a ellos.

- 5 Ejemplos de métodos para producir el extracto anterior incluyen métodos que usan dispositivos de extracción tales como una extracción en frío, una extracción supercrítica, una extracción subcrítica, una extracción a alta temperatura, una extracción a alta presión o una extracción por ultrasonido o se puede usar un método que usa una resina de adsorción XAD y HP - 20. El número de veces que
10 se repite la extracción, puede estar entre 1 a 5 veces, pero la presente invención no se limita a ello.

- En el método anterior, la concentración al vacío en la etapa 3, puede ser llevada a cabo utilizando un evaporador rotatorio con vacío, sin estar limitado al mismo.
15 Además, el secado se puede realizar bajo presión reducida, secado al vacío, ebullición, secado por pulverización (espray), secado a temperatura ambiente o por liofilización pero no siempre limitado a los mismos.

- En este proceso, el solvente orgánico en la etapa 4 de fraccionamiento, es
20 preferiblemente pero no limitado a n-hexano, diclorometano, acetato de etilo o n-butanol. Las fracciones fueron preparadas suspendiendo extracto de bambú Guadua en agua y luego fraccionando las fracciones secuencialmente con n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, n-butanol y agua, para obtener la fracción de n-hexano, la fracción de diclorometano, la fracción de acetato de etilo, la
25 fracción de n-butanol, o la fracción acuosa. Por ejemplo, la fracción de acetato de etilo o la fracción de n-hexano, aunque no se limita a ellas. Las fracciones del extracto de bambú Guadua obtenidas en el proceso de fraccionamiento, se repiten de una a cinco veces. Por ejemplo, dos o más veces. Después del fraccionamiento, cada fracción puede ser concentrada bajo presión reducida, pero puede no
30 limitarse a ello.

- En una realización específica de la presente invención, la *Guadua angustifolia* seca fue triturada hasta el tamaño de partícula adecuado y depositada en un recipiente de extracción, luego se añadió metanol (100%) y se dejó reposar a
35 temperatura ambiente. Después se filtró a través de papel de filtro y el filtrado se concentró y se liofilizó. El extracto de *Guadua angustifolia* fue fraccionado secuencialmente realizando extracciones con fracciones de n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, n-butanol y agua usando un embudo de

separación para obtener extracto etanólico de *Guadua angustifolia* y sus fracciones que fueron preparadas de forma separada para obtener la fracción n-hexano, la fracción diclorometano, la fracción acetato de etilo, la fracción n-butanol y la fracción acuosa.

5

La composición que comprende el extracto de bambú *Guadua* de la presente invención, las fracciones separadas del mismo o los compuestos aislados a partir de ellas, pueden ser empleadas en una composición, basado en el peso total del extracto bambú *Guadua*, sus fracciones o sus compuestos aislados, en
10 porcentajes desde el 0,1 hasta el 100% en peso, sin limitarse a los mismos.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender además vehículos, excipientes y diluyentes adecuados convencionalmente usados en la elaboración de medicamentos.

15

Las composiciones de acuerdo con la presente invención, en concordancia con un método convencional pueden ser formuladas en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosoles y otras formas de dosificación oral o para la aplicación externa, también pueden ser
20 formuladas en forma de supositorios y soluciones inyectables estériles. Ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes que pueden ser incluidos en la composición de la presente invención incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina,
25 polivinilpirrolidona, agua, benzoato de metilo, benzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Cuando se formula, se prepara utilizando diluyentes o excipientes tales como los comúnmente usados como relleno, extendedores, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, agentes tenso activos, como los mencionados previamente. Las formulaciones sólidas para la administración oral
30 incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc., Estas preparaciones sólidas de la presente invención pueden tener en su composición al menos uno o más agentes auxiliares tales como almidón y carbonato de calcio y pueden prepararse mezclando sacarosa, lactosa y gelatina o similares. Además de los excipientes simples, también se pueden usar como lubricantes estearato de
35 magnesio y talco. Ejemplos de formulaciones líquidas para administración oral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes, entre otras. Adicionalmente al agua y a la parafina líquida que se usan comúnmente como diluyentes, se pueden usar diversos excipientes como agentes humectantes,

edulcorantes, fragancias, conservantes, etc. Formulaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles, soluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas, y supositorios. Ejemplos de solventes no acuosos y suspensores que se puede utilizar incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva, también ésteres inyectables tales como oleato de etilo y similares. En las bases para supositorios pueden ser utilizados, tepsol (Witepsol) Macrogol, Tween (como tween 61), manteca de cacao, laurina, glicerogelatina y similares.

La composición de la presente invención, dependiendo del método deseado, se puede administrar por vía oral o por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, aplicada tópicamente) y la dosis puede ser ajustada de acuerdo con la condición del paciente, el rango varía dependiendo del peso, edad, género, dieta, tasa de excreción, severidad de la enfermedad, forma de dosificación, tiempo de administración, método de administración, vía de administración y duración del tratamiento. La dosis diaria a administrar, de acuerdo con los extractos, fracciones, o compuestos liofilizados en la presente invención, estarán en una cantidad entre 0,0001 mg/kg a 500 mg/kg, preferiblemente 0,001 mg/kg a 100 mg/kg, o de 0,004 mg/kg a 40 mg/kg en un día, y se pueden administrar según sea necesario, en una única dosis o dividida en varias dosis por día. La dosis puede ser por ejemplo 0,001 mg/kg/día o superior, 0,004 mg/kg/día o superior, 0,01 mg/kg/día o superior, 0,02 mg/kg/día o superior, 0,03 mg/kg/día o superior, 0,04 mg/kg/día o superior, 0,05 mg/kg/día o superior, 0,06 mg/kg/día o superior, 0,07 mg/kg/día o superior, 0,08 mg/kg/día o superior, 0,09 mg/kg/día o superior, 0,1 mg/kg/día o superior, 0,2 mg/kg/día o superior, 0,3 mg/kg/día o superior, 0,4 mg/kg/día pero puede ser mayor. También, la dosis puede ser por ejemplo 40 mg/kg/día o menos, 35 mg/kg/día o menos, 30 mg/kg/día o menos, 25 mg/kg/día o menos, 20 mg/kg/día o menos, 15 mg/kg/día o menos, 10 mg/kg/día o menos, 5 mg/kg/día o menos, 4 mg/kg/día o menos, 3 mg/kg/día o menos, 2 mg/kg/día o menos, 1 mg/kg/día o menos, 0,8 mg/kg/día o menos, 0,6 mg/kg/día o menos, inferior a 0,4 mg/kg/día. Por ejemplo, la dosis puede ser 0,4 mg/kg/día.

En un aspecto, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden contener extracto de bambú Guadua en una concentración de 5 a 500 µg/ml basado en el peso total de la composición. Por ejemplo, 5 µg/ml o superior, 10 µg/ml o superior, 15 µg/ml o superior, 20 µg/ml o superior, 25 µg/ml o superior, 30 µg/ml o superior, 35 µg/ml o superior, 40 µg/ml o superior, 43 µg/ml o superior, 45 µg/ml o superior, o

puede haber más de 48 µg/ml. O, 500 µg/ml o menos, 450 µg/ml o menos, 350 µg/ml o menos, 300 µg/ml o menos, 250 µg/ml o menos, 200 µg/ml o menos, 150 µg/ml o menos, 100 µg/ml o menos, 90 µg/ml o menos, 80 µg/ml o menos, 70 µg/ml o menos, 60 µg/ml o menos, o puede ser menos de 55 µg/ml. Por ejemplo,
5 el extracto de bambú Guadua puede ser incluido en una composición a una concentración de 10 a 250µg/ml, basado en el peso total de la composición. Por ejemplo, la concentración puede ser de aproximadamente 50 µg/ml.

La presente invención también proporciona un medicamento para la prevención y
10 el tratamiento de enfermedades de la retina, el cual contiene como ingrediente activo extracto de bambú Guadua o una fracción del mismo.

El tipo de alimento no está particularmente limitado a alguna clase. Ejemplos de alimentos a los cuales se pueden agregar las sustancias anteriormente
15 mencionadas incluyen productos lácteos, bebidas, carnes, salchichas, pan, galletas, pasteles, chocolates, dulces, snacks, confitería, pizza, pasta, fideos, gomas, helados, sopas, bebidas alcohólicas, complejos vitamínicos y así sucesivamente, incluyendo todo tipo de alimentos saludables en sentido general.

20 El extracto de bambú Guadua de la presente invención, sus fracciones o un compuesto aislado, pueden ser utilizados de acuerdo a los métodos convencionales y adecuadamente añadidos a la comida o mezclados con otros alimentos o ingredientes alimenticios. La cantidad de ingrediente activo a ser mezclado, puede ser regulada de acuerdo a su propósito de uso (prevención o
25 tratamiento).

Generalmente, se puede añadir al alimento funcional, una cantidad del extracto de 0,1 a 90 % en peso del peso total del alimento. Sin embargo, en el caso de ingestión a largo plazo para propósitos de salud e higiene, o para el propósito de control de la salud, la cantidad puede ser menor que la del intervalo anterior, y
30 puesto que no hay problemas en términos de seguridad, se puede utilizar el ingrediente activo en una cantidad mayor que el intervalo anterior.

En la composición funcional de una bebida saludable de acuerdo a la presente invención, no hay ninguna limitación particular sobre otros componentes diferentes
35 a los que contiene el extracto anterior como componentes esenciales en las proporciones indicadas y puede contener varios aromas y sabores o carbohidratos naturales como componentes adicionales tales como los contienen las bebidas ordinarias. Ejemplos de carbohidratos naturales antes mencionados, incluyen

monosacáridos como glucosa, fructosa y similares; disacáridos como maltosa, sacarosa y similares; y polisacáridos como dextrinas, ciclodextrinas y similares, y polialcoholes como xilitol, sorbitol y eritritol. Como agentes aromatizantes distintos de los descritos anteriormente se pueden utilizar ventajosamente saborizantes y aromatizantes naturales como extractos de taumatina y estevia (por ejemplo, Rebaudiósido A, glicirrina, etc.). y agentes edulcorantes sintéticos, como la sacarina, aspartame, etc. La proporción de carbohidratos naturales en la presente invención puede ser típicamente alrededor de 1 a 400 mg por cada 100 ml. Por ejemplo de 10 a 40 mg. Sus contenidos se determinan de acuerdo al rango de dosis apropiado de extracto de bambú Guadua. En la presente invención, la dosis diaria de administración de extracto, fracciones o compuestos liofilizados es una cantidad que puede estar en el rango de 0,0001 mg/kg a 500 mg/kg, preferiblemente de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg, o de 0,004 a 40 mg/kg/día, y puede ser administrada una o varias veces por día, según sea necesario pero la presente invención no se limita a ello. La dosis puede ser por ejemplo 0,001 mg/kg/día o superior, 0,004 mg/kg/día o superior, 0,01 mg/kg/día o superior, 0,02 mg/kg/día o superior, 0,03 mg/kg/día o superior, 0,04 mg/kg/día o superior, 0,05 mg/kg/día o superior, 0,06 mg/kg/día o superior, 0,07 mg/kg/día o superior, 0,08 mg/kg/día o superior, 0,09 mg/kg/día o superior, 0,1 mg/kg/día o superior, 0,1 mg/kg/día o superior, 0,2 mg/kg/día o superior, 0,3 mg/kg/día o superior, puede ser mayor de 0,4 mg/kg/día. También la dosis puede ser por ejemplo, 40 mg/kg/día o menos, 35 mg/kg/día o menos, 30 mg/kg/día o menos, 25 mg/kg/día o menos, 20 mg/kg/día o menos, 15 mg/kg/día o menos, 10 mg/kg/día o menos, 5 mg/kg/día o menos, 4 mg/kg/día o menos, 3 mg/kg/día o menos, 2 mg/kg/día o menos, 1 mg/kg/día o menos, 0,8 mg/kg/día o menos, 0,6 mg/kg/día o menos, inferior a 0,4 mg/kg/día. Por ejemplo, la dosis puede ser 0,4 mg/kg/día.

En adición a lo anterior, el extracto de bambú Guadua, sus fracciones, o los compuestos aislados a partir de ellas en la presente invención, pueden ser adicionadas con diversos compuestos nutricionales, vitaminas y minerales (electrolitos), sabores sintéticos, sabores naturales, etc., colorantes, agentes coagulantes (queso, chocolate, etc.), ácido péptico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, agentes de ajuste de pH, estabilizadores, conservantes, glicerina, alcoholes y bebidas carbonatadas. Adicionalmente, el extracto de bambú Guadua, sus fracciones, o los compuestos aislados a partir de ellas de la presente invención, puede estar contenido en un jugo natural de frutas y pulpa vegetal, para la elaboración de bebidas de zumos de frutas y bebidas vegetales. Estos componentes se pueden

utilizar de forma independiente o en combinación. La proporción de estos aditivos de la presente invención, no es tan importante aunque se selecciona generalmente en el rango de 0,1 a 20 partes por peso por cada 100 partes por peso de extracto de bambú *Guadua* o de alguna de las fracciones.

5

EJEMPLOS

10 A continuación, la presente invención será descrita en detalle con referencia a ejemplos, ejemplos experimentales y ejemplos de producción. Los siguientes ejemplos, ejemplos experimentales, y ejemplos de preparación son simplemente ilustrativos de la presente invención, y el contenido de la presente invención no está limitado por ejemplos, ejemplos experimentales ni ejemplos de producción.

15

Ejemplo 1 Preparación del extracto de *Guadua angustifolia*

Las hojas de *Guadua angustifolia* fueron recolectadas en Colombia. Fueron secadas y luego fueron cortadas en pequeñas piezas. Se adicionaron 2,5 L de metanol (100%) por cada 100 g de material vegetal, seguido por una extracción en frío durante 12 horas, luego de las cuales el extracto se filtró. El extracto filtrado se separó y al residuo remanente se le adicionaron 2 L de metanol para extracción en frío por otras 12 horas, este procedimiento se repitió nuevamente una vez para obtener 5,5 L de extracto total. Los 5,5 L del extracto anterior se concentraron bajo presión reducida y a 35°C para obtener 8 g de extracto metanólico sólido. El extracto de *Guadua angustifolia* fue re-suspendido en agua, adicionado en un embudo de separación y fraccionado secuencialmente con n-hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo, n-butanol y adicionalmente también se obtuvo la fracción acuosa. Como resultado de cada fracción se obtuvieron de n-hexano (0,94 g), la fracción de acetato de etilo (1,74 g), la fracción de n-butanol (1,86 g) y la fracción acuosa (2,2 g). Cada fracción de extracto fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego fue usado en los experimentos.

35

Ejemplo 2 Separación de compuestos a partir del extracto de *Guadua angustifolia*

Dos compuestos (compuesto A y compuesto B) se aislaron de las fracciones de diclorometano extraídas y fraccionadas de la misma manera como se describió

anteriormente en el Ejemplo 1. Compuestos similares o iguales a estos compuestos se pueden encontrar en otras especies de *Guadua*.

Se llevaron a cabo experimentos usando extractos, fracciones o compuestos del Ejemplo 1 o del Ejemplo 2 como se describe a continuación.

Método experimental

Cultivo celular RGC-5

10

Las células de la retina(células ganglionares de retina, RGC, Alcone, USA) RGC-5 fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco'smodified Eagle (DMEM, Hyclone, USA.) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS por su siglas en inglés) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células RGC-5 fueron cultivadas en un frasco de cultivos T-75 a 37°C en un termostato y en una atmósfera modificada conteniendo 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación. Después de 2 o 3 días, las células crecidas en saturación fueron removidas del frasco con solución de tripsina-EDTA y fueron subcultivadas.

20 Medicación

Las células se sembraron en platos de 96 pozos y fueron incubadas durante 24 horas en una incubadora. Después de remover el medio, las células fueron lavadas con medio DMEM que contenía 1% de suero fetal bovino a una concentración del 1% con el fin de descartar el efecto antioxidante de las proteínas del suero. A los cultivos se adicionan los extractos, fracciones o compuestos a concentraciones finales de 50, 10, 1, 0,1µg/ml y se permite el pretratamiento durante una hora, posteriormente se les adiciona 0,5 mM de L-butionina-(S, R)-sulfoximina (conocida como BSO) y 10 mM de ácido L-glutámico (glutamato) y finalmente los cultivos son mantenidos a 37°C por 24 h y después de transcurrido el tiempo, se realizó cada medición.

Ejemplo experimental 1. Medición del efecto protector de los extractos de *Guadua angustifolia* en las células nerviosas de la retina (RGC-5).

Se indujo la muerte de células nerviosas de la retina (células ganglionares de retina, RGC) RGC-5 con BSO (L-butionina-(S, R)-sulfoximina) más glutamato, y

los extractos de *Guadua angustifolia* inhiben la apoptosis medida por el método MTT. Específicamente, las células RGC-5 fueron tratadas con 0,5mM de BSO y 10 mM de glutamato para inducir la apoptosis. Luego la fracción de hexano, la fracción de diclorometano, la fracción de acetato de etilo y la fracción de butanol de *Guadua angustifolia* del Ejemplo 1 fueron administradas a concentraciones de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml respectivamente. Adicionalmente, un compuesto del Ejemplo 2 fue administrado de la misma manera a una concentración de 50 µg/ml. La viabilidad celular se evaluó posteriormente usando el ensayo de MTT.

El ensayo MTT usa MTT como una sal de tetrazolio convertida a cristales de formazán por la dehidrogenasa mitocondrial, es un tipo de ensayo colorimétrico comúnmente utilizado para evaluar la viabilidad y citotoxicidad celular. El medio de las células a evaluar fue removido y fue añadido a cada pozo MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) con una concentración de 0,5 mg/ml y se dejó transcurrir la reacción durante una hora. Los cristales de formazán formados en las células intactas fueron solubilizados adicionando 100 µl de dimetilsulfóxido a cada pozo y agitando durante 15 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Synergy HT Multi-microplate reader (Bio-Tek instruments, Winooski, VT, U.S.A).

Los resultados se muestran en la Figura 1a y 1b. En las gráficas de la Figura 1a y 1b, la segunda barra es el resultado de las células tratadas con BSO más glutamato. Como se muestra en la Figura 1, entre las fracciones obtenidas por la adición de diversos solventes orgánicos como hexano (fr.Hex.), diclorometano (fr. DC), acetato de etilo (fr.EtO Ac.) fue confirmado que los ensayos tratados con los extractos tenían un efecto de protección frente a la muerte celular.

Ejemplo experimental 2. Medición de la viabilidad celular por tinción celular.

Cuando se indujo la muerte de células nerviosas de la retina (células ganglionares de retina, RGC) RGC-5 con BSO (L-butionina-(S, R)-sulfoximina) más glutamato, se confirmó la tasa de supervivencia celular al utilizar los extractos de *Guadua angustifolia* del Ejemplo 1 usando un método de tinción celular. Hoechst 33342 es un colorante permeable a la membrana celular capaz de teñir todas las células, y PI (yoduro de propidio, PI) es un colorante que no es capaz de teñir células vivas,

pero tiene la característica de poder teñir células muertas. La viabilidad celular fue confirmada cualitativamente usando colorantes con tales características.

5 Con el fin de determinar si los compuestos aislados protegían la apoptosis las células fueron analizadas por doble tinción con Hoechst 33342/yoduro de propidio (PI). Las células fueron sembradas en platos de cultivo de 96 pozos y se adhirieron. El medio de cultivo fue remplazado por suero fetal bovino al 1% (FBS por sus siglas en inglés) y se hizo un pretratamiento con los compuestos durante 1 hora, posteriormente se les adiciona 0,5 mM de L-butionina-(S, R)-sulfoximina
10 (BSO) y 10 mM de ácido L-glutámico (glutamato) y los cultivos son mantenidos bajo esta exposición durante 24 h.

Las células se lavaron posteriormente con D-PBS frío y se les adicionó Hoechst 33342 a una concentración final de 8 μ M y 1,5 μ M de PI, se dejó transcurrir la
15 doble tinción durante 15 minutos a 37°C y posteriormente se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia.

Los resultados se muestran en la Figura 2. En el grupo BSO+Glutamato (0,5 mMBSO y 10 mM glutamato) que causa la muerte celular, se observó una gran
20 cantidad de células PI positivas. Por otra parte, los tratamientos con fracciones de bambú *Guadua* de hexano de acuerdo con el Ejemplo 1 mostraron que se redujeron las células PI positivas en una forma dependiente de concentración.

Por lo tanto se pudo confirmar que el extracto de bambú *Guadua* tiene un efecto
25 inhibitorio sobre la muerte celular.

Ejemplo experimental 3. Medición del efecto inhibitorio de las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).

30 Cuando se les aumentó las especies reactivas de oxígeno a células RGC-5 (células ganglionares de retina, RGC) la fracción de *Guadua angustifolia* del Ejemplo 1 fue medida por el método DCFH-DA para determinar si los compuestos del Ejemplo 2 suprimen especies reactivas de oxígeno.

35 La generación de especies reactivas de oxígeno fue iniciada por la adición de 2',7'-diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA, Sigma, USA) y fue investigada por el método diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) en el cual, este compuesto no

fluorescente entra a las células y es oxidado por las especies reactivas de oxígeno para formar diclorofluoresceína fluorescente (DCF). Las células fueron cultivadas en platos de cultivo de 96 pozos a una concentración de $5,0 \times 10^3$ células/pozo y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células fueron tratadas con DMEM suplementado con 1% de suero fetal bovino (FBS) por una hora y tratadas con 10 μM de DCFH-DA por 15 minutos. El medio fue removido y cada una de las especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) fue generada con la adición de H_2O_2 a 1 mM (radical H_2O_2), H_2O_2 a 1 mM más perclorato de hierro (II) hexahidratado a $100 \mu\text{M}$ (radical $\cdot\text{OH}$) o KO_2 a 1 mM (radical $\text{O}_2^{\cdot-}$), la exposición transcurrió durante 30 minutos y la fluorescencia de la diclorofluoresceína (DFC) oxidada fue medida a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm. Se utilizó una de las fracciones del Ejemplo 1, la fracción de acetato de etilo, a una concentración de $50 \mu\text{g/ml}$. Para las células RGC-5 usadas, la fracción de acetato de etilo utilizada fue previamente tratada con BSO+Glutamato (0,5 mM BSO y 10 mM glutamato). Posteriormente se midieron las especies reactivas de oxígeno H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{OH}$. Como control positivo fue usado EGCG a una concentración de 50 mM porque es sabido que tiene actividad antioxidante. Los resultados se muestran en las Figuras 3a a 3f. La primera barra es un control negativo sin ningún tratamiento, la segunda barra fue tratada con BSO+Glutamato (0,5 mM BSO y 10 mM glutamato), la tercera barra es el grupo pretratado con la fracción de acetato de etilo del Ejemplo 1 y luego tratado con BSO+Glutamato (0,5 mM BSO y 10 mM glutamato). Tal y como se observa en las Figuras 3a a 3f, las fracciones y los compuestos de bambú mostraron efecto secuestrante de las especies reactivas de oxígeno.

Ejemplo experimental 4. Medición de la actividad de PARP, una proteína asociada con la apoptosis celular.

Se indujo la muerte de células nerviosas de la retina (células ganglionares de retina, RGC) RGC-5 con BSO (L-butionina-(S, R)-sulfoximina) más glutamato, y se utilizó análisis de Western Blot para examinar el efecto del extracto de *Guadua angustifolia* del Ejemplo 1 sobre la actividad de PARP, una proteína asociada con la muerte celular.

Solución de DMEM / 10% FBS fue mezclada con solución de cultivo celular de células ganglionares de la retina para preparar células a una concentración de

1x10⁵ células/ml, que luego fueron sembradas (5 ml) en placas de 60mm que fueron colocadas a 5% de CO₂ y 37°C. Después de que las células fueron estabilizadas, fueron pretratadas con las muestras por una hora, y posteriormente tratadas con 0,5 mM de L-butionina-(S, R)-sulfoximina (BSO) y 10 mM de ácido L-glutámico (glutamato) por 18 horas. Las células fueron obtenidas después de 3 lavados con D-PBS frío (1X, pH 7,4). Las células fueron lisadas en un buffer de lisis celular [Tris 1M pH 7,4, 2M NaCl, 1M EDTA, 10% NP40, coctel inhibidor de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)], y las proteínas fueron extraídas por centrifugación a 4°C, 10000g durante 30 minutos. Las concentraciones de proteína se cuantificaron usando métodos analíticos con el ensayo de proteínas Bio-Rad y con búfer de muestra 4X [200 mM Tris-HCl(pH 6,8), 40% glicerol, 8% SDS, 400 mM DTT, 0,4% azul de bromofenol], se mezcló en una proporción 1:4, luego se hirvieron por 5 minutos y se corrieron electroforesis SDS-PAGE usando 10% o 12% de gel de poliacrilamida. Después de la electroforesis, las proteínas del gel de PAGE fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Hybond-P; Amersham Biosciences, GE Healthcare, Reino Unido) y fueron teñidas con Ponceau S (Sigma, St. Louis, USA) y la misma cantidad de proteínas se corrió por electroforesis para confirmar que la transferencia fue buena. Las membranas fueron lavadas con buffer PBST (8g/L NaCl, 0,2g/L KCl, 1,44g/L NaH₂PO₄, 0,1% Tween-20), después, para realizar el bloqueofueron incubadas con 5% de leche desnatada disuelta en buffer PBST durante una hora y 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron reaccionar con anticuerpo anti-PARP obtenido en conejo (catálogo no. 9542; CellSignaling) a una dilución 1:500 durante una hora a temperatura ambiente y reaccionaron a 4°C durante toda la noche. Después del tratamiento con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 15 minutos cada vez y luego reaccionaron durante 2 horas con un anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, CA) a una dilución de 1:3000. La cantidad de proteína expresada fue medida por densitometría utilizando un lector de imágenes LAS-4000 y el software Multi Gauge 3.1 (FujiPhoto Film, Japón).

Cuando ocurre muerte celular, se genera una forma clivada de PARP, PARPclivada, el tratamiento con BSO+Glutamato (0,5 mM BSO y 10 mM glutamato) genera una actividad aumentada de PARPclivada. Se confirmó que la actividad de PARPclivada fue inhibida con una concentración de 10 µg/mL de la fracción de hexano del bambú Guadua del Ejemplo 1. Los resultados son mostrados en la Figura 4.

Ejemplo experimental 5. Efecto protector del extracto de *Guadua angustifolia* sobre el daño retinal inducido en ratas, usando el modelo de compresión del nervio óptico

- 5 El efecto protector del extracto metanólico extraído en el Ejemplo 1, sobre el daño retinal inducido en ratas, fue comprobado usando el modelo de lesión por compresión del nervio óptico. En primer lugar, se prepararon ratones ICR (machos 15-18 g, 6 semanas de edad). Los ratones fueron anestesiados con una inyección intramuscular con 2% de una mezcla de Zoletil y Rompun a una
- 10 concentración de 1ml/Kg de peso corporal, la conjuntiva es abierta y el tejido subconjuntival fue removido para exponer el nervio óptico entre los músculos del recto posterior. Usando fórceps, el nervio óptico fue comprimido durante 5 segundos a una distancia de 2 mm a partir de la parte posterior del ojo del ratón. El extracto de *Guadua angustifolia* del Ejemplo 1, fue administrado por una vez,
- 15 con una inyección en la cámara posterior del ojo a una dosis de 4 µg por ojo. En el grupo control, fue inyectado el mismo volumen de PBS 0,01 M. Después de 6 días de daño en el nervio óptico, los ratones fueron anestesiados nuevamente y se les hace una incisión en el cuero cabelludo. Con el fin de teñir las células del nervio óptico que siguen vivas, se utilizó un taladro quirúrgico para perforar la
- 20 parte posterior del cráneo conectada al nervio óptico y se inyectó FluoroGoldal 3%. La incisión fue suturada y se aplicó un ungüento antibiótico para prevenir la infección. Después de 12 días de daño en el nervio óptico, los glóbulos oculares fueron extraídos y fijados durante 4 horas en 4% de para-formaldehído. En los glóbulos oculares fijados, la retina fue separada del corioide y se le realizaron 4
- 25 incisiones radiales, posteriormente fue montada sobre un portaobjetos en una forma de hoja de trébol. Cada portaobjetos del grupo de prueba fue examinado por microscopía de fluorescencia, las células del nervio óptico fueron examinadas y fotografiadas a 40X y 200X.
- 30 Como resultado, se confirma que la presión sobre el nervio óptico induce muerte celular y la tasa de supervivencia celular disminuye. Cuando fue administrado extracto de *Guadua angustifolia*, fue confirmado que significativamente se protegió de la muerte a las células de la retina y que se aumentó la viabilidad celular(Figura 5).