

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 345**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/105** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2011 PCT/US2011/067229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12088519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2011 E 11808119 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2654461**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos metabólicos**

30 Prioridad:

**23.12.2010 US 201061426957 P**

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

**10.07.2018**

73 Titular/es:

**AMAZENTIS SA (100.0%)  
EPFL Innovation Park Bâtiment C  
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**ANDREUX, PENELOPE;  
SCHNEIDER, BERNARD;  
RINSCH, CHRISTOPHER, L.;  
SANDI, CARMEN;  
AUWERX, JOHAN;  
PIRINEN, EIJA;  
THOMAS, CHARLES;  
HOUTKOOPER, RICHARDUS;  
BLANCO-BOSE, WILLIAM;  
MOUCHIROUD, LAURENT y  
GENOUX, DAVID**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 675 345 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos metabólicos

## 5 Antecedentes de la invención

Los elagitaninos son polifenoles monoméricos, oligoméricos y poliméricos que son abundantes en algunas frutas, bayas y frutos secos, tales como granadas, frambuesas, fresas, frambuesas negras, nueces y almendras. Las frutas y bayas se consumen ampliamente frescas y como bebidas, tales como zumo, y se ha indicado que estos mejoran la salud.

En métodos de procesamiento de zumos de frutas comerciales, los elagitaninos, que son particularmente abundantes en algunas pieles de frutas, se extraen en grandes cantidades en el zumo. Los elagitaninos pertenecen a la clase química de taninos hidrolizables, que liberan ácido elágico tras su hidrólisis. Los estudios *in vitro* han sugerido que los elagitaninos, a concentraciones en el intervalo de 10-100 micromolar ( $\mu\text{M}$ ), tienen efectos antioxidantes, antiaterógenos, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiangiogénicos potenciales. Las frutas pueden tener diferentes elagitaninos que son predominantes, por ejemplo, en el zumo de frutas preparado con granada, el elagitanino predominante es punicalagina [2,3 hexahidroxidifenol-4,6-galagilglucosa], que aparece como una mezcla de isómeros. Las potentes propiedades antioxidantes indicadas del zumo de granada se han atribuido al alto contenido de isómeros de punicalagina, que pueden alcanzar niveles  $>2$  g/l de zumo. Los elagitaninos también se han identificado como los compuestos antiaterógenos activos en el zumo de granada. También se ha sugerido que los elagitaninos de granada y extractos completos de granada inhiben la proliferación de células cancerosas humanas y modulan las rutas de señalización subcelular inflamatorias y la apoptosis. Véase, por ejemplo, Seeram *et al.* (2005) *J Nutr Biochem.* 16:360-7; Adams *et al.* (2006) *J Agric Food Chem.* 54:980-85; Afaq *et al.* (2005) *Photochem Photobiol.* 81:38-45; Afaq *et al.* (2005) *Int J Cancer.* 113:423-33. También se ha indicado que el extracto de zumo de granada reduce el crecimiento de tumor de próstata y los niveles de antígeno de suero prostático (PSA) en ratones desnudos atímicos en los que se han implantado células prostáticas CWR22Rv1. Malik *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci.* 102:14813-8.

Desafortunadamente, en su mayor parte los elagitaninos son poco absorbidos por el intestino humano. Sin embargo, varios metabolitos derivados de elagitaninos son absorbidos por el intestino humano, incluyendo determinados metabolitos formados en última instancia en el intestino por microorganismos comensales (es decir, microflora intestinal).

Los elagitaninos liberan ácido elágico en condiciones fisiológicas *in vivo* y el ácido elágico es metabolizado después gradualmente por la microflora intestinal en el intestino para producir urolitina D, urolitina C, urolitina A (UA) y urolitina B (UB). Una vez que se han absorbido los metabolitos, experimentan glucuronidación y, una vez en el hígado, se metabolizan adicionalmente para producir glucurónidos y/o sulfatos, para proporcionar una combinación de metabolitos secretados en la bilis.

Las urolitinas son metabolitos de ácido elágico, punicalagina (PA), punicalina (PB), telimagrandina (TL), y otros elagitaninos (Cerde, Espin *et al.* 2004; Cerde, Periago *et al.* 2005). El ácido elágico (AE) es abundante en el zumo de granada (Gil, Tomas-Barberan *et al.* 2000). El elagitanino telimagrandina (TL) se ha aislado previamente y se ha caracterizado antes de la granada y otras plantas (Tanaka, Nonaka *et al.* 1986; Tanaka, Nonaka *et al.* 1986; Satomi, Umemura *et al.* 1993). Se presentan fórmulas estructurales para UA, PA, PB, AE en la FIG. 1.

Se han realizado esfuerzos considerables para entender el mecanismo de los trastornos metabólicos, la neurodegeneración y el deterioro cognitivo, para diseñar mejor las modalidades de tratamiento incluyendo las basadas en productos naturales. Una de las observaciones clave ha sido que el papel de la reducción de la producción de energía mitocondrial, correspondiente al aumento de la tensión oxidativa y la apoptosis, desempeña un papel significativo en enfermedades degenerativas y el proceso de envejecimiento. Se ha mostrado ahora que una diversidad de enfermedades degenerativas está provocada por mutaciones en genes mitocondriales codificados por el ADN mitocondrial (ADNmt) o el ADN nuclear (ADNn). Es importante destacar que, las mutaciones somáticas del ADNmt se acumulan con la edad en tejidos postmitóticos en asociación con el deterioro relacionado con la edad en la función mitocondrial y se cree que son un factor importante en el envejecimiento y la senescencia. Las enfermedades hereditarias pueden resultar de mutaciones de sustitución y reordenación de bases de ADNmt y pueden afectar al SNC, músculo cardíaco y esquelético, y sistemas renal, endocrino y hematológico.

Las mitocondrias generan la mayor parte de la energía celular por fosforilación oxidativa (OXFOS) y producen la mayor parte de las especies de oxígeno reactivas (EOR) como un producto secundario. Los defectos genéticos que inhiben OXFOS también provocan la redirección de electrones de OXFOS a la producción de EOR, aumentando de este modo la tensión oxidativa. Una reducción de la producción de energía mitocondrial y un aumento de la tensión oxidativa pueden afectar al poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPmt) para iniciar la muerte celular programada (apoptosis). Se cree que la interacción de estos tres factores desempeña un papel importante en la patofisiología de enfermedades degenerativas y el proceso de envejecimiento, que afecta a todos los tejidos del cuerpo.

En el cerebro normal, la función cognitiva óptima se basa principalmente en la actividad y comunicación entre neuronas, células muy complejas capaces de transmitir señales eléctricas e inducir neurotransmisión química. La función neuronal depende de prolongaciones celulares largas y complejas que pueden extenderse sobre centímetros o incluso metros para conectar neuronas o células diana y pueden realizar más de 100.000 contactos sinápticos. Por tanto, las neuronas dependen en gran medida del aporte de energía y, por lo tanto, se exponen a daño por tensión oxidativa. La función cognitiva depende de un equilibrio delicado de la señalización intracelular que tiene lugar dentro de una red compleja de neuronas. La función cognitiva óptima puede verse alterada por numerosos factores tales como el envejecimiento, la tensión celular, el estrés crónico y los trastornos neurodegenerativos. El deterioro cognitivo puede caracterizarse por una reducción del rendimiento en el pensamiento, el aprendizaje, la memoria, la atención y/o habilidades psicológicas alteradas, así como por depresión y ansiedad.

También se ha mostrado que la función mitocondrial es importante en trastornos metabólicos. La diabetes y la obesidad se han correlacionado con afectaciones de la función mitocondrial. Se ha sugerido que la eficacia de acoplamiento en mitocondrias o la proporción de consumo de oxígeno necesaria para fabricar ATP, está relacionada con niveles de obesidad, dando posiblemente la alta eficacia de acoplamiento como resultado mayor deposición de depósitos lipídicos (Harper, Green *et al.* 2008). En diabetes, trabajos recientes han sugerido que la disfunción mitocondrial es una causa de insensibilidad a insulina en miocitos y adipocitos, como resultado del aporte de energía insuficiente o defectos en la ruta de señalización de insulina (Wang, Wang *et al.* 2010).

#### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral que comprende una cantidad eficaz de una urolitina: para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.

En otro aspecto, la invención también proporciona una urolitina para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.

En otro aspecto, la invención también proporciona el uso de una urolitina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.

En otro aspecto, la invención también proporciona una composición que comprende una urolitina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.

Se desvelan en el presente documento composiciones que comprenden compuestos que pueden usarse para una diversidad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastornos relacionados con actividad mitocondrial reducida o inadecuada, incluyendo envejecimiento o estrés, diabetes, obesidad y enfermedades neurodegenerativas. Estos mismos compuestos y composiciones también pueden usarse provechosamente en individuos en general sanos para aumentar o mantener la tasa metabólica, reducir el porcentaje de grasa corporal, aumentar o mantener la masa muscular, controlar el peso corporal, mejorar o mantener el rendimiento mental (incluyendo la memoria), mejorar o mantener el rendimiento muscular, mejorar o mantener el estado de ánimo y controlar el estrés.

También se desvela en el presente documento un extracto vegetal, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos o metabolitos que pueden aislarse del mismo o sintetizarse, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una patología iniciada o caracterizada (i) por actividad mitocondrial inadecuada; (ii) por trastornos metabólicos tales como diabetes y obesidad; (iii) por un deterioro de la función cognitiva; o (iv) por alteraciones anímicas.

En consecuencia, también se desvela en el presente documento un extracto de fruta, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos que pueden aislarse del mismo, para su uso como un inductor de la función mitocondrial.

Como se usa en el presente documento, el término "fracción" se refiere a extractos purificados o parcialmente purificados.

También se desvela en el presente documento un extracto de fruta, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos que pueden aislarse del mismo, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una patología iniciada o caracterizada por función mitocondrial reducida.

5 También se desvela en el presente documento el uso de una fruta o un extracto, o fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos que pueden aislarse del mismo, como se ha definido anteriormente en el presente documento para la fabricación de un medicamento para su uso en (i) la profilaxis o el tratamiento de una patología iniciada o caracterizada por función mitocondrial reducida; o (ii) la mejora de la función cognitiva o muscular. Dichas patologías pueden incluir, sin limitación, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, trastorno de ansiedad, trastorno metabólico, diabetes mellitus y obesidad.

15 También se desvela en el presente documento un proceso para la fabricación de un medicamento para su uso en (i) la profilaxis o el tratamiento de una patología iniciada o caracterizada por función mitocondrial reducida; o (ii) la mejora de la función cognitiva o muscular; caracterizándose dicho proceso por el uso, como un ingrediente esencial del medicamento, de una fruta, o un extracto o fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos que pueden aislarse del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento.

20 También se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un componente activo derivado de una fruta o un extracto o fracción activa de uno o más componentes activos que pueden aislarse del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 También se desvela en el presente documento el aporte de extractos vegetales, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos o metabolitos que pueden aislarse del mismo, o sintetizarse, para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto que se beneficiaría de una actividad mitocondrial aumentada, para mejorar (i) la función cerebral, (ii) la función metabólica, incluyendo diabetes u obesidad, (iii) el rendimiento muscular y (iv) aumentar los niveles tisulares de ATP.

30 También se desvela en el presente documento el aporte de extractos, composiciones y compuestos que son neuroprotectores, neurotróficos y/o promueven el crecimiento de neuritas y, en consecuencia, mejoran la función cognitiva, así como métodos de uso de estos compuestos y composiciones.

35 También se desvela en el presente documento el aporte de compuestos y composiciones que mejoran, protegen y mantienen la función cerebral y la cognición. También se desvela en el presente documento la mejora, protección contra y control de trastornos anímicos. También se desvela en el presente documento la protección contra trastornos o síntomas inducidos por el estrés o asociados con el estrés.

40 También se desvela en el presente documento el aporte de compuestos neuroprotectores para proteger el cerebro de lesiones, así como mejorar el rendimiento cognitivo y la memoria en adultos normales. También se desvela en el presente documento el aporte de nuevos compuestos que estimulen la plasticidad neuronal. Es bien conocido que la plasticidad neuronal es un proceso clave para las funciones de memoria y cognitivas. Dichos compuestos pueden influir en el crecimiento de neuritas, el número de ramas por célula, las prolongaciones medias por célula e incluso los números de sinapsis formadas.

45 La presente divulgación también se refiere a varios compuestos de polifenol y derivados de los mismos, relacionados con elagitaninos, como compuestos naturales bioactivos hallados en la granada y otras frutas, así como extractos naturales bioactivos que contienen estos compuestos. Estos compuestos incluyen elagitaninos, punicalagina y ácido elálgico, todos los cuales se encuentran en la granada, pero también pueden aislarse de otras frutas y bayas, así como metabolitos de estos compuestos. Como se desvela en el presente documento, se ha mostrado ahora que estos compuestos tienen efectos beneficiosos en (i) la función mitocondrial, (ii) el metabolismo celular y (iii) la plasticidad neuronal.

50 Usando modelado *in vitro* del crecimiento de neuritas y la formación de prolongaciones en cultivo de células neuronales y células primarias, se examinaron diversos compuestos con respecto a sus efectos beneficiosos. Como se ha descrito anteriormente, el envejecimiento, la neurodegeneración y el estrés crónico tienen efectos negativos en el crecimiento de neuritas. Notablemente, se ha descubierto que los compuestos de la presente divulgación tienen propiedades neuroprotectoras, muestran fuerte actividad estimulante en células PC-12 y neuronas mesencefálicas primarias y mejoran la función cognitiva y la memoria en modelos animales.

60 En un aspecto, la invención se refiere a una composición, tal como un producto farmacéutico, un alimento médico, un alimento funcional, un aditivo alimentario o un complemento dietético, que comprende los compuestos o una mezcla de los mismos de la invención. La composición también puede contener opcionalmente un agente terapéutico adicional o puede administrarse en combinación con otro compuesto terapéutico. También se proporcionan productos envasados, que contienen la composición anteriormente mencionada y un marcador y/o instrucciones para su uso en la mejora de la memoria y el rendimiento cognitivo y/o para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con daño al cerebro típico para afecciones halladas en el adulto de edad avanzada.

5 También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de extracto de granada: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

10 También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de un elagitanino: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

15 También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de punicalagina: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

20 También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de ácido elágico: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

25 Un aspecto de la invención es un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una urolitina: para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular e hiperlipidemia.

30 En una realización la afección es obesidad.

En una realización la afección es síndrome metabólico.

En una realización la afección es diabetes mellitus.

35 En una realización la afección es enfermedad cardiovascular.

En una realización la afección es hiperlipidemia.

40 También se desvela en el presente documento un método para aumentar o mantener la función mitocondrial. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de poner en contacto células con una cantidad eficaz de una urolitina, para aumentar la función de las mitocondrias.

45 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento, prevención o control de una enfermedad o afección relacionada con mitocondrias asociada con una función mitocondrial alterada o una densidad mitocondrial reducida. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar la enfermedad o afección asociada con función mitocondrial alterada o densidad mitocondrial reducida.

50 También se desvela en el presente documento un método para aumentar la tasa metabólica. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para aumentar la tasa metabólica.

55 Un aspecto de la invención es su uso en la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

Un aspecto de la invención es su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para prevenir o tratar la obesidad.

60 Un aspecto de la invención es su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular.

65 Un aspecto de la invención es su uso en el tratamiento de la hiperlipidemia. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para tratar la hiperlipidemia. En una realización, la hiperlipidemia es hipertrigliceridemia. En una realización, la hiperlipidemia es ácidos grasos libres elevados.

Un aspecto de la invención es su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno metabólico. En una realización, el trastorno metabólico es diabetes mellitus. En una realización, el trastorno metabólico es obesidad.

5 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar la enfermedad neurodegenerativa. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre el grupo que  
 10 consiste en complejo de demencia asociado al SIDA, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia con cuerpos de Lewy, insomnio familiar letal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, atrofia de múltiples sistemas, neuroacantocitosis, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, esclerosis mielinoclastica difusa, ataxia espinocerebelar, degeneración combinada subaguda de la médula espinal, tabes dorsal, enfermedad de Tay-Sachs, encefalopatía tóxica, encefalopatía espongiiforme transmisible y síndrome de erizo inestable. En un ejemplo del método desvelado  
 20 en el presente documento, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

25 También se desvela en el presente documento un método para mejorar la función cognitiva. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para mejorar la función cognitiva. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la función cognitiva se selecciona entre el grupo que consiste en percepción, memoria, atención, comprensión del habla, generación del habla, comprensión lectora, creación de imágenes, aprendizaje y razonamiento. En un ejemplo  
 30 del método desvelado en el presente documento, la función cognitiva se selecciona entre el grupo que consiste en percepción, memoria, atención y razonamiento. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la función cognitiva es memoria.

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno cognitivo. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno cognitivo. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo se selecciona entre el grupo que consiste en delirio, demencia, trastorno del aprendizaje, trastorno de déficit de atención (TDA) y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (THDA). En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo es trastorno de déficit de atención (TDA). En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo es trastorno por déficit de atención con hiperactividad (THDA).

45 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de déficit cognitivo inducido por el estrés o relacionado con el estrés. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el déficit inducido por el estrés o relacionado con el estrés.

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno anímico. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno anímico. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno anímico se selecciona entre el grupo que consiste en depresión, depresión postparto, distimia y trastorno bipolar. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno anímico es depresión. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno anímico es distimia.

60 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de trastorno anímico inducido por el estrés o relacionado con el estrés, por ejemplo, distimia. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno anímico inducido por el estrés o relacionado con el estrés.

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno de ansiedad. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno de ansiedad. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno de ansiedad se selecciona entre el grupo que consiste en trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia, trastorno de ansiedad

social, trastorno obsesivo-compulsivo y trastorno de estrés postraumático. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno de ansiedad es trastorno de ansiedad generalizado. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno de ansiedad es trastorno de estrés postraumático.

5 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de ansiedad inducida por el estrés o relacionada con el estrés. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar la ansiedad inducida por el estrés o relacionada con el estrés.

10 También se desvela en el presente documento un método para potenciar el rendimiento muscular. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para aumentar el rendimiento muscular. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el rendimiento muscular se selecciona entre el grupo que consiste en fuerza, velocidad y resistencia.

15 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de una enfermedad muscular o neuromuscular. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar la enfermedad muscular o neuromuscular. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la enfermedad muscular o neuromuscular es una miopatía. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la enfermedad muscular o neuromuscular es una distrofia muscular. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la enfermedad muscular o neuromuscular es distrofia muscular de Duchenne.

20 También se desvela en el presente documento un método para promover el crecimiento de neuritas. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad eficaz de una urolitina, para promover el crecimiento de neuritas. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el contacto comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la urolitina, para promover el crecimiento de neuritas.

25 Las siguientes realizaciones pueden referirse a cada aspecto y realización de la invención descrita y, según sea apropiado, entre sí.

En una realización, la urolitina es una urolitina aislada.

35 En una realización, la urolitina se selecciona entre el grupo que consiste en urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D, así como sus metabolitos, incluyendo, a modo de ejemplo, sus formas glucuronidadas, metiladas y sulfatadas, y combinaciones de estas urolitinas.

En una realización, la urolitina se administra como un producto alimentario procesado.

40 En una realización, la urolitina se administra como una urolitina.

En una realización, la urolitina se administra por vía oral.

45 En una realización, la urolitina se administra por vía parenteral.

En una realización, la urolitina se administra al menos semanalmente. En diversas realizaciones, la urolitina se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 veces a la semana.

50 En una realización, la urolitina se administra al menos diariamente. En diversas realizaciones, la urolitina se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces al día.

55 En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 0,1 - 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal. En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 2 - 120 mg de urolitina por kg de peso corporal. En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 4 - 90 mg de urolitina por kg de peso corporal. En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 8 - 30 mg de urolitina por kg de peso corporal.

60 En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 0,001 micromolar ( $\mu\text{M}$ ). En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 0,1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 10  $\mu\text{M}$ .

65

En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 0,001 micromolar ( $\mu\text{M}$ ). En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 0,1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 10  $\mu\text{M}$ .

En una realización, el sujeto no recibe una urolitina, para tratar otra afección que requiera la administración de una urolitina, seleccionada entre el grupo que consiste en aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección e inflamación.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa fórmulas estructurales para urolitina A (UA), ácido elágico (AE), telimagrandina (TL), punicalagina (PA) y punicalina (PB).

La Figura 2 representa ácido elágico (AE) y sus metabolitos, urolitina D (UD), urolitina C (UC), urolitina A (UA) y urolitina B (UB), que son producidos por la microflora intestinal en animales, incluyendo seres humanos.

La Figura 3 es un par de gráficos de barras que representan niveles de expresión génica mitocondrial en respuesta a las concentraciones indicadas de ácido elágico (panel superior) y urolitina A (panel inferior).

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa actividad citrato sintasa (CS) medida *in vitro* en presencia de las concentraciones indicadas de punicalagina, ácido elágico, urolitina A o control negativo.

La Figura 5A es un *collage* de inmunotransferencias (IB) que representan efectos del ácido elágico (AE) y la urolitina A (UA) a las concentraciones indicadas en los niveles de proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y AMPK fosforilada (P-AMPK). P-AMPK: AMPK fosforilada. Control: control negativo; RSV: control positivo de resveratrol.

La Figura 5B es un gráfico de barras que representa el análisis densitométrico de bandas en la Figura 5A que muestra el nivel relativo de P-AMPK activada después de los tratamientos en comparación con células tratadas con control.

La Figura 6 es un gráfico de barras que representa los números de células totales para cultivos de células PC-12 después del tratamiento con 0,5  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 7 es un gráfico de barras que representa el crecimiento de neuritas medio ( $\mu\text{m}$ ) en células PC-12 después del tratamiento con 0,5  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. El crecimiento se expresa por célula. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 8 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de células PC-12 que muestran crecimiento de neuritas extenso ( $>20 \mu\text{m}$ ) después del tratamiento con 0,5  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 9 es un gráfico de barras que representa la formación de prolongaciones media en células PC-12 después del tratamiento con 0,5  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 10 es un gráfico de barras que representa el crecimiento medio por célula de neuronas dopaminérgicas primarias positivas para tirosina hidroxilasa (TH) después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 11 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de neuronas dopaminérgicas primarias TH positivas que muestran crecimiento de neuritas extenso ( $>20 \mu\text{m}$ ) después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 12 es un gráfico de barras que representa el número medio de prolongaciones formadas en neuronas dopaminérgicas primarias TH positivas después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 13 es un gráfico de barras que representa la longitud de prolongación máxima en neuronas dopaminérgicas primarias TH positivas después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 14 es un gráfico de barras que representa las ramas medias por neurona dopaminérgica primaria TH positiva después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 15 es un gráfico de barras que representa el número medio de dendritas por neurona dopaminérgica primaria TH positiva después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 16 es un gráfico de barras que representa la longitud de dendrita media por neurona dopaminérgica primaria TH positiva después del tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de los compuestos indicados. SP, SP600125; AMPcdb, AMP cíclico de dibutirilo; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La Figura 17 es tres series de gráficos de barras que representan los efectos del tratamiento con urolitina A, punicalagina y extracto de granada (EG) al aparecer obesidad en ratones alimentados con dieta alta en grasa (DAG). Se administró urolitina A como una mezcla alimentaria; se administraron EG y punicalagina por sonda. (A) Seguimiento de peso corporal expresado como porcentaje de aumento en comparación con el peso corporal inicial. (B) Porcentaje de masa adiposa medida por EchoMRI después de 5 semanas de tratamiento. (C) Porcentaje de masa magra medida por EchoMRI después de 5 semanas de tratamiento. Composición de grupos: Control de DAG (mezcla alimentaria): n = 10; Control de DAG (sonda): n = 10; DAG más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 9; DAG más punicalagina (sonda): n = 8; DAG más EG (sonda): n = 7. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron mediante ANOVA de 2 vías. Se indican los valores de p.

La Figura 18 es dos pares de gráficos de barras que representan efectos del ácido elálgico y la urolitina A en la masa magra y masa adiposa en ratones alimentados con dieta de pienso convencional. (A) Porcentaje de masa magra (músculo) medida por EchoMRI después de 2 semanas de tratamiento. (B) Porcentaje de masa adiposa (músculo) medida por EchoMRI después de 2 semanas de tratamiento. Composición de grupos: Control de dieta de pienso (mezcla alimentaria): n = 8; Dieta de pienso más ácido elálgico (mezcla alimentaria): n = 7; Dieta de pienso más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 7. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student).

La Figura 19 es un par de gráficos y un par correspondiente de gráficos de barras que representan efectos del ácido elálgico y la urolitina A en el consumo de oxígeno en ratones alimentados con dieta de pienso convencional. (A) Seguimiento del consumo de oxígeno durante un periodo de 20 h. Las barras rellenas corresponden a la fase de oscuridad (de 19:00 a 7:00). El resto corresponde a la fase de luz. (B) Consumo de oxígeno representado como el área bajo la curva (ABC). Composición de grupos: Control de dieta de pienso (mezcla alimentaria): n = 8; Dieta de pienso más ácido elálgico (mezcla alimentaria): n = 7; Dieta de pienso más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 7. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron mediante ANOVA de 2 vías. Se indica el valor de p (control de dieta de pienso frente a dieta de pienso más tratamiento).

La Figura 20 es una serie de gráficos y una serie correspondiente de gráficos de barras que representan el efecto de urolitina A, punicalagina y extracto de granada (EG) en el consumo de oxígeno en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (DAG). (A) Seguimiento del consumo de oxígeno durante un periodo de 20 h. Las barras rellenas corresponden a la fase de oscuridad (de 19:00 a 7:00). El resto corresponde a la fase de luz. (B) Consumo de oxígeno representado como el área bajo la curva (ABC). Composición de grupos: Control de DAG (mezcla alimentaria): n=10; Control de DAG (sonda): n = 10; DAG más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 9; DAG más punicalagina (sonda): n = 8; DAG más EG (sonda): n = 7. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron mediante ANOVA de 2 vías.

La Figura 21 es un par de gráficos y un par correspondiente de gráficos de barras que representan el efecto del ácido elálgico y la urolitina A en la relación de intercambio respiratorio (RIR) en ratones alimentados con dieta de pienso convencional. (A) Seguimiento de RIR durante un periodo de 20 h. Las barras rellenas corresponden a la fase de oscuridad (de 19:00 a 7:00). El resto corresponde a la fase de luz. (B) RIR representada como RIR media. Composición de grupos: Control de dieta de pienso (mezcla alimentaria): n = 8; Dieta de pienso más ácido elálgico (mezcla alimentaria): n = 7; Dieta de pienso más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 7. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron mediante ANOVA de 2 vías. Se indica el valor de p (control de dieta de pienso frente a dieta de pienso más tratamiento).

La Figura 22 es una serie de gráficos y una serie correspondiente de gráficos de barras que representan el efecto de la urolitina A, punicalagina y extracto de granada (EG) en la relación de intercambio respiratorio (RIR) en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (DAG). (A) Seguimiento de RIR durante un periodo de 20 h. (B) RIR representada como RIR media. Composición de grupos: Control de DAG (mezcla alimentaria): n = 10; DAG más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 9; DAG más punicalagina (mezcla alimentaria): n = 10; DAG más EG (mezcla alimentaria): n = 10. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron mediante ANOVA de 2 vías.

La Figura 23 es dos series de gráficos que representan el efecto de la urolitina A, punicalagina y extracto de granada (EG) en triglicéridos y ácidos grasos libres en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (DAG). (A) Niveles en plasma de triglicéridos en ratones alimentados con DAG tratados durante 14 semanas. (B) Niveles en plasma de ácidos grasos libres en ratones alimentados con DAG tratados durante 14 semanas. Composición de grupos: Control de DAG (mezcla alimentaria): n = 10; Control de DAG (sonda): n = 10; DAG más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 9; DAG más punicalagina (sonda): n = 8; DAG más EG (sonda): n = 7. Los resultados se expresan como media ± ETM. \* p < 0,05 (ensayo de t de Student).

La Figura 24 es una serie de gráficos que representan el efecto de la urolitina A, ácido elálgico y punicalagina en la glucemia en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (DAG). (A) Ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DAG tratados mediante mezcla alimentaria con urolitina A durante 10 semanas. (B) Ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DAG tratados mediante mezcla alimentaria con ácido elálgico durante 10 semanas. (C) Ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DAG tratados mediante mezcla alimentaria con punicalagina durante 10 semanas. Composición de grupos: Control de DAG (mezcla alimentaria): n = 10; DAG más urolitina A (mezcla alimentaria): n = 9; DAG más punicalagina

(mezcla alimentaria):  $n = 10$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. \*  $p < 0,05$  (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 25 es un gráfico lineal y un gráfico de barras que representa el efecto de la urolitina A (UA) en la respiración basal y desacoplada (consumo de oxígeno) en *C. elegans* viejo (10 días de edad). (A) Respiración basal y desacoplada (FCCP) en gusanos de control de 10 días de edad tratados con DMSO 0,1 % gusanos de 10 días de edad tratados con urolitina A 30  $\mu$ M en DMSO 0,1 %. (B) Área bajo la curva (ABC) representativa de respiración desacoplada (FCCP) en gusanos de control de 10 días de edad tratados con vehículo (DMSO 0,1 %) o urolitina A 30  $\mu$ M en DMSO 0,1 %. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. \*  $p < 0,05$  (ensayo de  $t$  de Student). TCO, tasa de consumo de oxígeno.

La figura 26 es un gráfico de barras que representa el efecto de la urolitina A en mitocondrias en el músculo de *C. elegans*. La cepa transgénica de *C. elegans* SJ4103 muestra fluorescencia debida a expresión específica del músculo de proteína verde fluorescente (GFP) que se dirige a la membrana mitocondrial. La presencia de mitocondrias en el músculo del *C. elegans* se muestra por un aumento de la fluorescencia. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. \*  $p = 0,0014$  (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 27 es un gráfico de barras que representa la movilidad de ratones sometidos a estrés crónico con o sin el tratamiento de extracto de granada.

La Figura 28 es un gráfico de barras que representa el alcance de una respuesta de "congelación" de ratones en un contexto de inducción de ansiedad con o sin el tratamiento con extracto de granada.

La Figura 29 es un gráfico de barras que representa el efecto en ratones de la administración de extracto de granada en el alcance de la inhibición inducida por ansiedad de la cría.

La Figura 30 es un gráfico de barras que representa el efecto de la administración de extracto de granada en el alcance de la inhibición inducida por ansiedad de acicalamiento en ratones.

La Figura 31 es un gráfico lineal que representa la extinción de una memoria de un contexto adverso particular cuando se expone repetidas veces al contexto en ausencia del efecto adverso. Se muestran datos para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana, ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana pero se han tratado con el elagitanino punicalagina. La congelación (%) se expresa como un porcentaje del tiempo de congelación durante la exposición inicial al contexto.

La Figura 32 es un gráfico que representa el efecto en ratones del estrés crónico en el aprendizaje eficaz en el laberinto de agua de Morris.

La Figura 33 es un gráfico de barras que representa el efecto en ratones con estrés crónico de la administración de extracto de granada en el rendimiento de aprendizaje en el laberinto de agua de Morris.

La Figura 34 es un gráfico que representa la distancia acumulada de una plataforma oculta a lo largo de varios intentos durante la fase de entrenamiento en el laberinto de agua de Morris, una medida del aprendizaje cognitivo. Se muestran datos para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana, ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana pero se han tratado con el elagitanino punicalagina. La distancia hasta la plataforma es la suma de las distancias acumuladas entre el ratón y la plataforma oculta a lo largo de todos los intervalos medidos (25 intervalos/s) durante el periodo de observación (60 s).

La Figura 35 es un gráfico de barras que representa memoria de ratas envejecidas en un ensayo de reconocimiento social cuando se tratan con el extracto de granada 1108 o un control (Ctrl).

La Figura 36 es un gráfico de barras que representa resultados de laberinto de agua de Morris para ratas envejecidas tratadas con extracto de granada 1108 o control (Ctrl).

La Figura 37 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de alteraciones correctas en un laberinto en Y para el modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer 5XFAD, ratones tanto tratados como no tratados, así como de control normales. Significación: \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ANOVA de una vía.

La Figura 38 es un gráfico de barras que representa resultados del laberinto de agua de Morris para ratones transgénicos que modelan la enfermedad de Alzheimer (hAPP-Tg) tratados con extractos derivados de granada 31008, 61109, 71109 o control (Vehículo). También se muestran resultados para ratones de tipo silvestre (no Tg) tratados con control (Vehículo).

La Figura 39 es un gráfico de barras que representa resultados de caja de oscuridad/luz para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana frente a ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: \* $p < 0,05$ , (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 40 es un gráfico de barras que representa resultados para el laberinto en O elevado para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana frente a ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: \* $p < 0,05$ , (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 41 es un gráfico de barras que representa resultados para el ensayo de natación forzada para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana frente a ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 42 es un gráfico de barras que representa resultados para el entrenamiento en el paradigma de acondicionamiento de miedo contextual durante el primer choque leve que tiene lugar a los 4 min. Se muestran resultados para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana frente a ratones de control criados

con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM.

La Figura 43 es un gráfico de barras que representa la extinción de una memoria de un contexto adverso particular cuando se expone repetidas veces al contexto en ausencia del efecto adverso. Se muestran datos para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana, ratones de control no sometidos a tensión criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y tratamiento con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: \* $p < 0,05$ , # $p = 0,05$  (ensayo de  $t$  de Student). Los animales no sometidos a tensión normales se comparan con animales sometidos a tensión en su vida temprana (es decir, separación materna). Se comparan animales sometidos a tensión en su vida temprana tratados con punicalagina con animales sometidos a tensión en su vida temprana no tratados.

La Figura 44 es un gráfico lineal que demuestra el nivel de aprendizaje motor como se mide por el tiempo en segundos hasta caer desde un cilindro rotatorio. Se muestran datos para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana, ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y se han tratado con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM.

La Figura 45 es un gráfico que representa el tiempo de escape en segundos del laberinto de agua de Morris durante la fase de entrenamiento, una medida del aprendizaje cognitivo. Se muestran datos para ratones que han experimentado tensión en su vida temprana, ratones de control criados con normalidad y ratones que han experimentado tensión en su vida temprana y se han tratado con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: \* $p < 0,05$  (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 46 es un gráfico de barras que representa los efectos de compuestos derivados de granada en el reconocimiento contextual en ratones normales, bien no tratados o bien tratados con punicalagina o urolitina A. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: \* $p < 0,05$  (ensayo de  $t$  de Student).

La Figura 47 es un gráfico de barras que representa los efectos de compuestos derivados de granada en la conservación de la memoria para un contexto particular en ratones normales, bien no tratados o bien tratados con punicalagina o urolitina A. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ETM. Significación: Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía o ANOVA de medidas repetidas, seguido de un ensayo de múltiples comparaciones de LSD post-hoc de Fisher. \* $p < 0,05$ .

La Figura 48 es un gráfico lineal que demuestra el rendimiento muscular y habilidades motoras como se mide por el tiempo hasta caer en segundos desde un cilindro rotatorio. Se muestran datos para ratones de control no tratados criados con normalidad y ratones que se han tratado con el elagitanino punicalagina. Significación: \* $p < 0,05$  mediante análisis de ANOVA.

La Figura 49 es un gráfico lineal que demuestra el nivel de rendimiento y resistencia muscular medido por la capacidad de un ratón para correr en una cinta a velocidades elevadas. Se muestran datos para ratones de control no tratados criados con normalidad y ratones que se han tratado con urolitina A. Significación: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (ensayo de  $t$  de Student).

#### Descripción detallada de la invención

En biología y psicología, el término "tensión" se refiere a la consecuencia de la incapacidad de un ser humano u otro animal a responder de forma apropiada a amenazas fisiológicas, emocionales o físicas, bien reales o bien imaginadas. El término "tensión" se empleó por primera vez en un contexto biológico por el endocrinólogo Hans Selye en la década de 1930. Posteriormente amplió y popularizó el concepto para incluir respuesta fisiológica inapropiada a cualquier requisito. Abarca una amplia serie de fenómenos, desde molestia leve a disfunción drástica que puede provocar deterioro grave de la salud.

Todos estos elementos psicobiológicos de la tensión pueden representar manifestación de la tensión oxidativa, un desequilibrio entre la producción y manifestación de especies de oxígeno reactivas y la capacidad de un sistema biológico para detoxificar fácilmente los intermedios reactivos o para reparar el daño resultante. Las alteraciones en el estado redox normal de tejidos pueden provocar efectos tóxicos mediante la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Algunas especies oxidativas reactivas pueden incluso actuar como mensajeros mediante un fenómeno denominado "señalización redox".

En los seres humanos, la tensión oxidativa está implicada en muchas enfermedades. Los ejemplos incluyen aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome del cromosoma X frágil y síndrome de fatiga crónica.

Una fuente de oxígeno reactivo en condiciones normales en seres humanos es la filtración de oxígeno de mitocondrias durante la fosforilación oxidativa.

Otras enzimas capaces de producir superóxido ( $O_2^-$ ) son xantina oxidasa, NADPH oxidasas y citocromos P450. El peróxido de hidrógeno, otro fuerte agente oxidante, es producido por una amplia diversidad de enzimas incluyendo varias oxidasas. Las especies de oxígeno reactivas desempeñan papeles importantes en la señalización celular, un proceso denominado señalización redox. Por lo tanto, para mantener una homeostasis celular apropiada debe alcanzarse un equilibrio entre la producción y el consumo de oxígeno reactivo.

Los antioxidantes mejor estudiados son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Los antioxidantes enzimáticos peor estudiados incluyen las peroxirredoxinas y la recientemente descubierta sulfirredoxina. Otras enzimas que tienen propiedades antioxidantes (aunque este papel no es principal) incluyen paraoxonasa, glutatión S transferasas y aldehído deshidrogenasas.

5 La tensión oxidativa contribuye a lesión tisular después de irradiación e hiperoxia. Se sospecha que es importante en enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Huntington. También se cree que la tensión oxidativa está ligada a determinadas enfermedades cardiovasculares, ya que la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) en el  
10 endotelio vascular es un precursor de la formación de placas. La tensión oxidativa también desempeña un papel en la cascada isquémica debido a lesión de reperfusión de oxígeno después de hipoxia. Esta cascada incluye tanto ictus como ataques cardíacos. La tensión oxidativa también se ha implicado en el síndrome de fatiga crónica.

15 Notablemente, los inventores han descubierto que determinados compuestos derivados de elagitaninos son útiles en el tratamiento y la prevención de manifestaciones fisiológicas y psicológicas de la tensión, incluyendo tensión oxidativa. Sin pretender quedar ligado a mecanismo de acción particular alguno, se cree que los compuestos ejercen efectos beneficiosos en las mitocondrias, promoviendo y restaurando funciones mitocondriales cruciales y contrarrestando la disfunción mitocondrial inducida por tensión. Se ha descubierto que estos mismos compuestos,  
20 de acuerdo con la presente invención, son útiles en el tratamiento y la prevención de cualquiera de una diversidad de afecciones, enfermedades y trastornos relacionados con la disfunción mitocondrial incluyendo, sin limitación, enfermedades neurodegenerativas y trastornos cognitivos, trastornos metabólicos incluyendo resistencia a la insulina, trastornos anímicos y trastornos de la ansiedad.

25 Los elagitaninos (ET) son polifenoles incluidos en los denominados "taninos hidrolizables" en los que el ácido hexahidroxidifénico forma diésteres con azúcares (con más frecuencia  $\beta$ -D-glucosa). Los ET pueden aparecer como polímeros complejos que alcanzan pesos moleculares de hasta 4000 y mayores. Estos polímeros pueden hidrolizarse con ácidos o bases para producir ácido elágico (AE), que puede usarse indirectamente para cuantificar ET. El AE es a su vez una fuente de productos metabólicos adicionales incluyendo urolitinas.

30 Se han usado muchas especies vegetales que contienen elagitaninos para el tratamiento de enfermedades, particularmente en Asia (Okuda *et al.*, 2009). Estas incluyen *Agrimonia pilosa* (agrimoniina), *Camelia japonica* (cameliatanino A), *Cornus officinalis* (comusina A), *Geranium thunbergii* (geraniina), *Geum japonicum* (gemina-A), *Liquidambar formosana* (casuarictina), *Mallotus japonicus* (ácido malotusínico), *Oenothera erythrosepala* (enoteína B), *Punica granatum* (granado) (granatina B), *Rosa rugosa* (rugosina) y *Terminalia chebula* (ácido quebulínico), entre  
35 otras. Los principales usos de estas plantas medicinales se han asociado con sus actividades antioxidantes, antiarreas, antimicrobianas e inmunomoduladoras.

Los elagitaninos también están presentes en cantidades significativas en muchas bayas, incluyendo fresas, frambuesas rojas y negras (Zafrilla *et al.*, 2001), arándanos y zarzamoras. También se han encontrado elagitaninos  
40 en manzanas, cerezas, moras de los pantanos, arándanos rojos, grosellas, uvas, lima, mango, piña, granada, ciruela, ruibarbo. Serrano *et al.* (2009) Mol Nutr Food Res. 53:S310-29. El elagitanino rubsuaviina C puede aislarse de las hojas del té dulce chino *Rubus suavissimus* S. Lee. También se han identificado elagitaninos en cantidades apreciables en frutos secos, incluyendo nueces (Fukuda *et al.*, 2003), pistachos, anacardos, castañas, bellotas de roble (Cantos *et al.*, 2003), pacanas (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2007) y cacahuetes.

45 También son abundantes en granadas (Gil *et al.*, 2000) y uvas muscadinas (Lee y Talcott, 2002) y son constituyentes importantes de la madera, particularmente del roble (Glabasnia y Hofmann, 2006). Los elagitaninos pueden incorporarse en productos alimentarios, tales como vinos y *whiskey*, mediante migración de la madera a la matriz alimentaria durante diferentes procesos de envejecimiento. También se ha encontrado ácido elágico en varios tipos de miel y se ha propuesto como un marcador floral para miel de brezo (Ferrerres *et al.*, 1996). El ácido elágico y diferentes derivados glucosídicos también están presentes en estos productos alimentarios, incluyendo glucósidos, ramnósidos, arabinósidos y los ésteres de acetilo correspondientes (Zafrilla *et al.*, 2001).

50 Varios estudios han mostrado que el contenido de elagitanino de varios productos alimentarios puede ser bastante alto (Tabla 1). Por ejemplo, un vaso de zumo de granada (200 ml) puede proporcionar hasta 1 g de elagitaninos y ácido elágico juntos, una ración de frambuesa (100 g de frambuesas), aproximadamente 300 mg, una ración de fresas, 70 mg y cuatro nueces, aproximadamente 400 mg de elagitaninos.

60 Los elagitaninos dietéticos representativos incluyen punicalagina de granada, sanguina-H-6 de fresa y frambuesa y pedunculagina de nueces. Todos estos liberan ácido elágico tras su hidrólisis, aunque también pueden producirse otros metabolitos y son distintos de elagitaninos individuales (por ejemplo, ácidos galálgico y ter-galálgico).

Tabla 1. Contenido de elagitaninos (ET) y ácido eláxico (AE) en diversos productos alimentarios.

Alimento	Contenido
<i>Frutas frescas</i>	
Frambuesa	263-330 mg/100 g p.f.
Frambuesa	51-330 mg/100 g p.f.
Fresa	77-85 mg/100 g p.f.
Fresa	25 mg/100 g p.f.
Mora de los pantanos	315 mg/100 g p.f.
Mora de los pantanos	56-360 mg/100 g p.f.
Grosella	1,5-2,0 mg/g p.f.
Mora ártica	69-320 mg/100 g p.f.
Granadas	35-75 mg/100 g p.f. (arilos)
Uvas muscadinias	36-91 mg/100 g p.f.
<i>Frutos secos</i>	
Nuez	802 mg/50 g (8 nueces)
Pacana	20,96-86,2 mg/g (AE)
Castaña	1,61-24,9 mg/kg p.s. (AE)
<i>Frutas procesadas</i>	
Zumo de granada	1500-1900 mg/l (punicalagina)
Zumo de granada	2020-2660 mg/l (ET y AE)
Zumo de granada	5700 mg/l (ET y AE)
Mermelada de frambuesa	76 mg/100 g p.f.
Mermelada de fresa	24 mg/100 g p.f.
Zumo de uva muscadinia	8-84 mg/l
<i>Vinos</i>	
Vino tinto envejecido en roble	9,4 mg/l
Vino tinto envejecido en roble	50 mg/l
Vino de uva muscadinia	2-65 mg/l
<i>Licores</i>	
Whiskey	1-2 mg/l
Coñac	31-55 mg/l
p.f., peso en fresco	
p.s., peso seco	

Los elagitaninos tienen una enorme variabilidad estructural, formando derivados diméricos y oligoméricos. También tienen una distribución más generalizada que los galotaninos. Se muestran elagitaninos adicionales y fuentes indicadas de los mismos en la Tabla 2.

5

Tabla 2. Otros elagitaninos.

	Peso molecular	Fuente	Referencia
		Duramen del roble común	(Puech, Mertz <i>et al.</i> 1999)
2-O-galoil-punicalina			
Casaurictina		casuarina, <i>Stachyurus</i>	Wikipedia
Castalagina y Vecalagina	934,63	Madera del granado	(Tanaka, Nonaka <i>et al.</i> 1986)
Castalina			
Casuarictina		<i>T. japonica</i>	
Casuariina		Hojas de <i>Lagerstroemia speciosa</i>	(Bai, He <i>et al.</i> 2008)
Casuarinina		Hojas de <i>Lagerstroemia speciosa</i>	(Bai, He <i>et al.</i> 2008)
Casuarinina		Granada	
Ácido quebuláxico		<i>T. chebula</i>	
Ácido quebulínico		<i>T. chebula</i>	
Corilagina		Granada	
Cornusiina E			
Epipunicacorteína A		Hojas de <i>Lagerstroemia speciosa</i>	(Bai, He <i>et al.</i> 2008)

	Peso molecular	Fuente	Referencia
Flosina B		Hojas de <i>Lagerstroemia speciosa</i>	(Bai, He <i>et al.</i> 2008)
Gemina D		<i>T. japonica</i>	
Granatina A		Granada	
Granatina B		Granada	
Grandinina			
Lagerstroemina		Hojas de <i>Lagerstroemia speciosa</i>	(Bai, He <i>et al.</i> 2008)
Lambertianina C		Frambuesas	(Gasperotti, Masuero <i>et al.</i> )
Pedunculagina	784,52	Madera y pericarpio del granado	(Tanaka, Nonaka <i>et al.</i> 1986)
Punicacorteína A		Granada	
Punicacorteína B		Granada	
Punicacorteína C		Granada	
Punicacorteína D		Granada	
Punicafolina		Granada	
Punicalagina		Granada	
Punicalina		Granada	
Puniguconina		Granada	
Roburina A			
Roburina B			
Roburina C			
Roburina D			
Roburina E			
Rubusuaviina C		Hojas de té	
Sanguiina H-4		Uvas muscadinias	(Lee, Johnson <i>et al.</i> 2005)
Sanguiina H-5		Uvas muscadinias	(Lee, Johnson <i>et al.</i> 2005)
Sanguiina H-6		Frambuesas, <i>Sanguisorba</i>	(Vrhovsek, Palchetti <i>et al.</i> 2006)
Sanguiina H-10			
Estaquiurina		Hojas de <i>Lagerstroemia speciosa</i>	(Bai, He <i>et al.</i> 2008)
Estrictinina			
Telimagrandina I		Granada	
Telimagrandina II		Granada	
Terquebulina			
Terflavina A			
Terflavina B			
Tergalagina		<i>T. catappa</i>	
Terminalina/Galagildilactona		Granada	

Muchos elagitaninos potencialmente activos pueden aislarse de diversas especies de plantas de *Terminalia*. En particular, se han identificado tanto punicalagina como punicalina en varias especies de *Terminalia*, incluyendo, por ejemplo, *T. catappa*, *T. chebula* Retz, *T. myriocarpa* y *T. citrine*. También se ha aislado punicalagina de *Cistus salvifolius* (un arbusto mediterráneo) y *Combretum molle* (un arbusto africano).

Se encuentra normalmente ácido elágico en cantidades relativamente bajas en tejidos vegetales. Se cree que el ácido elágico deriva de elagitaninos, que cuando se degrada forma ácido hexahidroxidifénico, que se convierte espontáneamente en ácido elágico. Se muestran algunas fuentes adicionales de ácido elágico en la Tabla 3.

Tabla 3. Fuentes con ácido elágico.

Fruta	Cantidad	Referencia
Azaí	55,4 + 1,39 mg/l de pulpa fresca	(Del Pozo-Insfran, Brenes <i>et al.</i> 2004)
Umbú	314 mg/100 g de peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo <i>et al.</i> )
Camu-camu	490 mg/100 g de peso seco	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo <i>et al.</i> )
Cagaíta	289 mg/100 g de peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo <i>et al.</i> )
Arazá	262 mg/100 g de peso seco 218 mg/100 g de peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo <i>et al.</i> )
Cambucí	240 mg/100 g de peso seco 512 mg/100 g de peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo <i>et al.</i> )
Uvas muscadinias	219 mg/100 g de peso seco	(Lee, Johnson <i>et al.</i> 2005)

Las granadas (*Punica granatum*) son alimentos medicinales antiguos que se han usado durante siglos en medicina tradicional. Se consumen frescas y como zumo, que es una fuente excelente de elagitaninos y ácido elágico. Los elagitaninos en cáscara y zumo de granada incluyen punicalina, punicalagina, corilagina, casuarinina, terminalina/galagildilactona, pedunculagina, telimagrandina, granatina A y granatina B. Otras partes del granado contienen elagitaninos adicionales, incluyendo punicafolina, puniacorteína A, puniacorteína B, puniacorteína C, puniacorteína D y punigluconina. Los zumos comerciales contienen elagitaninos de tipo galagilo, incluyendo isómeros de punicalagina (1500-1900 mg/l), taninos hidrolizables indefinidos (400-500 mg/l) y ácido elágico y sus glucósidos (120-260 mg/l) (Gil *et al.*, 2000). Las punicalaginas, elagitaninas en las que ácidos galágicos y elágicos se unen a una molécula de glucosa, son abundantes en piel de granada. En el zumo de arilo no están presentes isómeros de punicalagina y derivados de ácido elágico, pero durante el procesamiento del zumo industrial se extraen de la cáscara y membrana que rodean los arilos y se liberan en grandes cantidades en el zumo.

Pueden prepararse extractos desvelados en el presente documento exprimiendo primero una fruta, por ejemplo, la granada puede exprimirse usando métodos de exprimido industriales convencionales conocidos en la técnica que pueden incluir exprimir la fruta completa mediante la aplicación de presión a la fruta completa o pelando primero la granada y aplicando después presión al material restante, que consiste en los arilos, los materiales membranosos que inmovilizan los arilos y el material de la cáscara producido durante el proceso de pelado. Como alternativa, la cáscara, que es una fuente rica de los elagitaninos, en particular punicalagina, puede someterse a un proceso de exprimido que incluye una extracción de agua. Como alternativa, los métodos de extracción sin agua pueden emplear otros disolventes tales como etanol, acetona o metanol, a modo de ejemplo.

El extracto es típicamente un extracto acuoso, que puede consistir esencialmente en el zumo de la fruta, opcionalmente con la adición de agua extra. Dichos extractos acuosos pueden concentrarse, enriquecerse o condensarse mediante, por ejemplo, técnicas convencionales, por ejemplo, evaporación a presión reducida y métodos de filtración. Son ejemplos de concentrados los que concentrados están al menos 2 veces, más habitualmente al menos 4 veces, por ejemplo al menos 8 veces, al menos 40 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces o al menos 1000 veces.

Los extractos pueden fraccionarse para aislar uno o más componentes activos en los mismos mediante, por ejemplo, filtración por peso molecular o cromatografía en un soporte sólido adecuado tal como un gel de sepharose (para cromatografía de exclusión por tamaño) o columna de intercambio iónico usando HPLC en un sílice o aluminio tratado de forma adecuada, por ejemplo sílice recubierto con ODS, o mediante extracción de disolvente.

Los estudios de simulación de digestión *in vitro* han mostrado que, en general, los elagitaninos son bastante estables en las condiciones fisiológicas del estómago. Las condiciones ácidas (HCl, pH 1,8-2,0) y las enzimas gástricas no hidrolizan los elagitaninos originales para liberar ácido elágico (AE) libre, y no se ha observado degradación de los elagitaninos (Tomas-Barberan *et al.*, 2009). Aunque el estómago parece ser el primer lugar importante para la absorción de AE libre, los elagitaninos no se absorben. En las condiciones fisiológicas del intestino delgado, sin embargo, hay una liberación de AE libre de los elagitaninos. Esta hidrólisis parece deberse a las condiciones de pH (pH de neutro a alcalino suave 7,0-7,3) más que al efecto de enzimas pancreáticas y sales biliares (Larrosa *et al.*, 2006).

También se han usado estudios animales para evaluar la biodisponibilidad y el metabolismo del AE y elagitaninos. Doyle y Griffiths (1980) indicaron una rápida absorción y metabolismo del AE en ratas. Estos autores detectaron urolitina A (UA) y otro metabolito (muy probablemente urolitina B (UB)) en heces y orina. Se demostró que tanto UA como UB tenían su origen en la microflora ya que no se descubrió ninguna en animales sin gérmenes. No se detectó AE sin cambios en orina o heces. Estas urolitinas son en gran medida absorbidas y glucuronidadas por las células intestinales. En este caso, no se produjo ningún éter de metilo ya que UA y UB no tienen agrupamientos de orto-dihidroxiilo en sus moléculas y por lo tanto no son sustratos para la catecol-O-metil transferasa (COMT). En el caso de UB, puede introducirse un hidroxilo adicional mediante el citocromo P450 y esto aumenta las posibilidades de glucuronidación y potencia la excreción del metabolito. Teel y Martin (1988) descubrieron que tanto AE libre como

algunos conjugados (éster de sulfato, glucurónido y conjugados de glutatión) se detectaban en orina, bilis y sangre de ratones. La absorción de  $^3\text{H}$ -AE se produjo principalmente en un periodo de dos horas desde la administración oral. Los niveles en sangre, bilis y tejidos fueron bajos y se excretaron compuestos absorbidos en la orina. Más de la mitad del  $^3\text{H}$ -AE administrado permaneció en el tracto gastrointestinal después de 24 h.

Se ha evaluado el metabolismo de diversos ET y derivados de AE en la dieta en seres humanos. En un estudio que implicó a cuarenta voluntarios sanos, divididos en cuatro grupos, se administraron diferentes productos alimentarios que contenían ET, incluyendo fresas (250 g), frambuesas rojas (225 g), nueces (35 g) y vino tinto envejecido en roble (300 ml). Tanto las fresas como las frambuesas contienen el ET sanguíneo H-6; las nueces contienen el ET pedunculagina; y el vino envejecido en roble contiene el ET vesicalagina. Después del consumo, se recogieron cinco fracciones de orina a las 8, 16, 32, 40 y 56 h. No se detectaron ni ET ni AE en orina usando análisis de LC-MS/MS. Sin embargo, el metabolito microbiano 3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (urolitina B) conjugado con ácido glucurónico se detectó entre las fracciones comenzando a las 32 h hasta las 56 h en todos los sujetos, independientemente del producto alimentario consumido. Según los resultados obtenidos, se excretaron derivados de urolitina B de forma independiente del ET consumido. Un resto monomérico habitual en los ET consumidos fue AE (m/z a 301), que podría indicar que esta subunidad que pertenece a moléculas de ET fue la molécula crítica para producir derivados de urolitina B. Se observó una transformación metabólica similar a ácido elágico y urolitina para los elagitaninos en seres humanos que consumen zumo de granada (Cerde, Espin *et al.* 2004; Cerde, Periago *et al.* 2005).

Uno de los factores principales en el metabolismo y la biodisponibilidad de elagitaninos es su transformación microbiana para producir una serie de derivados de urolitina (FIG. 2). Entre ellos, los mejor caracterizados y conocidos son urolitina A y B, pero también se producen intermedios con tres y cuatro hidroxilos en el intestino delgado, se absorben y se excretan en la bilis después de conjugación con éteres de metilo y glucurónidos (Espín *et al.*, 2007). Los experimentos animales muestran que estos metabolitos comienzan a formarse en el intestino delgado, lo que indica que las bacterias anaerobias pueden ser responsables de ello. El metabolismo continúa a lo largo del tracto GI comenzando con urolitinas D y C hasta terminar con la producción de urolitinas A y B. Las diferencias en la producción de estos metabolitos por voluntarios humanos muestran que pueden producirse por la actividad de microorganismos específicos presentes en el intestino.

En el tracto gastrointestinal y en otros tejidos (principalmente en el hígado), los metabolitos microbianos AE y elagitanino se metaboliza adicionalmente por enzimas de fase I (hidroxilación) y fase II (metilación, glucuronidación y sulfatación) para producir metabolitos más solubles que pueden distribuirse entre tejidos y excretarse después en orina.

Por lo tanto, la UB puede hidroxilarse para producir UA y esta puede hidroxilarse adicionalmente para producir derivados de trihidroxi.

También se producen productos de fase II y se detectan éteres de metilo (productos de COMT) así como diferentes conjugados de glucurónido en diferentes tejidos y en orina. Los conjugados de sulfato de metabolitos de elagitanino son menos abundantes en animales y seres humanos que los conjugados de glucurónido. Estos conjugados se producen en primer lugar en las células intestinales y se metabolizan adicionalmente en el hígado antes de la excreción en la orina o la bilis.

Para resumir, los elagitaninos en general no son adsorbidos en el intestino. Más bien, liberan AE en el intestino, que solo se absorbe poco en el estómago y el intestino delgado. El AE es metabolizado en gran medida por bacterias no identificadas en la luz intestinal para producir urolitinas. El metabolismo microbiano comienza en el intestino delgado y los primeros metabolitos producidos conservan cuatro hidroxilos fenólicos (urolitina D, cuatro grupos hidroxilos) y estos se metabolizan adicionalmente a lo largo del tracto intestinal para retirar unidades de hidroxilo que conducen a urolitina C (tres hidroxilos), urolitina A (dos hidroxilos) y B (un hidroxilo) en las partes distales del colón (FIG. 2). Los metabolitos absorbidos se conjugan con ácido glucurónico (una o dos unidades) y/o éteres de metilo (cuando están presentes agrupamientos de orto-dihidroxilo). Los conjugados de urolitina A y B son los principales metabolitos detectados en plasma y orina, aunque algunos derivados de trihidroxi (hidroxilo-UA) o AE-glucurónido de éter de dimetilo también se han detectado en cantidades menores. Las tetrahidroxi-urolitinas, trihidroxi-urolitinas y derivados de AE en general no se detectan en plasma periférico, pero se absorben en el intestino delgado y se transportan al hígado donde se metabolizan adicionalmente y se excretan con bilis al intestino delgado estableciendo una circulación enterohepática que es responsable de la vida relativamente larga de urolitinas en plasma y orina.

Además de fuentes de alimentos naturales, han aparecido muchos artículos sobre la biosíntesis, el aislamiento y la actividad biológica de los taninos, especialmente elagitaninos, durante los últimos veinte años (por ejemplo, Xie *et al.*, 1995, Yoshida *et al.*, 1982, 1984, 1985, 1986, 1989, 1990a/b, 1991a-d, 1992a/b, 1995, Nonaka *et al.*, 1980, 1984, 1989a-c, 1990, Tanaka *et al.*, 1986a/b, 1990, 1992a/b, 2001, Hatano *et al.*, 1988, 1989, 1990a-c, 1991, 1995, Lin *et al.*, 1990, Nishizawa *et al.*, 1982, 1983, Haddock *et al.*, 1982a/b, Kashiwada *et al.*, 1992a/b, 1993, Kadota *et al.*, 1990, Okuda *et al.*, 1982a-e, 1983a/b, El-Mekkawy *et al.*, Chemistry and Biology of Ellagitannins 154 1995, Tsai *et al.*, 1992, Han *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1995, Morimoto *et al.*, 1986a/b, Saijo *et al.*, 1989). El acceso a elagitaninos puros por aislamiento de fuentes naturales puede ser incómodo y producir solamente cantidades relativamente

pequeñas de productos naturales puros. Véase, por ejemplo, Okuda *et al.*, (1982) Chem Pharm Bull. 30:4230-4233; Okuda *et al.* (1982) Chem Pharm Bull. 30:234-4236. Es por lo tanto notable que se conocen métodos para la síntesis total de muchos elagitaninos. Véase, por ejemplo, Khanbabaee, K., Strategies for the synthesis of ellagitannins, en: Chemistry and Biology of Ellagitannins, Ed. S. Quideau, World Scientific Publishing, Singapur, 2009, págs. 152-202, incluyendo referencias citadas en las mismas.

Se han determinado actividades antioxidantes de extractos alimentarios ricos en elagitaninos usando diversos ensayos *in vitro*, y las altas actividades de fresas (Meyers *et al.*, 2003, Aaby *et al.*, 2005, 2007), frambuesas (Liu *et al.*, 2002, Beekwilder *et al.*, 2005), moras de los pantanos (Kähkönen *et al.*, 2001) y otras bayas de *Rubus* (Wada y Ou, 2002), granadas (Gil *et al.*, 2000) y nueces (Anderson *et al.*, 2001) y sus elagitaninos se han indicado ampliamente. Estos alimentos también tienen una clasificación alta en comparación con otros alimentos basados en plantas.

Se sabe menos acerca de los efectos del consumo de alimentos ricos en elagitaninos en el estado antioxidante *in vivo*. En mujeres de edad avanzada, la capacidad antioxidante total del suero aumentó en aproximadamente 10 % durante el periodo de 4 horas después del consumo de 240 g de fresas (Cao *et al.*, 1998). Una única dosis de extracto de granada normalizado (Mertens-Talcott *et al.*, 2006) y el consumo a largo plazo de zumo de granada (Rosenblat *et al.*, 2006) también mejoró varios parámetros antioxidantes en voluntarios humanos. Sin embargo, el consumo diario de nueces durante tres semanas no tuvo ningún efecto en el estado antioxidante de sujetos con síndrome metabólico (Davis *et al.*, 2007).

El crecimiento de células cancerosas depende del equilibrio entre la proliferación y la apoptosis. La proliferación celular desregulada y supresión de la apoptosis son etapas clave en el inicio y la progresión del cáncer. Hay una cantidad apreciable de pruebas de que los extractos de alimentos ricos en elagitanino reducen el crecimiento de células cancerosas *in vitro* inhibiendo la proliferación celular, induciendo muerte celular apoptótica y modulando la cinética del ciclo celular y las rutas de transducción de señales.

Estudios *in vitro* llevados a cabo con líneas celulares cancerosas han mostrado que las fresas (Meyers *et al.*, 2003, Olsson *et al.*, 2004, Ramos *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2007), frambuesas (Liu *et al.*, 2002, Olsson *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2007), moras de los pantanos (Wu *et al.*, 2007) y escaramujos (Olsson *et al.*, 2004) inhiben la proliferación celular, inducen apoptosis y provocan detención del ciclo celular en células de cáncer de colon, hígado, pulmón, mama o cuello uterino humano. En estos estudios, la contribución de elagitaninos en las actividades de extractos de bayas no se evaluó. Sin embargo, un estudio reciente (Ross *et al.*, 2007) sugiere que la actividad antiproliferativa de frambuesas está predominantemente asociada con elagitaninos.

También se ha indicado que el zumo de granada y sus elagitaninos inhiben la proliferación, inducen la apoptosis y suprimen la señalización de células inflamatorias en líneas celulares de cáncer de colon (Seeram *et al.*, 2005, Adams *et al.*, 2006, Larrosa *et al.*, 2006). Asimismo, los polifenoles en la piel de uvas muscadinias inhiben el crecimiento de células de cáncer de colon e inducen la apoptosis (Yi *et al.*, 2005). Fracciones aisladas de uvas muscadinias tintas y ricas en ácido elágico, glucósidos de ácido elágico y elagitaninos inducen la apoptosis, reducen el número de células y provocan alteraciones en la cinética del ciclo celular en células de carcinoma de colon (Mertens-Talcott *et al.*, 2006).

El zumo de granada es eficaz contra células de cáncer de próstata *in vitro*, pero no contra células epiteliales de próstata normal. El tratamiento de células de cáncer de próstata humano altamente agresivo con extracto de zumo de granada dio como resultado inhibición del crecimiento celular y viabilidad e inducción de la apoptosis (Malik *et al.*, 2005, Malik y Mukhtar, 2006).

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto ahora que las urolitinas muestran inesperadamente efectos protectores y restauradores en mitocondrias. Sin pretender quedar limitado a mecanismo particular alguno, se cree que diversos tipos de tensión dan como resultado lesión por tensión a mitocondrias, reduciendo de este modo su capacidad para realizar numerosas funciones esenciales para la función celular general. Se desvelan en el presente documento métodos que son útiles para tratar afecciones que implican lesión por tensión a mitocondrias, lesión que puede manifestarse de cualquiera de varias maneras incluyendo, pero sin limitación, enfermedad mitocondrial.

Las mitocondrias son las "centrales energéticas" de las células. Estos orgánulos de doble membrana desempeñan un papel crítico en la generación de la amplia mayoría de la energía celular (ATP) mediante fosforilación oxidativa. Las mitocondrias también son esenciales para otras funciones metabólicas clave, tales como  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos, cetogénesis y generación de especies de oxígeno reactivas (EOR) con importantes funciones de señalización y control de la homeostasis de calcio.

La matriz mitocondrial contiene la maquinaria enzimática para  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, que genera acetil-CoA de cadenas de acilo, y reducir equivalentes en forma de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) reducido y dinucleótido de flavina adenina (FADH<sub>2</sub>) reducido en el proceso. Acetil-CoA alimenta el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), también conocido como el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, que también produce NADH y FADH<sub>2</sub>. Estos productos donan electrones a la cadena transportadora de electrones (CTE), que conduce a la generación de

un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La disipación de este gradiente a través de la ATP sintasa mitocondrial genera energía en forma de ATP.

La CTE está compuesta de 4 complejos multisubunitarios grandes (complejos I a IV), que transportan electrones generados por el ciclo del TCA a un aceptor final, oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), formando H<sub>2</sub>O en el complejo IV. El transporte de electrones está acompañado de la liberación de grandes cantidades de energía libre, la mayor parte de la cual se utiliza para la traslocación de protones (H<sup>+</sup>) de la matriz al espacio intermembrana (fuerza motriz protónica); el resto se disipa como calor. La energía contenida en el gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> generado por la CTE se acopla después a la producción de ATP a medida que los H<sup>+</sup> fluyen de vuelta a la matriz a través de la ATP sintasa mitocondrial. Por lo tanto, la fosforilación oxidativa resulta del transporte de electrones, la generación de un gradiente de protones y posterior flujo acoplado con ATP sintasa mitocondrial.

Las EOR también pueden activar proteínas de desacoplamiento (PDA) que disipan el gradiente de protones sin producir ATP. Se considera que las PDA son reguladores naturales de este proceso, que responden a y controlan la producción de EOR mitigando la formación de un gran gradiente de protones. Adicionalmente, las PDA y el desacoplamiento de la respiración están implicados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos importantes, tales como termogénesis adaptativa, regulación de la oxidación de ácidos grasos, participación en la inflamación, prevención de la formación de EOR, homeostasis de la glucosa, regulación del peso corporal y envejecimiento.

La citrato sintasa es la enzima inicial del ciclo del TCA mitocondrial. Esta enzima cataliza la reacción entre acetil coenzima A (acetil CoA) y óxido oxaloacético para formar ácido cítrico. La actividad de esta enzima refleja tanto la biogénesis mitocondrial como la fosforilación oxidativa mitocondrial, ya que su actividad aumenta proporcionalmente con la densidad mitocondrial (número de mitocondrias por célula) y la actividad de respiración mitocondrial. En consecuencia, la medición de citrato sintasa permite una evaluación general del estado funcional mitocondrial, indicando la mayor actividad una fosforilación oxidativa aumentada y síntesis de ATP e indicando la menor actividad lo contrario.

Para entender mejor el mecanismo molecular subyacente que conduce a la mejora de la función mitocondrial, puede realizarse un perfil de genes mitocondriales clave (que codifican ADN mitocondrial y genómico) que abarcan fosforilación oxidativa, complejos de cadenas mitocondriales, ciclo del TCA, proteínas de desacoplamiento, factores transcripcionales, cofactores y proteínas de neutralización de EOR.

Las enseñanzas convencionales en biología y medicina es que las mitocondrias actúan solamente como "fábricas de energía" para la célula. Sin embargo, más del 95 % (2900 de 3000) de los genes que codifican proteínas mitocondriales están implicados en otras funciones ligadas a las tareas especializadas de las células diferenciadas en las que residen. Estas tareas evolucionan durante el desarrollo del embrión al adulto, y a medida que los tejidos crecen, maduran y se adaptan al ambiente postnatal. Estas otras funciones no relacionadas con el ATP están íntimamente implicadas en la mayoría de las rutas metabólicas principales usadas por una célula para construir, descomponer y reciclar sus componentes básicos moleculares. Las células no pueden ni siquiera fabricar el ARN y ADN que necesitan para crecer y actuar sin mitocondrias. Los componentes básicos del ARN y el ADN son purinas y pirimidinas. Las mitocondrias contienen las enzimas limitantes de la velocidad para biosíntesis de pirimidina (dihidroorotato deshidrogenasa) y síntesis de hemo (ácido d-aminolevulínico sintetasa) necesarias para preparar hemoglobina. En el hígado, las mitocondrias están especializadas para detoxificar amoníaco en el ciclo de la urea. Las mitocondrias también son necesarias para el metabolismo del colesterol, para la síntesis de estrógenos y testosterona, para el metabolismo de los neurotransmisores y para la producción y detoxificación de radicales libres. Las mitocondrias realizan todo esto además de oxidar las grasas, las proteínas y los carbohidratos ingeridos en la dieta.

Las enfermedades mitocondriales son el resultado de mutaciones heredadas o espontáneas en ADN mitocondrial o ADN nuclear que conducen a funciones alteradas de las proteínas o moléculas de ARN que normalmente residen en mitocondrias. Los problemas con la función mitocondrial, sin embargo, pueden afectar solamente a determinados tejidos como resultado de factores que aparecen durante el desarrollo y el crecimiento que aún no se entienden completamente. Incluso cuando se tienen en cuenta isoformas específicas de tejido de proteínas mitocondriales, es difícil explicar los patrones variables de sistemas orgánicos afectados en los síndromes de enfermedad mitocondrial vistos clínicamente.

Las enfermedades mitocondriales resultan de insuficiencias de las mitocondrias, compartimentos especializados presentes en todas las células del cuerpo excepto los glóbulos rojos. Las mitocondrias son responsables de crear más del 90 % de la energía que el cuerpo necesita para mantener la vida y apoyar el crecimiento. Cuando fallan, se genera cada vez menos energía en la célula. A continuación se producen lesiones celulares e incluso la muerte celular. Si este proceso se repite por todo el cuerpo, sistemas completos comienzan a fallar, y la vida de la persona en la que sucede esto está en grave peligro. Las enfermedades mitocondriales afectan principalmente a niños, pero cada vez se reconoce más la aparición en adultos.

Las enfermedades de las mitocondrias parecen causar el mayor daño a células del cerebro, corazón, hígado, músculos esqueléticos, riñón y los sistemas endocrino y respiratorio.

Muchos síntomas en trastornos mitocondriales son inespecíficos. Los síntomas también pueden mostrar una evolución episódica, con agravamientos periódicos. La afección episódica de la migraña, así como mialgia, síntomas gastrointestinales, acúfenos, depresión, fatiga crónica y diabetes, se han mencionado entre las diversas manifestaciones de trastornos mitocondriales en artículos de revisión sobre medicina mitocondrial (Chinnery y Turnbull (1997) QJM 90:657-67; Finsterer (2004) Eur J Neurol. 11:163-86). En pacientes con trastornos mitocondriales, la sintomatología clínica se produce típicamente en momentos de mayor necesidad de energía asociada con tensores fisiológicos, tales como enfermedad, ayuno, ejercicio excesivo y temperaturas ambientales extremas. Asimismo, los tensores psicológicos también desencadenan con frecuencia sintomatología, supuestamente debido a las mayores necesidades de energía en el cerebro que el paciente es incapaz de cubrir con suficiente producción de ATP.

Dependiendo de qué células estén afectadas, los síntomas pueden incluir pérdida de control motor, debilidad y dolor muscular, trastornos gastrointestinales y dificultades para tragar, escaso crecimiento, cardiopatía, hepatopatía, diabetes, complicaciones respiratorias, convulsiones, problemas visuales/auditivos, acidosis láctica, retardos en el desarrollo y susceptibilidad a la infección.

Las enfermedades mitocondriales incluyen, sin limitación, enfermedad de Alper; síndrome de Barth; defectos de beta-oxidación; deficiencia de carnitina; deficiencia de carnitina-acil-carnitina; síndrome de oftalmoplegia externa progresiva crónica; deficiencia de coenzima Q10; deficiencia de Complejo I; deficiencia de Complejo II; deficiencia de Complejo III; deficiencia de Complejo IV; deficiencia de Complejo V; deficiencia de CPT I; deficiencia de CPT II; síndrome de deficiencia de creatina; deficiencia de citocromo c oxidasa; aciduria glutárica de tipo II; síndrome de Kearns-Sayre; acidosis láctica; LCHAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga); neuropatía óptica hereditaria de Leber; enfermedad de Leigh; cardiomiopatía infantil letal; enfermedad de Luft; MAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media); citopatía mitocondrial; agotamiento de ADN mitocondrial; encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y síntomas de tipo ictus; encefalopatía mitocondrial; miopatía mitocondrial; síndrome de ataxia recesiva mitocondrial; distrofias musculares, epilepsia mioclónica y enfermedad de fibras rojas desiguales; encefalopatía gastrointestinal mioneurogénica; neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa y ptosis; síndrome de Pearson; mutaciones de POLG; deficiencia de piruvato carboxilasa; deficiencia de piruvato deshidrogenasa; SCHAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta); y deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga.

También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de extracto de granada: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

Como se usa en el presente documento, un "producto alimentario" se refiere a un producto preparado a partir de un alimento natural. Los ejemplos no limitantes de productos alimentarios incluyen zumos, vinos, concentrados, mermeladas, gelatinas, conservas, pastas y extractos. Como se usa en el presente documento, un "complemento nutricional" se refiere a un producto adecuado para consumo u otra administración principalmente para sus propiedades promotoras de la salud más que por su contenido calórico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "síndrome metabólico" se refiere a una combinación de trastornos médicos que, cuando se producen juntos, aumentan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes. Afecta a una de cada cinco personas en los Estados Unidos y su prevalencia aumenta con la edad. Algunos estudios han mostrado que la prevalencia en los Estados Unidos es de una estimación del 25 % de la población. De acuerdo con la definición mundial consensuada de la Fundación de Diabetes (2006), el síndrome metabólico es obesidad central más dos cualesquiera de los siguientes:

- Triglicéridos elevados: > 150 mg/dl (1,7 mmol/l), o tratamiento específico para esta anomalía lipídica;
- Colesterol HDL reducido: < 40 mg/dl (1,03 mmol/l) en hombres, < 50 mg/dl (1,29 mmol/l) en mujeres, o tratamiento específico para esta anomalía lipídica;
- Tensión arterial elevada: TA sistólica > 130 o TA diastólica >85 mm Hg, o tratamiento de la hipertensión previamente diagnosticada; y
- Glucosa en plasma en ayunas elevada: (FPG)>100 mg/dl (5,6 mmol/l), o diabetes de tipo 2 previamente diagnosticada.

También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de un elagitanino: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

En determinados ejemplos de acuerdo con esta divulgación, el elagitanino se selecciona entre el grupo que consiste en 2-O-galoil-punicalina, casaurictina, castalagina y vecalagina, castalina, casuarictina, casuariina, casuarinina,

- ácido quebulágico, ácido quebulínico, corilagina, cornusiina E, epipunicacorteína A, flosina B, gemina D, granatina A, granatina B, grandinina, lagerstroemina, lambertianina C, pedunculagina, puniacorteína A, puniacorteína B, puniacorteína C, puniacorteína C, puniacorteína D, punicafolina, punicalagina, punicalina, puniguconina, roburina A, roburina B, roburina C, roburina D, roburina E, rubusuaviina C, sanguina H-4, sanguina H-5, sanguina H-6, sanguina H-10, estaquiurina, strictinina, telimagrandina I, telimagrandina II, terquebulina, terflavina A, terflavina B, tergalagina y terminalina/galagildilactona. Por supuesto, también se contemplan elagitaninos adicionales.
- 5 También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de punicalagina: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.
- 10 También se desvela en el presente documento un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de ácido elágico: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno anímico, estrés y trastorno de ansiedad; para control del peso; o para aumentar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.
- 15 Un aspecto de la invención es un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una urolitina: para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular e hiperlipidemia.
- 20 En determinadas realizaciones de acuerdo con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina A. En determinadas realizaciones de acuerdo con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina B. En determinadas realizaciones de acuerdo con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina C. En determinadas realizaciones de acuerdo con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina D.
- 25 En una realización la afección es obesidad.
- 30 En una realización la afección es síndrome metabólico.
- En una realización la afección es diabetes mellitus.
- 35 En una realización la afección es enfermedad cardiovascular.
- En una realización la afección es hiperlipidemia.
- También se desvela en el presente documento un método para aumentar o mantener la función mitocondrial. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de poner en contacto células con una cantidad eficaz de una urolitina, para aumentar la función de las mitocondrias.
- 40 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento, prevención o control de una enfermedad o afección relacionada con mitocondrias asociada con una función mitocondrial alterada o una densidad mitocondrial reducida. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar la enfermedad o afección asociada con función mitocondrial alterada o densidad mitocondrial reducida.
- 45 También se desvela en el presente documento un método para aumentar la tasa metabólica. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para aumentar la tasa metabólica. Un aspecto de la invención es su uso en la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para prevenir o tratar el síndrome metabólico.
- 50 Un aspecto de la invención es su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para prevenir o tratar la obesidad.
- 55 Un aspecto de la invención es su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular.
- 60 Un aspecto de la invención es su uso en el tratamiento de la hiperlipidemia. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una urolitina, para tratar la hiperlipidemia. En una realización, la hiperlipidemia es hipertrigliceridemia. En una realización, la hiperlipidemia es ácidos grasos libres elevados.
- 65 Un aspecto de la invención es su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico. El método uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno

metabólico. En una realización, el trastorno metabólico es diabetes mellitus. En una realización, el trastorno metabólico es obesidad.

#### Envejecimiento

5 Con mucho el factor de mayor riesgo para enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (AE), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), es el envejecimiento. Se ha pensado que las mitocondrias contribuyen al envejecimiento mediante la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) y la producción neta de especies de oxígeno reactivas (EOR). Aunque muchas proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear, las mitocondrias contienen muchas copias de su propio ADN. El ADNmt humano es una molécula circular de 16.569 pares de bases que codifica 13 componentes polipeptídicos de la cadena respiratoria, así como los ARNr y ARNt necesarios para apoyar la síntesis de proteínas intramitocondriales usando su propio código genético. Se sabe que mutaciones heredadas en el ADNmt provocan una diversidad de enfermedades, la mayoría de las cuales afectan al cerebro y los músculos, tejidos con altos requisitos energéticos. Se ha planteado la hipótesis de que las mutaciones somáticas de ADNmt adquiridas durante el envejecimiento contribuyen al deterioro fisiológico que se produce con el envejecimiento y la neurodegeneración relacionada con el envejecimiento. Está bien establecido que el ADNmt acumula mutaciones con el envejecimiento, especialmente supresiones a gran escala y mutaciones puntuales. En la región de control del ADNmt, las mutaciones puntuales en sitios específicos se pueden acumular hasta niveles altos en determinados tejidos: T414G en fibroblastos cultivados, A189G y T408A en músculo y C150T en glóbulos blancos. Sin embargo, estos "puntos calientes" de la región de control no se han observado en el cerebro. Las mutaciones puntuales en nucleótidos individuales parecen producirse a bajos niveles en el cerebro, aunque el nivel general puede ser alto. Usando una estrategia de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-clonación-secuenciación, se ha descubierto que el nivel promedio de mutaciones puntuales en dos regiones codificantes de proteínas de ADNmt del cerebro de sujetos de edad avanzada fue de ~2 mutaciones por cada 10 kb. Las regiones no codificantes, que pueden tener menos presión de selección, potencialmente acumulan entre dos veces y cuatro veces más. La acumulación de estas supresiones y mutaciones puntuales con el envejecimiento se correlaciona con la degradación de la función mitocondrial. Por ejemplo, se ha descubierto una correlación negativa entre la actividad citocromo oxidasa en el cerebro y niveles de mutaciones puntuales aumentados en un gen de la citocromo oxidasa (*CO1*).

30 La producción neta de EOR es otro mecanismo importante por el que se cree que las mitocondrias contribuyen al envejecimiento. Las mitocondrias contienen múltiples vehículos de electrones capaces de producir EOR, así como una red extensa de defensas antioxidantes. Las lesiones mitocondriales, incluyendo el daño oxidativo en sí mismo, pueden provocar un desequilibrio entre la producción y la retirada de EOR, dando como resultado producción neta de EOR. La importancia para el envejecimiento de la producción neta de EOR mitocondrial está apoyada por observaciones de que la potenciación de defensas antioxidantes mitocondriales puede aumentar la longevidad. En *Drosophila*, la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes mitocondriales manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y metionina sulfóxido reductasa prolonga la longevidad. Esta estrategia es más exitosa en cepas de vida corta de *Drosophila* y no tiene ningún efecto en cepas que ya tienen una vida larga. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que la sobreexpresión de catalasa dirigida experimentalmente a mitocondrias aumentó la longevidad en una cepa de ratón que ya tenía una vida larga.

45 Se ha observado que se produce deterioro cognitivo durante el envejecimiento en animales de edad avanzada y se cree que se produce como resultado de cambios en la fisiología sináptica de neuronas de edad avanzada. Se cree que estos cambios conducen a una pérdida global general de la función integradora de la señalización neuronal en el cerebro (Bishop, Lu *et al.* 2010) y susceptibilidad aumentada a los efectos a largo plazo de la tensión oxidativa y la inflamación (Joseph, Shukitt-Hale *et al.* 2005). Se cree que la pérdida de células que tiene lugar durante el envejecimiento normal se produce principalmente debido a la tensión oxidativa como resultado de radicales libres producidos por una ruta oxidativa ineficaz y parcialmente desacoplada. De hecho, se ha mostrado que un rasgo común en el envejecimiento entre diferentes especies, (*C. elegans*, *D. melanogaster*, ratones, ratas, chimpancés y seres humanos) ha sido prueba de función mitocondrial reducida. Esta interpretación es validada adicionalmente por la observación de que una alteración significativa de la función mitocondrial acorta la longevidad tanto en *C. elegans* (Rea, Ventura *et al.* 2007) como en ratones (Trifunovic, Wredenberg *et al.* 2004; Kujoth, Hiona *et al.* 2005). La mejora de la función mitocondrial, mediante la sobreexpresión de la catalasa en ratones, dio como resultado longevidades extendidas (Schirner, Linford *et al.* 2005).

60 Con el envejecimiento y la degradación de la función mitocondrial, las neuronas en el cerebro se hacen más vulnerables a patologías dependientes de la edad, así como muerte celular. Esto da como resultado una pérdida de conexiones entre neuronas, así como función neuronal alterada (pérdida de neurotransmisores, ausencia de activación). También hay cada vez más pruebas de que las neuronas responden a daño de ADN no reparado mediante silenciamiento de la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos, conduciendo de este modo a supresión adicional de las funciones celulares. Adicionalmente, las células neuronales de edad avanzada muestran en todas las especies una expresión aumentada de genes implicados en las rutas de respuesta a la tensión.

Se observan muchos rasgos distintivos de estos cambios en el cultivo *in vitro* de células neuronales de edad avanzada, que muestran crecimiento de neuritas y formación de prolongaciones reducidos. Una reducción que podría invertirse por factores de crecimiento neuronal (Rozovsky, Wei *et al.* 2005).

## 5 Trastornos neurodegenerativos

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por pérdida selectiva, gradualmente progresiva, de sistemas neuronales anatómica o fisiológicamente relacionados. Los ejemplos prototípicos incluyen enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Huntington (EH).

Los estadios tempranos de la neurodegeneración comparten muchos de los mismos rasgos distintivos que el deterioro visto en el envejecimiento. Es interesante observar que enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer muestran una mayor incidencia con la edad, presentando la enfermedad más del 50 % de los adultos de más de 85 años de edad (Hebert, Scherr *et al.* 2003). Como se ha analizado anteriormente, el deterioro de la función mitocondrial parece ser un rasgo distintivo del envejecimiento. Este deterioro de la función neuronal probablemente tenga un efecto significativo en poblaciones neuronales con grandes necesidades bioenergéticas, uno de dichos conjuntos de neuronas son las neuronas piramidales grandes que se degradan en enfermedad de Alzheimer (Bishop, Lu *et al.* 2010). El deterioro de estas clases de neuronas en respuesta a la función mitocondrial alterada puede ser responsable de la aparición de enfermedad neurodegenerativa. Los efectos de los trastornos neurodegenerativos en la supervivencia neuronal pueden modelarse *in vitro*. Cuando se incuban células neuronales N2 con péptido A-beta (A $\beta$ ), que se cree que es el agente causante de la enfermedad de Alzheimer, hay un efecto significativo en el crecimiento de neuritas, que puede invertirse mediante antioxidantes. Manczak *et al.* (2010) *J Alzheimers Dis.* 20 Supl. 2:S609-31.

La forma más común de muerte celular en neurodegeneración es mediante la ruta apoptótica mitocondrial intrínseca. Esta ruta controla la activación de caspasa-9 regulando la liberación de citocromo c del espacio intermembrana mitocondrial. La concentración de EOR, productos secundarios normales de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, está mediada en parte por antioxidantes mitocondriales, tales como manganeso superóxido dismutasa (SOD2) y glutatión peroxidasa. La sobreproducción de EOR (tensión oxidativa) es una característica central de todos los trastornos neurodegenerativos. Además de la generación de EOR, las mitocondrias también están implicadas en las funciones de mantenimiento de la vida, incluyendo la homeostasis del calcio, fisión y fusión mitocondrial, la concentración de lípidos de las membranas mitocondriales y la transición de permeabilidad mitocondrial (TPM). Es probable que la enfermedad mitocondrial que conduce a neurodegeneración, al menos en alguna medida, implique todas estas funciones (DiMauro y Schon, 2008).

Hay pruebas de que la disfunción mitocondrial y la tensión oxidativa desempeñan un papel causal en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo en cuatro de las enfermedades mejor conocidas: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como enfermedad de Lou Gehrig).

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza clínicamente por deterioro cognitivo progresivo y patológicamente por la presencia de placas seniles compuestas principalmente de péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares compuestos principalmente de tau hiperfosforilada. Aproximadamente 5-10 % de los casos son familiares, produciéndose de una manera autosómica dominante, con aparición temprana. Se sabe que tres proteínas están asociadas con dichos casos familiares: proteína precursora amiloide (APP), que se escinde secuencialmente por  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas para producir A $\beta$ , y presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), una de las cuales es un componente de cada complejos de  $\gamma$ -secretasa. Hay bibliografía extensa que apoya un papel de la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo en la patogenia de EA. Se produce daño oxidativo temprano en el cerebro con EA, antes de la aparición de patología de placas significativa. El daño oxidativo también precede a la deposición de A $\beta$  en ratones APP transgénicos, produciéndose la regulación positiva de genes relacionados con el metabolismo mitocondrial y la apoptosis incluso antes y colocalizándose con las neuronas que experimentan daño oxidativo.

Se han descubierto recientemente varias rutas que relacionan la tensión oxidativa y la patología de la EA. La tensión oxidativa puede activar rutas de señalización que alteran el procesamiento de APP o tau. Por ejemplo, la tensión oxidativa aumenta la expresión de  $\beta$ -secretasa mediante activación de quinasa amino terminal c-Jun y proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) y aumenta la fosforilación aberrante de tau mediante activación de glucógeno sintasa quinasa 3. La inactivación inducida por oxidante de moléculas críticas también puede ser importante. En un estudio proteómico, se descubrió que la prolil isomerasa PIN1 era particularmente sensible al daño oxidativo. PIN1 cataliza cambios conformacionales de proteínas que afectan al procesamiento tanto de APP como de tau. La supresión de *Pin1* aumenta el procesamiento de APP amiloidogénica y niveles de A $\beta$  intracelular en ratones. Los ratones con *Pin1* inactivado también muestran hiperfosforilación de tau, déficits motores y conductuales y degradación neuronal. El daño inducido por oxidación de PIN1 y proteínas sensibles de forma similar podría por lo tanto ser importante para promover los procesos neurodegenerativos.

65

Las mitocondrias también desempeñan un papel importante en la enfermedad de Parkinson (EP) que se caracteriza clínicamente por rigidez progresiva, bradiquinesia y temblor y patológicamente por pérdida de neuronas pigmentadas en la sustancia negra y la presencia de inclusiones citoplasmáticas definidas de cuerpos de Lewy que inmuntifiñen con respecto a  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina.

Las mitocondrias estuvieron implicadas en primer lugar en EP debido a que la MPTP (1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), cuyo metabolito MPP+ inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, provocó parkinsonismo en adictos a drogas de diseño. Este modelo se ha refinado desde entonces en animales de laboratorio, en los que la infusión crónica de rotenona, otro inhibidor del complejo I, o MPTP da como resultado clínicamente un fenotipo de Parkinson y patológicamente degradación de la sustancia negra con inclusiones citoplasmáticas inmunorreactivas para  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina. El mecanismo de toxicidad en estos modelos de inhibición del complejo I probablemente implique tensión oxidativa. Se mostró que la inhibición del Complejo I y la tensión oxidativa eran relevantes para EP de origen natural cuando se descubrió deficiencia del Complejo I y agotamiento de glutatión en la sustancia negra de pacientes con EP idiopática y en pacientes con EP presintomática.

Muchos de los genes asociados con EP también implican mitocondrias en la patogenia de la enfermedad. Hasta ahora, se han identificado mutaciones o polimorfismos en ADNmt y al menos nueve genes nucleares con nombre que provocan EP o afectan al riesgo de EP:  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina carboxilo terminal hidrolasa L1, *DJ-1*, quinasa inducida por fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) 1 (*PINK1*), quinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (*LRRK2*), el receptor nuclear *NURR1*, *HTRA2*, y tau. De los genes nucleares,  $\alpha$ -sinucleína, parkina, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2* y *HTRA2* implican directa o indirectamente mitocondrias. En un número pequeño de casos, mutaciones de ADNmt heredadas dan como resultado parkinsonismo, típicamente como una característica de un síndrome mayor. En una familia, la mutación G11778A de atrofia óptica de Leber se asoció con parkinsonismo sensible a 1-DOPA, que se producen de forma variable conjuntamente con demencia, distonía, oftalmoplejia y ataxia. De forma destacable, esta mutación está en una subunidad del complejo I. Las mutaciones en el gen de ADNmt polimerasa-y codificada en el núcleo (*POLG*) alteran la replicación de ADNmt y dan como resultado múltiples supresiones de ADNmt, provocando típicamente oftalmoplejia externa progresiva crónica y miopatía. En dichas familias, las mutaciones de *POLG* también se segregan conjuntamente con parkinsonismo.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza clínicamente por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad de tejido muscular, que refleja la degradación neuronas motoras superiores e inferiores en la corteza, el tronco encefálico y la médula espinal. Aproximadamente el 90 % de casos son esporádicos (SALS) y el 10 % son familiares (FALS). Aproximadamente el 20 % de casos familiares están provocados por mutaciones en la Cu/Zn-superóxido dismutasa (*SOD1*). Tanto en SALS como en FALS, las muestras *postmortem* y de biopsia de la médula espinal, nervios y músculos muestran anomalías en la estructura mitocondrial, el número y la localización. También se han detectado defectos en actividades de complejos de cadenas respiratorias en músculo y médula espinal.

La enfermedad de Huntington (EH) se caracteriza clínicamente por corea, alteraciones psiquiátricas y demencia y patológicamente por pérdida de neuronas de proyección larga en la corteza y el cuerpo estriado. La EH es heredada de una manera autosómica dominante y se debe a la expansión de una repetición de trinucleótido CAG en el gen de la huntingtina (*HTT*), que da lugar a un tramo de poliglutamina expandido en la proteína correspondiente. El número normal de repeticiones de CAG (Q) es menor de 36; los números de repeticiones mayores de 40 se asocian con enfermedad humana. Diversas series de indicios demuestran la implicación de disfunción mitocondrial en la EH. La espectroscopia por resonancia magnética nuclear revela aumento del lactato en la corteza y los ganglios basales. Los estudios bioquímicos muestran actividades reducidas de los complejos II y III de la cadena transportadora de electrones en el cerebro con EH humano. En células del cuerpo estriado ratones mutantes con introducción de *Htt*, la respiración mitocondrial y la producción de ATP están significativamente alteradas.

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, muerte o disfunción neuronal relacionada con la edad. Como se usa en el presente documento, "enfermedad neurodegenerativa" o, de forma equivalente, "trastorno neurodegenerativo", se refiere a cualquier afección que implique la pérdida progresiva de neuronas funcionales en el sistema nervioso central. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la enfermedad neurodegenerativa se asocia con muerte celular relacionada con la edad. Las enfermedades neurodegenerativas ejemplares incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como ELA y como enfermedad de Lou Gehrig), así como complejo de demencia asociado al SIDA, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia con cuerpos de Lewy, insomnio familiar letal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, atrofia de múltiples sistemas, neuroacantocitosis, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, esclerosis mielinoclástica difusa, ataxia espinocerebelar, degeneración combinada subaguda de la médula espinal, tabes dorsal, enfermedad de Tay-Sachs, encefalopatía tóxica, encefalopatía espongiiforme transmisible y síndrome de erizo inestable.

En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método se usa para tratar muerte o disfunción neuronal relacionada con la edad. Dicho método se dirige a la neurodegeneración que no es atribuible a una enfermedad neurodegenerativa específica, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

5 En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, una enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

10 En una realización del método desvelado en el presente documento, una enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

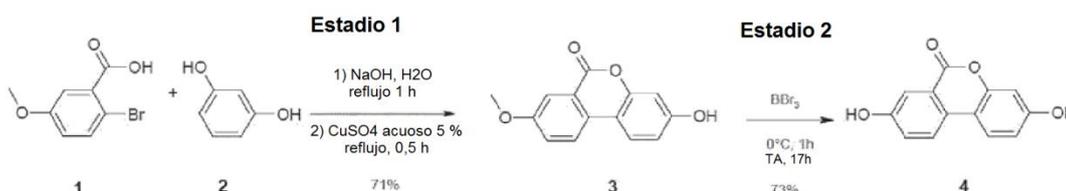
El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, tratando de este modo la enfermedad neurodegenerativa.

15 De acuerdo con la invención, una "urolitina", como se usa en el presente documento, se refiere a una cualquiera o una combinación de urolitina A, urolitina B, urolitina C y urolitina D (véase, por ejemplo, la FIG. 1 y la FIG. 2). En una realización, una urolitina es urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D o cualquier combinación de urolitina A, urolitina B, urolitina C y urolitina D. En una realización, una urolitina es urolitina A, urolitina B o una combinación de urolitina A y urolitina B. En una realización, una urolitina es urolitina A. En una realización, una urolitina se proporciona como una urolitina aislada, por ejemplo, aislada de una fuente natural o preparada por síntesis total. Pueden sintetizarse urolitinas aisladas de novo. Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2008/0031862 de Ghosal, cuyo contenido completo se incorpora por referencia en el presente documento.

20 En una realización, se sintetizó urolitina A (3,8-dihidroxi-dibenzo- $\alpha$ -pirona) en una síntesis de dos estados de la siguiente manera. El estadio 1 es una reacción catalizada por cobre que se produce en presencia de una base (reacción de Hurlley) donde los materiales de partida ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico y resorcinol se hacen reaccionar entre sí para generar el armazón de dihidro-dibenzopirona. En el estadio 2 la desmetilación de la benzopirona con  $\text{BBr}_3$  produce 3,8-Dihidroxi-dibenzo- $\alpha$ -pirona (urolitina A).

25 Una mezcla de ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico 1 (27,6 g), resorcinol 2 (26,3 g) e hidróxido de sodio (10,5 g) en agua (120 ml) se calentó a reflujo durante 1 hora. Después se añadió una solución acuosa al 5 % de sulfato de cobre (3,88 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 50 ml de agua) y la mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos adicionales. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y el sólido se filtró a través en un filtro de Büchner. El residuo se lavó con agua fría (50 ml) para proporcionar un sólido rojo claro (38,0 g) que se trituró en MeOH caliente (200 ml). La suspensión se dejó durante una noche a 4 °C. El precipitado rojo claro resultante se filtró y se lavó con MeOH frío (75 ml) para producir el compuesto titular 3 como un sólido marrón claro. La RMN de  $^1\text{H}$  es de acuerdo con la estructura de 3.

30 A una suspensión de 3 (10,0 g; 41 mmol; 1,0 eq.) en diclorometano seco (100 ml) se añadió a 0 °C una solución 1 M de tribromuro de boro en diclorometano seco (11,93 ml de  $\text{BBr}_3$  puro en 110 ml de diclorometano anhidro). La reacción se dejó a 0 °C durante 1 hora y después se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La solución se agitó a esa temperatura durante 17 horas. El precipitado amarillo se filtró y se lavó con agua fría (50 ml) para proporcionar un sólido amarillo que se calentó a reflujo en ácido acético (400 ml) durante 3 horas. La solución caliente se filtró rápidamente y el precipitado se lavó con ácido acético (50 ml) y después con éter de dietilo (100 ml) para producir el compuesto titular 4 como un sólido amarillo. La estructura y pureza se determinaron por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



En una realización, una "urolitina" como se usa en el presente documento es o puede incluir una urolitina glucuronada, metilada o sulfatada.

55 El método desvelado en el presente documento puede usarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que se sepa que es útil para tratar la enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, en un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método puede combinarse con el uso de uno cualquiera o más de

inhibidores de acetilcolinesterasa, tales como donepezilo (Aricept®), galantamina (Razadyne®) y rivastigmina (Exelon®) y antagonistas del receptor de N-metil D-aspartato (NMDA), tales como memantina (Namenda®).

5 También se desvela en el presente documento un método para mejorar la función cognitiva. Como se usa en el presente documento, "función cognitiva" se refiere a cualquier proceso mental que implica operaciones simbólicas, por ejemplo, percepción, memoria, atención, comprensión del habla, generación del habla, comprensión lectora, creación de imágenes, aprendizaje y razonamiento. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la "función cognitiva" se refiere a uno cualquiera o más de percepción, memoria, atención y razonamiento. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, la "función cognitiva" se refiere a memoria.

10 El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite cognición mejorada una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, mejorando de este modo la función cognitiva.

15 Se conocen bien métodos para medir la función cognitiva y pueden incluir, por ejemplo, ensayos individuales o en batería para cualquier aspecto de la función cognitiva. Uno de dichos ensayos es el ensayo de función cognitiva de Prudhoe. Margallo-Lana *et al.* (2003) J Intellect Disability Res. 47:488-492. Otro de dichos ensayos es el miniexamen de estado mental (MMSE), que se ha diseñado para evaluar la orientación con respecto al tiempo y el lugar, registro, atención y cálculo, recuerdo, uso y comprensión del lenguaje, repetición y órdenes complejas. Folstein *et al.* (1975) J Psych Res. 12:189-198. Otros ensayos útiles para medir la función cognitiva incluyen la escala de evaluación de enfermedad de Alzheimer-cognitiva (ADAS-Cog) (Rosen *et al.* (1984) Am J Psychiatry. 141(11):1356-64) y la batería automática de ensayos neuropsicológicos de Cambridge (CANTAB) (Robbins *et al.* (1994) Dementia. 5(5):266-81). Dichos ensayos pueden usarse para evaluar la función cognitiva de una manera objetiva, de modo que los cambios en la función cognitiva, por ejemplo en respuesta al tratamiento de acuerdo con métodos de la invención, pueden medirse y compararse.

25 El método desvelado en el presente documento puede usarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que se sepa que mejora la función cognitiva. Por ejemplo, En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método se combina con el uso de cafeína o nicotina o ambos.

30 En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el sujeto no tiene un trastorno cognitivo. Por ejemplo, el método puede usarse para potenciar la función cognitiva en un sujeto que tenga función cognitiva normal.

35 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno cognitivo. Como se usa en el presente documento, un trastorno cognitivo se refiere a cualquier afección que altere la función cognitiva. En una realización, el "trastorno cognitivo" se refiere a uno cualquiera o más de delirio, demencia, trastorno del aprendizaje, trastorno de déficit de atención (TDA) y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (THDA). En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo es trastorno de déficit de atención (TDA). En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno cognitivo es trastorno por déficit de atención con hiperactividad (THDA).

45 El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento de un trastorno cognitivo una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno cognitivo.

50 El método desvelado en el presente documento puede usarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que se sepa que es útil para tratar un trastorno cognitivo. Por ejemplo, en un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método se combina con el uso de un estimulante, tal como metilfenidato (por ejemplo, Ritalin®), dextroanfetamina (Dexedrine®), sales de anfetamina mixtas (Adderall®), dextrometanfetamina (Desoxyn®) y lisdexanfetamina (Vyvanase®).

55 También se desvela en el presente documento un método de tratamiento o prevención de una disfunción cognitiva inducida por el estrés o relacionada con el estrés. Como se usa en el presente documento, una "disfunción cognitiva inducida por el estrés o relacionada con el estrés" se refiere a una alteración de la función cognitiva que es inducida por o está relacionada con el estrés. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento o prevención de una disfunción cognitiva inducida por el estrés o relacionada con el estrés una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar o prevenir la disfunción cognitiva inducida por el estrés o relacionada con el estrés.

60 Trastornos anímicos

El tejido cerebral requiere un alto nivel de energía para su metabolismo, incluyendo el mantenimiento del potencial transmembrana, la transducción de señales y la remodelación sináptica. Un aumento de síntomas y trastornos psiquiátricos, en particular depresión, esté probablemente presente en pacientes con trastornos mitocondriales.

Se ha mostrado que la estructura y función mitocondrial, medidas por una diversidad de técnicas diferentes, son anómalas en pacientes con trastornos anímicos, incluyendo depresión mayor así como en los otros trastornos del espectro afectivo.

5 Dos estudios han revelado que una probabilidad aumentada varias veces de desarrollar depresión puede heredarse por vía materna junto con el ADNmt, lo que sugiere en gran medida que las variantes de secuencias de ADNmt pueden inducir disfunción mitocondrial que puede predisponer a individuos al desarrollo de depresión (Boles *et al.*, 2005; Burnett *et al.*, 2005).

10 La relación entre la disfunción mitocondrial y la depresión unipolar se ha explorado en varios estudios. En estudios de cerebro *postmortem* de sujetos con depresión mayor probable o diagnosticada, para la que la mayoría de sujetos estarían (probablemente) medicados, no se pudo detectar ningún aumento de la supresión de ADNmt de 5 kb (Kato *et al.*, 1997; Sabunciyani *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008, Stine *et al.*, 1993). Se encontraron alteraciones de productos de la traducción ligadas a la función mitocondrial en las cortezas visuales frontal, prefrontal y terciaria (Karry *et al.*, 15 2004; Whatley *et al.*, 1996). Se han indicado alteraciones de cuatro proteínas localizadas en las mitocondrias en la corteza cingular (Beasley *et al.*, 2006). También se ha indicado expresión génica reducida para 6 de 13 transcritos codificados por ADNmt en el tejido de la corteza frontal (áreas de Brodmann (AB) 9 y 46) (Shao *et al.*, 2008) y de ARNm mitocondrial codificado por ADNn y proteínas en el cerebelo en la depresión mayor (Ben-Shachar y Karry, 2008). Se descubrió que los niveles de una subunidad del complejo de cadena transportadora de electrones I (NDUFS7) y actividad del complejo I, en corteza prefrontal *postmortem* estaban por debajo de o en el intervalo más bajo de los controles normales en la mitad de los casos de trastorno depresivo mayor en un estudio reciente (Andreazza *et al.*, 2010). En los últimos dos estudios, los autores fueron incapaces de detectar cualquier efecto de la 20 medicación en los resultados.

25 Se descubrieron reducciones de las relaciones de enzimas de cadena respiratoria y las tasas de producción de ATP y una prevalencia aumentada de supresiones de ADNmt pequeñas (pero no de la supresión de ADNmt de 5 kb habitual) en músculo de pacientes con un diagnóstico durante toda la vida de depresión unipolar mayor con síntomas físicos conjuntos. La medicación no pareció influir en los resultados (Gardner *et al.*, 2003b). Se sugirió relevancia clínica por el hallazgo de que esencialmente todos los sujetos deprimidos con grados muy altos de dolencias somáticas demostraron bajas tasas de producción de ATP en músculos de los que se tomaron biopsias (Gardner y Boles, 2008a). 30

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno anímico (también conocido como un trastorno afectivo). Como se usa en el presente documento, un "trastorno anímico" se refiere a una alteración del estado emocional, tal como se expone en el *Diagnostics and Statistical Manual of Mental Disorders*, publicado por la Asociación Psiquiátrica Estadounidense. Los trastornos anímicos incluyen pero sin limitación depresión mayor, depresión postparto, distimia y trastorno bipolar. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el trastorno anímico es depresión mayor. 35

40 El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento de un trastorno anímico una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno anímico.

El método desvelado en el presente documento puede usarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que se sepa que es útil para tratar un trastorno anímico. Por ejemplo, En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método se combina con el uso de un agente antidepressivo. Los agentes antidepressivos se conocen bien en la técnica e incluyen inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN), antidepressivos noradrenérgicos y serotonérgicos específicos, inhibidores de la recaptación de noradrenalina, inhibidores de la recaptación de noradrenalina y dopamina, inhibidores selectivo de la recaptación de serotonina, desinhibidores de noradrenalina y dopamina, antidepressivos tricíclicos e inhibidores de la monoamina oxidasa. 45 50

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento o prevención de un trastorno anímico inducido por el estrés o relacionado con el estrés. Como se usa en el presente documento, un "trastorno anímico inducido por el estrés o relacionado con el estrés" se refiere a una alteración del estado emocional que es inducida por o está relacionada con el estrés. Dichos trastornos anímicos se denominan en ocasiones trastornos anímicos reactivos y deben distinguirse de otros trastornos anímicos, por ejemplo, los denominados trastornos anímicos orgánicos. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento o prevención de un trastorno anímico inducido por el estrés o relacionado con el estrés una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar o prevenir el trastorno anímico inducido por el estrés o relacionado con el estrés. 55 60

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de un trastorno de ansiedad. Como se usa en el presente documento, un "trastornos de ansiedad" se refiere a un estado disfuncional de miedo y ansiedad, por ejemplo, miedo y ansiedad que es desproporcionado para una situación tensa o la anticipación de una situación tensa. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, un trastorno de ansiedad es una cualquiera o una combinación de trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, 65

agorafobia, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo y trastorno de estrés postraumático. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, un trastorno de ansiedad es uno cualquiera o una combinación de trastorno de ansiedad generalizado, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico, trastorno de estrés postraumático y trastorno de ansiedad social. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, un trastorno de ansiedad es trastorno de estrés generalizado. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, un trastorno de ansiedad es trastorno de estrés postraumático. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, un trastorno de ansiedad es trastorno de ansiedad inducida por estrés.

El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento de un trastorno de ansiedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar el trastorno de ansiedad.

El método desvelado en el presente documento puede usarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que se sepa que es útil para tratar un trastorno de ansiedad. Por ejemplo, en un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método se combina con el uso de uno cualquiera o una combinación de psicoterapia, benzodiazepinas, buspirona (Buspar®) o beta-bloqueadores. Las benzodiazepinas son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, clonazepam (Klonopin®), lorazepam (Ativan®) y alprazolam (Xanax®). Los fármacos adicionales que pueden usarse en combinación con los métodos incluyen imipramina (Tofranil®) y venlafaxina (Effexor®).

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento o prevención de un trastorno de ansiedad inducido por el estrés o relacionado con el estrés. Como se usa en el presente documento, un "trastorno de ansiedad inducido por el estrés o relacionado con el estrés" se refiere a un estado disfuncional de miedo y ansiedad que es inducido por o está relacionado con el estrés. Dichos trastornos de ansiedad se denominan en ocasiones trastornos de ansiedad reactivos y deben distinguirse de otros trastornos de ansiedad, por ejemplo, los denominados trastornos de ansiedad orgánicos. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite tratamiento o prevención de un trastorno de ansiedad inducido por el estrés o relacionado con el estrés una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina, para tratar o prevenir el trastorno de ansiedad inducido por el estrés o relacionado con el estrés.

También se desvela en el presente documento un método para promover el crecimiento de neuritas. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método es un método *in vitro*. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método es un método *in vivo*. Como se usa en el presente documento, una "neurita" se refiere a cualquier proyección del cuerpo celular de una neurona. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, dicha proyección es un axón. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, dicha proyección es una dendrita. El término se usa frecuentemente cuando se habla de neuronas inmaduras o en desarrollo, especialmente de células en cultivo, debido a que puede ser difícil diferenciar axones de dendritas antes de que la diferenciación se complete. Las neuritas con frecuencia se empaquetan con haces de microtúbulos, cuyo crecimiento es estimulado por el factor de crecimiento nervioso (NGF), así como proteínas tau, proteína asociada a microtúbulos 1 (MAP1) y proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2). La molécula de adhesión celular neural N-CAM se combina simultáneamente con otra N-CAM y un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos para estimular la actividad tirosina quinasa de ese receptor para inducir el crecimiento de neuritas.

El crecimiento de neuritas puede medirse morfológica o funcionalmente. La medición morfológica típicamente implica examen microscópico con medición de la longitud y/o el número de neuritas.

Como se usa en el presente documento, "promover" se refiere a potenciar o inducir. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, "promover" significa inducir. Por ejemplo, el crecimiento de neuritas en una muestra de control negativo puede ser insignificante, mientras que el crecimiento de neuritas en una muestra experimental o de tratamiento puede ser no insignificante. En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, "promover" significa potenciar. Por ejemplo, el crecimiento de neuritas en una muestra de control negativo puede ser no insignificante, mientras que el crecimiento de neuritas en una muestra experimental o de tratamiento puede ser estadísticamente significativamente mayor que el control negativo. Por supuesto "promover" como se usa en el presente documento puede abarcar tanto potenciar como inducir.

En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método incluye la etapa de poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad eficaz de una urolitina, para promover el crecimiento de neuritas.

En un ejemplo del método desvelado en el presente documento, el método incluye la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la urolitina, para promover el crecimiento de neuritas.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con cualquier método o compuesto que se sepa que es útil para promover el crecimiento de neuritas. Por ejemplo, en un ejemplo del método desvelado en el presente documento, un método puede combinarse con el uso de uno cualquiera o más de NGF, proteína tau, MAPI, MAP2, N-CAM, o un agente que induce la expresión de uno cualquiera o más de NGF, proteína tau, MAPI, MAP2, N-CAM, o receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.

Usando células neuronales *in vitro* para explorar compuestos con respecto a actividades neuroprotectoras

En los procesos de envejecimiento y neurodegeneración, el deterioro progresivo de la función cognitiva se debe esencialmente a la pérdida de entidades que mantienen la comunicación neuronal. Estas entidades están compuestas esencialmente de cuerpos celulares neuronales, neuritas y contactos sinápticos que las conectan con células diana. Las neuronas presentan morfologías muy complejas. Los tipos celulares neuronales más complejos, tales como neuronas motoras que extienden prolongaciones hasta de un metro de largo o neuronas dopaminérgicas nigricas que realizan más de 150.000 contactos sinápticos, serán con frecuencia los más vulnerables en el envejecimiento normal o la enfermedad. Para mantener dicha arquitectura compleja y transmitir eficazmente señales eléctricas y neuroquímicas, las neuronas se basan en gran medida en el aporte de energía. Por lo tanto, el transporte axónico, la actividad sináptica y el mantenimiento de gradientes iónicos depende en gran medida de la función mitocondrial. Para llevar a cabo estas funciones celulares exigentes, las neuronas experimentan a lo largo del tiempo dificultades para mantener el delicado equilibrio de la actividad mitocondrial y la consiguiente tensión oxidativa. Dicho desequilibrio se considera con frecuencia la causa de la disfunción neuronal o degradación prematura.

Por lo tanto, se espera que cualquier tratamiento que promueva la supervivencia de neuronas, o la formación de las prolongaciones neuronales y contactos sinápticos que construyen la arquitectura neuronal compleja influya positivamente en las funciones neuronales. La medición de efectos de compuestos en la función neuronal típicamente se basa en la supervisión tediosa de resultados conductuales animales, que no es susceptible de exploración de rendimiento medio o alto de actividades biológicas. Los modelos *in vitro* basados en líneas celulares de neuroblastoma o cultivos neuronales primarios representan un sustituto aceptado para evaluar efectos del compuesto en parámetros morfológicos cruciales, que reflejarán la capacidad de las neuronas para mantener su función normal en el cerebro de mamíferos. Los indicadores tales como el número de prolongaciones, su longitud o complejidad revelarán efectos del compuesto en etapas críticas de señalización intracelular. Aunque debería tenerse en cuenta que dichos parámetros solamente reflejan de forma indirecta el rendimiento de funciones cerebrales superiores, proporcionan una evaluación valiosa de la eficacia del compuesto que puede traducirse en funciones cognitivas o motoras mejoradas en condiciones normales o enfermas.

#### Trastornos metabólicos

La función mitocondrial en tejidos metabólicos clave (hígado, músculo, tejido adiposo, páncreas) está implicada en la patogenia de enfermedades metabólicas. En cada uno de estos tejidos, la actividad oxidativa mitocondrial debe ser apropiada para oxidar completamente las cargas de nutrientes, particularmente ácidos grasos. El fracaso de la oxidación completa puede conducir a la acumulación de intermedios lipídicos, productos de oxidación de ácidos grasos incompletos y EOR. En conjunto, estos acontecimientos celulares contribuyen a la acumulación de grasas, resistencia a la insulina, secreción de insulina alterada, inflamación de grado bajo y tensión oxidativa, que son todos componentes de la diabetes mellitus de tipo II y obesidad.

La importancia de la actividad mitocondrial en la patogenia de enfermedades metabólicas se ha establecido en varios estudios en seres humanos. Por ejemplo, la resistencia a la insulina en músculo esquelético se ha asociado con un defecto en la fosforilación oxidativa mitocondrial, donde se observa una reducción del 30 % en la actividad mitocondrial en la descendencia resistente a la insulina de pacientes con diabetes de tipo 2 en comparación con sujetos de control. Petersen KF, *et al.* (2004) *New Engl J Med.* 350:664-71. También se ha observado que pacientes obesos presentan una reducción del 20 % en la actividad mitocondrial junto con una reducción del 35 % en el tamaño mitocondrial en comparación con sujetos delgados sanos. Petersen KF, *et al.* (2003) *Science* 300:1140-2. Finalmente, el deterioro asociado a la edad en la función mitocondrial contribuye a la resistencia a la insulina en los ancianos. En consecuencia, se ha indicado una reducción del 40 % en la actividad oxidativa y de fosforilación mitocondrial en los ancianos en comparación con sujetos jóvenes. Estas observaciones ligan la alteración de la función mitocondrial a trastornos metabólicos, especialmente "diabesidad" (Kelley DE, *et al.* (2002) *Diabetes* 51:2944-50).

La actividad oxidativa mitocondrial, también denominada fosforilación oxidativa, puede considerarse un determinante clave que subyace al riesgo de enfermedades metabólicas. Las reducciones de la actividad mitocondrial pueden estar mediada por factores genéticos (por ejemplo, historial familiar, etnia), mecanismos epigenéticos, exposiciones durante el desarrollo, conducta alimentaria y envejecimiento.

Cuando el exceso de fuente de energía prolongado (por ejemplo, por sobrealimentación o almacenamiento de grasas alterado) supera las necesidades energéticas y/o la capacidad oxidativa, y/o los mecanismos compensatorios apropiados son insuficientes (por ejemplo, debido a la inactividad o incapacidad de las mitocondrias para adaptarse a necesidades oxidativas celulares mayores), hay un riesgo aumentado de trastornos metabólicos. La acumulación de lípidos y la tensión oxidativa resultantes pueden alterar las respuestas transcripcionales y dañar las mitocondrias, reduciendo adicionalmente la capacidad de fosforilación oxidativa, sumándose a los efectos perjudiciales del exceso de fuente de energía que elevan el riesgo de trastornos metabólicos.

La suficiencia para oxidar completamente ácidos grasos reside en el equilibrio entre: (i) la actividad oxidativa mitocondrial neta (determinada por la necesidad de generar energía para cubrir las necesidades celulares, por ejemplo, contracción y transporte de iones) y (ii) disponibilidad de fuente de energía (determinada por consumo de alimento, adiposidad y capacidad de almacenamiento adiposo). Se consigue equilibrio cuando la actividad oxidativa es igual a o supera cargas de fuente de energía.

En condiciones homeostáticas normales, tanto la actividad oxidativa como la disponibilidad de fuentes de energía pueden alterarse para asegurar que la función mitocondrial sea apropiada para el ambiente metabólico ambiental. Por ejemplo, puede aumentarse la necesidad celular de energía mediante ejercicio y puede reducirse la disponibilidad de fuente de energía mediante pérdida de peso y/o consumo de alimento reducido. En este contexto, las variaciones interindividuales en la capacidad y/o actividad oxidativa, carga de fuente de energía o capacidad de modular la actividad mitocondrial (respuesta aguda), aumentar la capacidad mitocondrial (respuesta crónica) o resolver la tensión oxidativa podrían determinar el punto establecido de equilibrio metabólico. Dichas diferencias podrían hacerse prominentes particularmente en un ambiente obesogénico (uno caracterizado por ambientes que promuevan el aumento del consumo de alimento general, consumos de alimentos poco sanos e inactividad física). Por lo tanto, los individuos con una alta capacidad oxidativa o respuestas adaptativas tendrían alta tolerancia a altas cargas de fuente de energía. Por el contrario, los individuos con capacidad oxidativa reducida y/o respuestas adaptativas subóptimas serían intolerantes a cargas de fuente de energía moderadas altas, lo que conduce a acumulación de lípidos, oxidación incompleta, producción de EOR y resistencia a la insulina.

Con el tiempo, la compensación insuficiente dará como resultado resistencia a la insulina crónica y trastornos metabólicos. La capacidad oxidativa insuficiente podría resolverse por mecanismos compensatorios que aumentan la capacidad oxidativa (por ejemplo, ejercicio) o reducen la carga de fuente de energía (pérdida de peso). Sin embargo, estos cambios en el estilo de vida parecen habitualmente insuficientes o inalcanzables para la mayoría de sujetos con sobrepeso/obesos y diabéticos o prediabéticos de tipo 2.

Las mitocondrias son particularmente importantes para la función del músculo esquelético, dadas las altas necesidades oxidativas impuestas en este tejido por la contracción intermitente. Las mitocondrias desempeñan un papel crítico para asegurar los niveles adecuados de ATP necesarios para contracción por el sarcómero muscular. Esta necesidad de alto nivel de ATP por los sarcómeros ha contribuido probablemente a las distintas poblaciones subsarcoplémicas y asociadas al sarcómero de mitocondrias en el músculo. Por otra parte, las células musculares mantienen la flexibilidad metabólica, la capacidad de modular rápidamente la oxidación del sustrato en función de las condiciones hormonales y energéticas ambientales. Por ejemplo, el tejido muscular sano oxida predominantemente lípidos en el estado en ayunas, como se demuestra por el cociente respiratorio (CR) bajo, con posterior transición a oxidación de carbohidratos (CR aumentado) durante el estado con alimentación. La disponibilidad de fuentes de energía, particularmente lípidos, y la capacidad de oxidarlas dentro de las mitocondrias también son críticas para el ejercicio continuado. Por lo tanto, la capacidad funcional mitocondrial probablemente afecte directamente a la función metabólica muscular y, debido a su gran contribución a la masa corporal total, tenga un efecto significativo en el metabolismo de cuerpo completo. Esta posibilidad está apoyada por los hallazgos de contenido mitocondrial aumentado en músculo esquelético en un individuo con hipermetabolismo y resistencia al aumento de peso (síndrome de Luft).

#### Resistencia a la insulina y diabetes mellitus

El músculo esquelético es el mayor órgano sensible a la insulina en seres humanos, representando más del 80 % del consumo de glucosa. Por lo tanto, la resistencia a la insulina en este tejido tiene un efecto importante en la homeostasis de la glucosa de cuerpo completo. De hecho, se han observado múltiples defectos metabólicos en el músculo de sujetos resistentes a la insulina pero normoglucémicos con alto riesgo de desarrollo de la diabetes, incluyendo: (i) síntesis de glucógeno estimulada por insulina reducida; (ii) alteraciones en la transducción de señal de insulina; y (iii) acumulación de lípidos en músculo aumentada. Aunque sigue sin estar claro en la actualidad si cualquiera de estos defectos desempeña un papel causal en la resistencia a la insulina, el exceso de lípido intramiocelular se correlaciona fuertemente con la gravedad de la resistencia a la insulina, incluso después de la corrección con respecto al grado de obesidad, y se ha observado en músculos de múltiples tipos de fibras. Por otra parte, el exceso de lípido se ha ligado experimentalmente a la inducción de resistencia a la insulina y alteraciones en la transducción de señal de insulina. Por lo tanto, un posible mecanismo por el que la función mitocondrial deteriorada podría contribuir a la resistencia a la insulina es mediante metabolismo alterado de ácidos grasos. La carga lipídica tisular aumentada, como con la obesidad, y/o inactividad prolongada, puede conducir a la acumulación de acil coenzima A (CoA) grasa, diacilgliceroles, ceramidas, productos de oxidación incompleta y EOR, todos los cuales se han ligado experimentalmente a señalización y acción de insulina reducidas. Los mecanismos adicionales que ligan potencialmente la función oxidativa mitocondrial alterada a resistencia a la insulina incluyen: (i) síntesis de ATP reducida para funciones que requieran energía tales como captación de glucosa estimulada por insulina; (ii) anomalías en la homeostasis de calcio (necesaria para captación de glucosa inducida por ejercicio); y (iii) producción de ATP reducida durante el ejercicio, contribuyendo potencialmente a la reducción de la capacidad aeróbica, la fatiga muscular y la disminución del ejercicio voluntario a lo largo del tiempo, alimentando adicionalmente un círculo vicioso de resistencia a la insulina estimulada por inactividad.

La capacidad mitocondrial es central para la función clave de la secreción de insulina regulada por células beta ( $\beta$ ) pancreáticas. La secreción de insulina tanto rápida (primera fase) como más prolongada (segunda fase) dependen del metabolismo de la glucosa y la capacidad oxidativa mitocondrial; la oxidación de la glucosa aumenta la relación ATP/ADP, inhibiendo los canales de K-ATP de membrana plasmática y permitiendo que los canales de calcio abiertos por tensión se abran. El aumento de calcio citoplasmático desencadena después exocitosis de gránulos de insulina acoplados a membrana plasmática (primera fase). El reclutamiento posterior de gránulos a la membrana plasmática (segunda fase) parece depender de metabolitos mitocondriales producidos por anaplerosis. El metabolismo mitocondrial también es necesario para la producción transitoria, controlada, de EOR, que es necesaria para las rutas de señalización mitocondrial que desencadenan exocitosis de gránulos.

La diabetes mitocondrial solamente se desarrolla con el envejecimiento, con una edad promedio de aparición de entre 35 y 40 años para diabetes heredada por vía materna con sordera (MIDD) y 48 años para 14577 T/C, una mutación de sentido erróneo de ADN mitocondrial en la diabetes de tipo 2 heredada por vía materna. Esto contrasta con la aparición en la infancia temprana de diabetes en síndromes tales como diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes 2 (MODY2), en la que una mutación en glucoquinasa, la primera etapa de la glucólisis, da como resultado generación de ATP estimulada por glucosa atenuada y secreción de insulina. Estos datos sugieren que es más probable que la diabetes mitocondrial resulte de un deterioro gradual de la función de células  $\beta$ , en lugar de una alteración funcional aguda debida a producción de ATP insuficiente.

La función mitocondrial en tejidos implicados en la patogenia de la diabetes mellitus (hígado, músculo, tejido adiposo y células  $\beta$  pancreáticas) es crítica para múltiples aspectos del metabolismo celular. En cada uno de estos tejidos, la actividad oxidativa mitocondrial debe ser apropiada para oxidar completamente las cargas de nutrientes, particularmente ácidos grasos. El fracaso de la oxidación completa puede conducir a la acumulación de intermedios lipídicos, productos de oxidación de ácidos grasos incompletos y EOR, inducción tanto de resistencia a la insulina (músculo, hígado, tejido adiposo) como secreción alterada (células  $\beta$ ).

Deficiencias leves en la actividad mitocondrial y/o una incapacidad para aumentar la actividad y capacidad en respuesta a necesidad de energía celular, podrían explicar la reducción de la capacidad de ejercicio vista en individuos con un historial familiar de diabetes mellitus. Con el tiempo, este fenotipo podría contribuir a reducción del ejercicio voluntario y aumentar la probabilidad de un desequilibrio entre la actividad mitocondrial y la carga de ácidos grasos. En segundo lugar, el desequilibrio crónico en el metabolismo de energía debido a sobrealimentación, obesidad e inactividad podría contribuir directamente al aumento de la producción de EOR celular y mitocondrial. A su vez, EOR excesivas pueden inducir tanto resistencia a la insulina como disfunción mitocondrial. Por ejemplo, una dieta alta en grasas, alta en sacarosa, en el ratón C57BL6 propenso a la diabetes provoca alteraciones mitocondriales en paralelo con producción de EOR potenciada y sensibilidad a insulina alterada. De forma similar, la exposición de células musculares *in vitro* a ácidos grasos saturados o alimentación alta en grasas en ratones da como resultado alteraciones de la estructura mitocondrial y resistencia a la insulina, ambas de las cuales son invertidas por antioxidantes. Por lo tanto, la tensión oxidativa puede inducir disfunción mitocondrial en paralelo con resistencia a la insulina, quizás una respuesta adaptativa dirigida a limitar más daño oxidativo. Es importante destacar que, la resolución de la tensión oxidativa puede invertir la resistencia a la insulina.

#### Rendimiento muscular

También se proporcionan en el presente documento métodos para potenciar el rendimiento muscular administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto, formulación o compuesto potenciador o activador de mitocondrias. Por ejemplo, extractos que contienen elagitaninos o ácido elágico, o composiciones que contienen elagitaninos, ácido elágico o urolitinas actúan para activar las mitocondrias y pueden ser útiles para mejorar la resistencia física (por ejemplo, capacidad de realizar una tarea física tal como ejercicio, trabajo físico, actividades deportivas), inhibir o retardar la fatiga física, potenciar los niveles de oxígeno en sangre, potenciar la energía en individuos sanos, potenciar la capacidad de trabajo y la resistencia, reducir la fatiga muscular, reducir el estrés, potenciar la función cardíaca y cardiovascular, mejorar la potencia sexual, aumentar los niveles de ATP en músculo y/o reducir el ácido láctico en sangre. En determinados ejemplos de los métodos desvelados en el presente documento, los métodos implican administrar una cantidad de un extracto natural que contiene elagitanino o ácido elágico, o composiciones que contienen elagitaninos, ácido elágico o urolitina, que aumentan la actividad mitocondrial, aumentan la biogénesis mitocondrial y/o aumentan la masa mitocondrial.

El rendimiento deportivo se refiere a la capacidad de los músculos de un atleta para rendir cuando participa en actividades deportivas. El rendimiento deportivo, la fuerza, la velocidad y la resistencia potenciados se miden por un aumento de la fuerza de contracción muscular, aumento de la amplitud de contracción muscular o acortamiento del tiempo de reacción muscular entre la estimulación y la contracción. Atleta se refiere a un individuo que participa en deportes a cualquier nivel y que busque conseguir un nivel mejorado de fuerza, velocidad o resistencia en su rendimiento, tal como, por ejemplo, culturistas, ciclistas, corredores de larga distancia y corredores de corta distancia. El rendimiento deportivo potenciado se manifiesta por la capacidad de superar la fatiga muscular, la capacidad para mantener la actividad durante periodos de tiempo más largos y tener un ejercicio más eficaz.

Se contempla que las composiciones y métodos desvelados en el presente documento también serán más eficaces en el tratamiento de afecciones patológicas relacionadas con el músculo, incluyendo miopatías, enfermedades neuromusculares, tales como distrofia muscular de Duchenne, sarcopenia aguda, por ejemplo, atrofia muscular y/o caquexia asociada con quemaduras, reposo en cama, inmovilización de extremidades o cirugía mayor torácica, abdominal y/u ortopédica.

#### Estrés crónico

También se ha indicado que el estrés crónico tiene un efecto significativo en el rendimiento cognitivo y con más precisión en el aprendizaje y los procesos de memoria (Sandi 2004; Sandi y Pinelo-Nava 2007). Varios factores son determinantes en el efecto que el estrés crónico tendrá en la función cognitiva. Los niveles de estrés son importantes para determinar si el estrés actuará para facilitar la función cognitiva o será deletéreo. Se cree que en respuesta a situaciones estresantes el cuerpo induce hormonas de estrés, que producen un efecto en U invertido en el aprendizaje, la memoria y la plasticidad. Baldi *et al.* (2005) *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 3(1) 9-21; Joels (2006) *Trends Pharmacol Sci.* 27(5):244-50. Por lo tanto el nivel de estrés tiene un gran efecto en la función cognitiva, dando como resultado altos niveles de estrés altos niveles de hormonas de estrés y rendimiento reducido.

También se ha mostrado que la duración del estrés, crónico frente a agudo, desempeña un papel importante, con efectos definidos en la función cognitiva, así como la estructura y función cerebral (Sandi y Loscertales 1999; Pinnock y Herbert 2001). Además, el estrés actúa en el proceso de formación de memoria dando como resultado diferentes resultados, facilitándose la consolidación (almacenamiento de memoria) por el estrés agudo, e inhibiéndose la recuperación (recuerdo de memoria) (Roozendaal 2003). Además, la predictabilidad del estrés también desempeña un papel en la gravedad de los efectos observados en el rendimiento cognitivo (Maier y Watkins 2005).

Adicionalmente, el contexto en el que se produce el estrés crónico, así como diferencias individuales en la respuesta al estrés inherentes a individuos y sexos, desempeña un papel importante en la determinación del efecto cognitivo final del estrés crónico (Bowman, Beck *et al.* 2003; Shors 2004; Joels, Pu *et al.* 2006).

La base biológica para los efectos del estrés crónico aún no está bien definida. Sin embargo, una característica común observada es el papel clave de glucocorticoides en la mediación de las acciones tanto facilitadoras como alteradoras del estrés, en diferentes procesos y fases de la memoria. Aunque el mecanismo de acción de los glucocorticoides aún no se ha dilucidado, se ha mostrado *in vitro* que altera el crecimiento neuronal inducido por el factor de crecimiento nervioso (NGF). Unsicker *et al.* (1978) *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:3498-502. Asimismo, la estructura neuronal y de crecimiento de neuritas inducida por factores tales como NGF se correlaciona fuertemente con su actividad neuroprotectora, lo que sugiere de nuevo que la estructura neuronal es importante para la cognición.

#### *Estrés y remodelación estructural*

Inicialmente, el hipocampo era la región del cerebro que recibía atención estrecha debido a los muchos informes que indican efectos alteradores del estrés crónico en tareas de memoria dependientes del hipocampo. Sin embargo, el trabajo intenso está proporcionando ahora pruebas de un efecto más integral del estrés crónico por todo el cerebro, habiéndose indicado también cambios importantes en la corteza prefrontal y la amígdala. Los cambios de la ramificación dendrítica y la sinaptogénesis que se producen en la amígdala son posibles candidatos para participar en alteraciones anímicas inducidas por estrés. Además, se cree que los cambios que se producen en el hipocampo y la corteza prefrontal desempeñan un papel clave en las alteraciones anímicas inducidas por estrés.

*Hipocampo.* El hipocampo se conoce bien por su papel crucial en procesos de memoria. Las tareas dependientes del hipocampo generalmente se ven afectadas por manipulaciones del estrés tanto agudo como crónico. En los seres humanos, estudios de neuroimágenes han indicado atrofia del hipocampo en asociación con alteraciones cognitivas y neuropsiquiátricas relacionadas con el estrés y con glucocorticoides, incluyendo depresión.

En roedores, un efecto prominente y muchas veces replicado es una atrofia dendrítica en dendritas apicales de neuronas piramidales CA3. Esta ramificación dendrítica reducida se ha asociado con (i) una reducción de la densidad sináptica de sinapsis glutamatérgicas excitatorias; (ii) una contracción del volumen de las espinas dendríticas complejas denominadas excrescencias dendríticas, que se localizan en la dendrita apical proximal y el soma de células piramidales CA3 y que actúan como dianas postsinápticas para las entradas sinápticas de la fibra musgosa; y (iii) una reordenación de vesículas sinápticas y mitocondrias en los terminales aferentes de la fibra musgosa. A su vez, también se han presentado pruebas para la remodelación sináptica, con respecto a cambios en elementos sinápticos, para la región CA1 del hipocampo.

*Corteza prefrontal.* La corteza prefrontal (CPF), y más particularmente su parte media (CPFm), desempeña papeles claves en procesos cognitivos superiores (incluyendo la función ejecutiva, memoria de trabajo, atención), así como en la integración de información cognitiva y emocionalmente relevante. Debería observarse que la CPFm contiene altos niveles de receptores de glucocorticoides y está implicada en la regulación de la actividad hipotalámica-

hipofisaria-suprarrenal (HPA) inducida por estrés. Como se ha observado anteriormente, las pruebas clínicas destacan la CPFm como un área que experimenta alteraciones notables en una amplia diversidad de trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo depresión.

5 Hay pruebas sustanciales a partir de estudios de roedores de contracción dendrítica inducida por estrés en la CPF. En particular, se describió que se producía remodelación neuronal importante en la capa II/III de la CPFm como consecuencia de exposición repetida a estrés crónico o tratamiento de glucocorticoides repetido. Los principales cambios descritos en esta área son (i) una atrofia dendrítica, incluyendo tanto reducción de la longitud total como del número de dendritas apicales de neuronas piramidales; y (ii) una reducción de la densidad de espinas dendríticas apicales (aproximadamente un tercio de todas las sinapsis axoespinales en dendritas apicales de neuronas piramidales se pierden).

15 *Efectos antidepresivos.* Se ha mostrado que el tratamiento con el antidepresivo atípico (tricíclico modificado) invierte la atrofia dendrítica inducida por estrés crónico en neuronas piramidales CA3 en ratas. Por otra parte, también se ha indicado que los antidepresivos facilitan el brote axónico y dendrítico. Estos hallazgos sugieren que los antidepresivos pueden tener un efecto importante en la remodelación neuronal, proporcionando la base para que circuitos relevantes se reorganicen en el transcurso de la recuperación de depresión.

#### 20 Estrés en la vida temprana

También se desvela en el presente documento un método para tratar efectos anímicos del estrés en la vida temprana. El método desvelado en el presente documento incluye la etapa de administrar un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de urolitina, para tratar los efectos del estrés en la vida temprana en el estado de ánimo, depresión, ansiedad y comportamiento de asunción de riesgos.

25 Se ha indicado que el estrés en la vida temprana tiene un efecto perjudicial significativo en el rendimiento cognitivo, incluyendo parámetros psicológicos tales como aumento de las tasas de o susceptibilidad a la depresión, ansiedad y comportamiento de asunción de riesgos anómalo. Heim C, Nemeroff CB. (2001) Biol Psychiatry 49:1023-1039. Se han indicado mayores tasas de trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA), trastorno de estrés posttraumático (TEPT) y depresión mayor en individuos que han experimentado estrés en la vida temprana. Famularo R *et al.* (1992) J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 31:863-867; Pelcovitz D *et al.* (1994) J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 33:305-312. Se cree que el estrés en la vida temprana tiene un efecto en el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HPA). Ladd CO *et al.* (2000) Prog Brain Res 122:81-103. El efector clave que se cree que controla la sensibilidad del eje de HPA al estrés es los factores liberadores de corticotropina centrales (CRF).

35 CRF es un péptido de 41 aminoácidos que se distribuye por todo el SNC. Esto incluye los cuerpos celulares de la región parvocelular media del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), un componente central del eje de HPA. Tras el estrés, se libera CRF de las terminales nerviosas de la eminencia mediana a la circulación portal hipotalamohipofisaria y se transporta a la hipófisis anterior donde se une con receptores de CRF (CRF1 y CRF2). La unión de CRF con el receptor de CRF1 produce efectos que son reminiscentes de estrés, depresión y ansiedad. La unión de CRF con el receptor CRF2 estimula la producción y liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que a su vez estimula la producción de glucocorticoides implicados en la respuesta al estrés.

45 En modelos de estrés en la vida temprana provocado por separación materna, se observa un nivel elevado a largo plazo uniforme de ARNm de CRF. Plotsky PM *et al.* (2005) Neuropsychopharmacology 30:2192-2204. Se ha mostrado que dichos aumentos de CRF tienen efectos en el nivel de amígdala en el aumento de respuesta a ansiedad. Se cree que una sensibilización persistente de los neurocircuitos de CRF es responsable de la ansiedad, depresión y comportamiento de asunción de riesgos anormalmente elevados observados en ratones expuestos a estrés en la vida temprana. *Estrategias actuales que emplean antidepresivos para mejorar trastornos psicológicos debidos a estrés en la vida temprana*

50 Varios estudios han mostrado que los antidepresivos reducen la actividad de CRF en el eje de HPA en roedores y primates, incluyendo seres humanos. Banki CM *et al.* (1992) J Affect Disord 25:39-45; Brady LS *et al.* (1992) Brain Res 572:117-125; Brady LS *et al.* (1991) J Clin Invest 87:831-837; De Bellis MD *et al.* (1993) Am J Psychiatry 150:656-657; Veith RC *et al.* (1993) Psychiatry Res 46:1-8. Varias clases de fármacos antidepresivos parecen producir una reducción de la actividad de uno o más sistemas neurales de CRF. Estos incluyen inhibidores de la captación de 5-HT (ISRS), que se ha mostrado que son eficaces en el tratamiento de varios trastornos psiquiátricos que se han asociado con estrés en la vida temprana (por ejemplo, depresión y TEPT). Hidalgo RB *et al.* (2000) J Psychopharmacol 14:70-76. De forma destacable, en un ensayo controlado por placebo aleatorio, los sujetos que habían experimentado estrés en la vida temprana y que padecían TEPT eran sensibles a fluoxetina. van der Kolk BA *et al.* (1994) J Clin Psychiatry 55:517-522. Asimismo, los ISRS, incluyendo fluoxetina y paroxetina, muestran eficacia significativa frente a placebo en el tratamiento de depresión de aparición temprana en niños y adolescentes. Martin A *et al.* (2000) Child Adolesc Psychiatr Clin N Am 9:135-157. También se ha descubierto que antidepresivos tricíclicos invierten la reactividad del eje de HPA aumentado al estrés en primates adultos expuestos a privación materna. Suomi SJ. (1991) Ciba Found Symp 156:171-183. Parece que varios fármacos disponibles,

incluyendo los ISRS, pueden ser beneficiosos en el tratamiento de niños y adultos expuestos a estrés en la vida temprana. Fisher PA *et al.* (2000) *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39:1356-1364.

#### Indicaciones adicionales

5 La invención también encontrará uso en el tratamiento de cualquiera de una diversidad de enfermedades y afecciones adicionales en las que la actividad mitocondrial defectuosa o disminuida participa en la patofisiología de la enfermedad o afección o en las que la función mitocondrial aumentada producirá un efecto beneficioso deseado. Como ejemplo, También se desvelan en el presente documento métodos y compuestos que pueden usarse para tratar la infertilidad masculina asociada con movilidad de los espermatozoides reducida. Nakada *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:15148-53. Como otro ejemplo, también se desvelan en el presente documento métodos y compuestos que pueden usarse para tratar la degeneración macular y otros trastornos oculares relacionados con la edad y heredados determinados. Khandhadia *et al.* (2010) *Expert Rev Mol Med*. 12:e34; Jarrett *et al.* (2010) *Ophthalmic Res*. 44:179-90. Otro ejemplo es un método para tratar la pérdida de audición, incluyendo pero sin limitación pérdida de audición relacionada con la edad. A la vista de estas y otras indicaciones, el método desvelado en el presente documento implica administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de una urolitina, como se desvela en el presente documento, para tratar la indicación.

#### Formulaciones y uso clínico

20 Un "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un vertebrado vivo. En una realización, un sujeto es un mamífero. En una realización, un sujeto es un ser humano.

25 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" como se usa en relación con una enfermedad, un trastorno o una afección de un sujeto, significa reducir en una cantidad detectable al menos una manifestación clínica u objetiva de la enfermedad, el trastorno o la afección de un sujeto. En una realización, el término "tratar" usado en relación con una enfermedad, un trastorno o una afección de un sujeto, significa curar la enfermedad, el trastorno o la afección de un sujeto.

30 La urolitina puede administrarse, sola o junto con otro agente, a un sujeto (por ejemplo, mamífero) de diversas maneras. Por ejemplo, la urolitina puede administrarse por vía oral o por vía parenteral. La vía parenteral incluye, sin limitación, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía intraarticular, por vía intrasinoval, por vía intraocular, por vía intratecal, por vía tópica, o por inhalación. Por tanto, la forma de la dosis de urolitina puede estar en una diversidad de formas, incluyendo alimentos naturales, alimentos procesados, zumos naturales, concentrados y extractos, soluciones inyectables, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, tiritas, formas de inhalación, pulverizaciones nasales, gotas nasales, colirios, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación sostenida.

40 Los compuestos de la presente invención pueden proporcionarse en forma aislada. Como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa sustancialmente retirado de otros compuestos o componentes con los que el compuesto de interés puede encontrarse de otro modo, por ejemplo, como se encuentra en la naturaleza. En una realización, un compuesto está aislado cuando está esencialmente completamente retirado de otros compuestos o componentes con los que el compuesto de interés puede encontrarse de otro modo. En una realización, un compuesto está aislado cuando es puro.

45 Los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en una diversidad de formulaciones para su administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes adecuados farmacéuticamente aceptables y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Por tanto, la administración de los compuestos se puede realizar de diversas maneras, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica e intratraqueal. El agente activo puede ser sistémico después de administración o puede localizarse mediante el uso de administración regional, administración intramural o uso de un implante que actúa para conservar la dosis activa en el sitio de implantación.

Los compuestos de la invención también se pueden formular como aditivos alimentarios, ingredientes alimentarios, alimentos funcionales, complementos dietéticos, alimentos médicos, nutracéuticos o complementos alimentarios.

60 En formas de dosificación farmacéuticas, los compuestos pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Pueden usarse también en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente ilustrativos y no son limitantes en modo alguno.

65 Para preparaciones orales, los compuestos pueden usarse solos o en combinación con aditivos adecuados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa,

manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

5 Los compuestos pueden formularse en preparaciones para inyecciones disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales, tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los compuestos pueden utilizarse en formulación de aerosol para administrar mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

15 Asimismo, los compuestos pueden prepararse en supositorios mezclando con una diversidad de bases tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carbowax y polietilenglicoles, que se funden a temperatura corporal, pero se solidifican a temperatura ambiente.

20 Pueden proporcionarse formas de dosificación unitarias para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en los que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención. De forma similar, las formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable, en los que cada unidad de dosificación, por ejemplo, ml o l, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención.

30 Se conocen bien en la técnica implantes para formulaciones de liberación sostenida. Los implantes se formulan como microesferas; férulas, etc., con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el hospedador. El implante que contiene los compuestos inhibidores puede colocarse próximo a un sitio de interés, de modo que la concentración local de agente activo aumenta en relación con el resto del cuerpo.

35 La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, transportador o vehículo farmacéuticamente. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el efecto para conseguir y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el hospedador.

45 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, transportadores o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Por otra parte, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

50 Para uso clínico, la urolitina se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para conseguir un efecto biológico deseado. Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir, en una única dosis o múltiples dosis, un efecto terapéutico deseado. Un experto en la materia puede determinar cantidades terapéuticamente eficaces basándose en estudios *in vitro*, preclínicos o clínicos, o cualquier combinación de los mismos.

55 La dosificación será en general de diaria a semanal. En una realización, la dosificación es al menos semanal. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una dosis una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana o cada dos días. En una realización, la dosificación es al menos diaria. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una o más dosis diarias.

60 Para uso clínico, una urolitina se administrará en general en una cantidad que varía de aproximadamente 0,2 - 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto. En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 2 - 120 mg de urolitina por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 4 - 90 mg de urolitina por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, la urolitina se administra en una dosis igual o equivalente a 8 - 30 mg de urolitina por kg de peso corporal del sujeto. Cualquier dosis dada puede administrarse como una única dosis o como dosis divididas.

65

5 En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 0,001 micromolar ( $\mu\text{M}$ ). En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 0,1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 5  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo en suero de al menos 10  $\mu\text{M}$ .

10 En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 0,001 micromolar ( $\mu\text{M}$ ). En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 0,1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 1  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 5  $\mu\text{M}$ . En una realización, la urolitina se administra en una dosis suficiente para alcanzar un nivel constante en suero de al menos 10  $\mu\text{M}$ . El nivel en suero mantenido puede medirse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o HPLC-MS.

20 En una realización, la urolitina se administra como zumo de granada en una cantidad de 25 ml a 5 l o una dosis equivalente de elagitaninos, ácido elálgico, urolitinas o cualquier combinación de los mismos. La tabla 4 muestra el consumo de diferentes compuestos de granada para diferentes niveles de zumo de granada. El intervalo abarca diferencias en la concentración de compuesto entre diferentes diversidades de granada. Para los cálculos de equivalentes de ácido elálgico, se supuso que el metabolismo de cada mol de punicalagina dio como resultado la liberación de 1 mol de ácido elálgico y que esta conversión se produjo con 100 % de eficacia. Los niveles de urolitina se determinaron suponiendo que todo el ácido elálgico presente, incluyendo el derivado de punicalagina, se convirtió en urolitina con 100 % de eficacia. No se tuvieron en cuenta otras fuentes de ácido elálgico además de punicalagina y ácido elálgico.

Tabla 4.

Equivalente de zumo (ml)	Punicalagina (mg/d)	Ácido elálgico (mg/d)	Equivalentes de ácido elálgico (1:1) (mg/d)	Urolitina total (1:1) (mg/d)
25	10-65	3-30	20-35	15-25
50	20-130	6-60	40-70	30-50
75	30-195	9-90	60-105	45-75
100	40-260	12-120	80-140	60-100
150	60-390	18-180	120-210	90-150
200	80-510	24-240	160-280	120-200
250	100-650	30-300	200-350	150-250
500	200-1300	60-600	400-700	300-500
750	300-1950	90-900	600-1050	450-750
1000	400-1600	120-1200	800-1400	600-1000
2000	800-3200	240-2400	1600-2800	1200-2000
3000	1200-4800	360-3600	2400-4200	1800-3000
4000	1600-6400	480-4800	3200-5600	2400-4000
5000	2000-13000	600-6000	4000-7000	3000-5000

30 En una realización, el sujeto no toma una urolitina para ningún fin distinto del uso en el tratamiento de una afección de acuerdo con la invención. En una realización, el sujeto no toma una urolitina para el tratamiento de aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección o inflamación.

### Ejemplos

35 La invención que se describe ahora en general, se entenderá más fácilmente por referencia a lo siguiente, que se incluye únicamente para fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención y no se pretende que limite la invención.

#### 40 Ejemplo 1

*Preparación de extractos funcionales de compuestos de granada*

Los extractos de granada descritos en la presente solicitud que contienen moléculas específicas se prepararon usando un procedimiento de extracción basándose en la adsorción de polifenoles en una columna basada en adsorción de polímeros convencional como se describe. Para la preparación de los extractos 31008 y 1108 obtenidos de zumo de granada, las granadas se exprimieron usando un proceso de exprimido y fabricación convencional y se adsorbieron en una resina cromatográfica polimérica como zumo puro. La resina Amberlite XAD-16 (Rohm y Haas) se empaquetó en columnas semipreparatorias y se cargó con el zumo extraído. La columna se lavó con agua para retirar los azúcares hasta su compleción (los niveles de Brix estuvieron por debajo de 0,1 %). Los polifenoles se eluyeron con etanol 100 %. El etanol restante se evaporó en vacío para producir un extracto concentrado que contenía 4,5 g de polifenol total por litro como se determinó usando el ensayo de Folin para contenido de polifenol total. El extracto 1011 se preparó de una manera similar al extracto 31008 y 1108, pero el extracto líquido se secó por pulverización después utilizando un secador por pulverización para producir un extracto en polvo final. Utilizando HPLC-MS para la identificación de compuestos, se descubrió que los extractos 31008, 1108 y 1011 contenían las moléculas punicalagina, punicalina, telimagrandina y pedunculagina.

El extracto 71109 obtenido de la cáscara de granada se preparó separando manualmente la cáscara de la pulpa de arilos de granada, seguido de exprimido con un exprimidor manual. Para extraer la cantidad máxima de polifenoles, el residuo/orujo de partes de granada exprimidas se empaparon en agua consecutivamente durante varios periodos de tiempo (5 minutos) para aumentar la eficacia de extracción. La solución de granada extraída se clarificó por centrifugación antes de adsorberse en la resina Amberlite XAD-16 cromatográfica polimérica (Rohm y Haas), empaquetada en columnas semipreparatorias y cargada con el agua extraída de cáscara de granada. La columna se lavó con agua para retirar los azúcares hasta su compleción (los niveles de Brix estuvieron por debajo de 0,1 %). Los polifenoles se eluyeron con etanol 100 %. El etanol restante se evaporó en vacío para producir un extracto concentrado que contenía 17,1 g de polifenol total por litro como se determinó usando el ensayo de Folin para contenido de polifenol total. Esta técnica es una modificación de métodos conocidos en este campo como se ha descrito en varios métodos publicados para purificación de polifenoles de diversas plantas y bayas. Tuck, K. L. y P. J. Hayball (2002) "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects." *J Nutr Biochem* 13(11):636-644; y Schieber, A., P. Hilt, *et al.* (2003) "A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace." *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 4:99-107.

Para la preparación de extracto 61109, se fraccionó un extracto acuoso de la granada utilizando cromatografía de división centrífuga. Las fracciones de aislamiento se liofilizaron para producir extracto 61109, altamente enriquecido en punicalagina (>90 %).

#### Purificación de punicalagina

##### Preparación de extracto

Se disolvió extracto de granada en 16 ml de la mezcla de fase orgánica/acuosa (1:1) y se filtró en un filtro de Teflón (0,45 µm),

##### Separación de punicalagina de extracto usando cromatografía de división centrífuga

Se realizó separación de punicalagina de extracto de granada utilizando cromatografía de división centrífuga CPC. El aparato de CPC fue un aparato FCPC® 1000 proporcionado por Kromaton Technologies (Angers, Francia) que se equipó con un rotor de 1000 ml de capacidad. Los disolventes fueron bombeados por una bomba de gradiente de alta presión binaria de 4 direcciones. Las muestras se introdujeron en la columna de CPC mediante una válvula de inyección de alta presión (Rheodyne) equipada con un asa de muestras de 20 ml. El efluente se supervisó con un detector de detección de matriz de diodos (DAD) equipado con una celda de flujo preparatoria. Se recogieron fracciones mediante un colector de fracciones. Las etapas de separación se realizaron a temperatura ambiente.

Para conseguir la extracción, la fase estacionaria se introdujo en primer lugar en la columna en el modo ascendente sin rotar y después se bombeó la fase móvil a través de la fase estacionaria hasta que se alcanzó un estadio de equilibrio. Después, la velocidad de rotación se aumentó de 0 a 1000 rpm y la fase móvil se bombeó a la columna a un caudal de 20 ml/min. Después de inyección de 10 g de extracto de granada, se recogieron fracciones de 20 ml cada minuto. El contenido de la fase orgánica saliente se supervisó mediante medición de absorbancia UV en línea a  $\lambda = 260$  nm.

Se usó un procedimiento de elución-extrusión para recuperar todos los compuestos de la columna: después de una elución clásica de 100 min, la fase móvil se reemplazó por la fase estacionaria usada como líquido móvil, hasta que todo el volumen contenido (1000 ml) se expulsó de la columna. Se obtuvo una fracción que contenía punicalaginas (mezcla de isómeros A y B) con 94-97 % de pureza cromatográfica entre 51 y 63 minutos de elución y se obtuvo una segunda fracción con una pureza cromatográfica de 85-88 % entre 64 y 79 min.

Para determinar el nivel de purificación, la muestra purificada se examinó usando HPLC-DAD a una longitud de onda de 260 nm. La muestra se procesó sobre una columna Prosontil C18, 5 µm, de 250 x 4 mm. Los disolventes usados fueron H<sub>2</sub>O mQ + TFA 9,1 %/Acetonitrilo + TFA 0,1 % a un caudal de 1 ml/min.

Ejemplo 2

*Ensayos de exploración in vitro para compuestos que promueven la potenciación de la expresión de genes mitocondriales en una línea celular de músculo esquelético prototípica (miotubos C2C12)*

5 Los músculos esqueléticos tienen un papel clave en la regulación de la homeostasis metabólica ya que están implicados en funciones metabólicas tales como gasto de energía y mantenimiento de la sensibilidad a la insulina. Estas funciones están estrechamente ligadas a la actividad mitocondrial y la alteración de la función mitocondrial tiene un papel causal en la homeostasis metabólica defectuosa y el desarrollo de trastornos metabólicos tales como diabetes de tipo 2, obesidad y dislipidemia. El perfil de expresión génica de genes implicados en la actividad mitocondrial en células C2C12 diferenciadas (miotubos) es un modelo apropiado para evaluar el efecto de los compuestos en la actividad mitocondrial evaluando numerosas rutas que reflejan la actividad mitocondrial, por ejemplo, biogénesis mitocondrial, glucólisis,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, cadena transportadora de electrones (CTE), dinámica mitocondrial.

15 Para evaluar los efectos de los compuestos en la expresión génica mitocondrial, los mioblastos C2C12 se diferenciaron en miotubos mediante privación de suero durante 4 días (Canto *et al* (2009) Nature. 458:1056-60). Los miotubos se incubaron durante 48 h con ácido elálgico o urolitina A a una concentración final de 1, 10 o 50  $\mu$ M (todos disueltos en DMSO, concentración final de 0,1 %). Se usó DMSO como un control (concentración final de 0,1 %). Al final del tratamiento, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se extrajo ARNm inmediatamente según las instrucciones del fabricante (reactivo de Trizol, Invitrogen) añadiendo 1 ml de reactivo de Trizol. Después de la extracción, se produjo ADNc mediante transcripción inversa según las instrucciones del fabricante.

25 Se realizó evaluación de los niveles de expresión de genes (PGC-1 $\alpha$ , Tfam, PFKFB3, CPT1b, MCAD, LCAD, Ndufa2, Cyt c y Mfn2) que controlan la función mitocondrial mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Watanabe *et al.* (2004) J Clin Invest. 113:1408-18) usando los siguientes conjuntos de cebadores (Dir: cebador directo; Inv: cebador inverso):

PGC-1 $\alpha$ :	(Dir)	AAGTGTGGAAGCTCTCTGGAAGCTG (SEQ ID NO: 1)
	(Inv)	GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG (SEQ ID NO: 2)
Tfam:	(Dir)	AAGTGTTTTTCCAGCATGGG (SEQ ID NO: 3)
	(Inv)	GGCTGCAATTTTCTAACCA (SEQ ID NO: 4)
PFKFB3:	(Dir)	TCATGGAATAGAGCGCC (SEQ ID NO: 5)
	(Inv)	GTGTGCTCACCGATTCTACA (SEQ ID NO: 6)
CPT1b:	(Dir)	CCCATGTGCTCCTACCAGAT (SEQ ID NO: 7)
	(Inv)	CCTTGAAGAAGCGACCTTTG (SEQ ID NO: 8)
MCAD:	(Dir)	GATCGCAATGGGTGCTTTTGATAGAA (SEQ ID NO: 9)
	(Inv)	AGCTGATTGGCAATGTCTCCAGCAAA (SEQ ID NO: 10)
LCAD:	(Dir)	GTAGCTTATGAATGTGTGCAACTC (SEQ ID NO: 11)
	(Inv)	GTCTTGCGATCAGCTCTTTCATTA (SEQ ID NO: 12)
Ndufa2:	(Dir)	GCACACATTTCCCCACACTG (SEQ ID NO: 13)
	(Inv)	CCCAACCTGCCATTCTGAT (SEQ ID NO: 14)
Cyt c:	(Dir)	TCCATCAGGGTATCCTCTCC (SEQ ID NO: 15)
	(Inv)	GGAGGCAAGCATAAGACTGG (SEQ ID NO: 16)
Mfn2:	(Dir)	ACGTCAAAGGGTACCTGTCCA (SEQ ID NO: 17)
	(Inv)	CAATCCCAGATGGCAGAACTT (SEQ ID NO: 18)

30 PGC-1  $\alpha$  (corregulador de PPAR $\gamma$  1 $\alpha$ ) y Tfam (factor de transcripción mitocondrial A) son reguladores maestros de la función mitocondrial, concretamente de la biogénesis mitocondrial y la oxidación fosforilante mitocondrial (OXFOSm). Un aumento de sus niveles de expresión revela una potenciación general de la actividad mitocondrial. La evaluación de otros genes diana implicados en funciones clave de las mitocondrias permite identificar las rutas potenciadas.

35 PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3) es una enzima clave de la glucólisis, es decir, el uso de glucosa para producir energía. En condiciones aerobias (es decir, cuando hay aportes de oxígeno), se usa piruvato producido a partir de glucosa mediante glucólisis mediante las mitocondrias para producir energía (ATP) a través del ciclo de Krebs. CPT1b (carnitina O-palmitoiltransferasa 1b), MCAD (acil CoA deshidrogenasa de cadena media) y LCAD (acil CoA deshidrogenasa de cadena larga) desempeñan un papel fundamental en la captación de ácidos grasos mitocondriales y  $\beta$ -oxidación, dos etapas críticas para la producción de energía a partir de ácidos grasos.

40 Ndufa2 (subunidad 2 del subcomplejo de NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 alfa) y Cyt c (citocromo c) son

subunidades del complejo I y IV de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, respectivamente. Estas proteínas tienen un papel esencial en la cadena respiratoria mitocondrial y producción de energía a partir de equivalente reducido producido por el ciclo de Krebs. Mfn2 (Mitofusina 2) está implicada en la dinámica mitocondrial y el proceso de fusión. Su expresión aumenta en el contexto de la remodelación mitocondrial aumentada y/o la biogénesis mitocondrial (número aumentado de mitocondrias por célula).

Los datos representados en la FIG. 3 indican claramente que el ácido elágico y la urolitina A aumentan la actividad mitocondrial de una manera dependiente de dosis modulando la expresión de numerosos genes implicados en varias rutas del metabolismo mitocondrial.

### Ejemplo 3

*Ensayos de exploración in vitro para compuestos que promueven la potenciación de la actividad mitocondrial en una línea celular de músculo esquelético prototípica (miotubos C2C12)*

Citrato sintasa es la enzima inicial del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la etapa limitante de la velocidad para entrar en el ciclo del TCA. El ciclo del TCA producirá NADH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub>, que se usan después para alimentar la cadena transportadora de electrones que generará un gradiente de protones (energía), que se usará en la generación de ATP. Por tanto, la citrato sintasa es un marcador exclusivo del número mitocondrial y de la actividad mitocondrial. Midiendo los efectos de compuestos o formulaciones en la actividad de la enzima citrato sintasa, es posible evaluar la capacidad de los compuestos para estimular la actividad de las mitocondrias (es decir, OXFOS y producción de ATP).

La enzima citrato sintasa cataliza la reacción entre acetil coenzima A (acetil CoA) y óxido oxaloacético para formar ácido cítrico. El acetil CoA aporta 2 carbonos a los 4 carbonos de oxaloacetato, dando como resultado citrato con 6 carbonos. La hidrólisis del tioéster de acetil CoA da como resultado la formación de CoA con un grupo tiol (CoA-SH). La actividad de citrato sintasa se mide mediante la reacción entre el tiol de CoA-SH con el DTNB en la mezcla para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Este producto amarillo (TNB) se observa espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 412 nm (kit de ensayo de citrato sintasa, número de cat CS0720, Sigma Aldrich).

Los mioblastos C2C12 se diferenciaron en miotubos mediante privación de suero durante 4 días (Canto *et al* (2009) Nature. 458:1056-60). Los miotubos se incubaron durante 48 h con punicalagina a una concentración final de 1 o 10 µM o con ácido elágico o urolitina 1, 10 o 50 µM (todos disueltos en DMSO, concentración final de 0,1 %). Se usó DMSO como un control (concentración final de 0,1 %). Al final del tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se ensayaron con respecto a actividad citrato sintasa según las instrucciones del fabricante (kit de ensayo de citrato sintasa, número de cat CS0720, Sigma Aldrich).

Como se representa en la FIG. 4, punicalagina, ácido elágico y urolitina aumentan la actividad citrato sintasa de una manera dependiente de dosis, ilustrando un aumento general de la actividad mitocondrial y/o densidad mitocondrial (número de mitocondrias por células). Estos resultados confirman los resultados obtenidos por el perfil de expresión génica de genes mitocondriales (Ejemplo 1) que muestran una potenciación de la actividad mitocondrial y la biogénesis mitocondrial en C2C12 diferenciados tratados.

Estadística: ANOVA de 1 vía \* p < 0,05.

### Ejemplo 4

*Ensayos de exploración in vitro para compuestos que promueven la actividad de proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en una línea celular de músculo esquelético prototípica (miotubos C2C12)*

AMPK actúa como un interruptor maestro metabólico que regula varios sistemas intracelulares incluyendo la captación celular de glucosa, la β-oxidación de ácidos grasos y la biogénesis del transportador de glucosa 4 (GLUT4) y mitocondrias. La capacidad sensora de energía de AMPK puede atribuirse a su capacidad de detectar y reaccionar a fluctuaciones en la relación de AMP:ATP que tienen lugar durante el reposo y el ejercicio (estimulación muscular). Como ejemplo, durante una sesión de ejercicio, la actividad de AMPK aumenta (fosforilación de AMPK, P-AMPK) mientras que la célula muscular experimenta tensión metabólica ocasionada por una necesidad celular extrema de ATP. Tras su activación (fosforilación de AMPK, P-AMPK), AMPK aumenta los niveles de energía celular inhibiendo las rutas de consumo de energía anabólicas (síntesis de ácidos grasos, síntesis de proteínas, etc.) y producción de energía estimulante, rutas catabólicas (oxidación de ácidos grasos, transporte de glucosa, etc.). En consecuencia, la activación de AMPK conduce a una potenciación de la función mitocondrial, incluyendo OXFOS aumentada y biogénesis mitocondrial.

Los mioblastos C2C12 se diferenciaron en miotubos mediante privación de suero durante 4 días (Canto *et al* (2009) Nature. 458:1056-60). Los miotubos se incubaron durante 1 h con resveratrol (RSV), que actuó como un control positivo, o ácido elágico (AE) o urolitina A (UL) a una concentración final de 50 µM (todos disueltos en DMSO, concentración final de 0,1 %). Se usó DMSO como un control (concentración final de DMSO: 0,1 %). Al final del

tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se evaluó la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) mediante transferencia de Western. Después del tratamiento del compuesto, las células C2C12 se lisaron en tampón que contenía inhibidores de fosfatasa y se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de Bradford convencional. El equivalente de 25 µg de proteína se usó para separación en un gel de SDS-PAGE 10 % y se transfirió posteriormente mediante procedimientos de transferencia de Western convencionales. Se usaron anticuerpos dirigidos a AMPK (Cell Signaling) y AMPK fosforilada (P-AMPK, Cell Signaling) para detección.

Como se representa en la FIG. 5, el análisis de transferencia de Western para la forma fosforilada, y por lo tanto activada, de AMPK, es decir, P-AMPK, indicó que los niveles de fosforilación de AMPK (P-AMPK) y por lo tanto activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) habían efectivamente aumentado con ácido eláxico o urolitina en relación con células tratadas con control. Estos datos indican que el ácido eláxico y la urolitina A son ambos activadores de AMPK. Esto apoya adicionalmente las observaciones de que el ácido eláxico y las urolitinas inducen un aumento en la función de las mitocondrias.

#### Ejemplo 5

##### *Ensayo de exploración para compuestos que promueven el crecimiento de neuritas en células PC-12*

Se ha mostrado que el crecimiento de neuritas y el número de prolongaciones medias por célula en cultivo neuronal corresponden a la función neuronal. Se ha mostrado que el estrés crónico da como resultado reducciones tanto de la longitud dendrítica como del número de ramas, un efecto que se invirtió tras la retirada del estrés. Asimismo, se ha mostrado que esta reversibilidad se inhibió con el envejecimiento (Bloss, Janssen *et al.* 2010). También hay pruebas adicionales de que el aprendizaje y las nuevas experiencias sensoriales están asociadas con aumentos de la formación de espinas y eliminación de prolongaciones extensas. Por lo tanto la plasticidad estructural sináptica desempeña un papel importante en el aprendizaje y la memoria (Yang, Pan *et al.* 2009). De hecho, el nivel de crecimiento de neuritas y el número de prolongaciones inducidos por compuestos tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF) se correlaciona con sus capacidades neuroprotectores. Con el envejecimiento esta plasticidad sináptica se ve comprometida y hay una pérdida aumentada de espinas y una densidad reducida de sinapsis (Dumitriu, Hao *et al.* 2010). Las enfermedades neurodegenerativas también tienen un efecto en el crecimiento de neuritas. Péptido A-beta (Aβ), que desempeña un papel importante en la enfermedad de Alzheimer, crecimiento de neuritas inhibido en células de neuroblastoma de ratón. Por lo tanto, ensayando los efectos en el crecimiento de neuritas *in vitro*, pueden identificarse compuestos y formulaciones con efectos neuroprotectores en neuronas con estrés crónico, neuronas que experimentan envejecimiento y neuronas presentes en enfermedades neurodegenerativas.

Los efectos *in vitro* en el crecimiento de neuritas de los diferentes elagitaninos y sus metabolitos punicalagina (PA), punicalina (PB), telimagrandina (TL), ácido eláxico (AE) y urolitina (UA), se ensayaron en células de una línea celular de feocromocitoma de ratas noradrenérgicas (células PC-12), que se ha mostrado que se diferencian en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Greene y Tischler 1976). Se ha mostrado que el crecimiento de neuritas en estas células PC-12 diferenciadas está fuertemente promovido por AMP cíclico de dibutililo (AMPcdb) (Gunning, Landreth *et al.* 1981), y este compuesto se utilizó como un control positivo. Como control negativo, se utilizó el inhibidor de quinasa N terminal de Janus (JNK) específico SP600125, que se ha mostrado que reduce diferentes parámetros de crecimiento de neuritas (Xiao, Pradhan *et al.* 2006). Los elagitaninos y sus metabolitos ensayados en los ensayos se sintetizaron u obtuvieron de proveedores que incluyeron Funakoshi, Sigma y Chemos. Las soluciones de reserva se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

Se cultivaron células PC-12 (ATCC CRL-1721) a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 % en matraces de cultivo revestidos de poli L-lisina en medio de cultivo completo (RPMI 1640 + suero de caballo termoinactivado 10 % + suero bovino fetal 5 %).

Se realizó diferenciación celular en matraces de cultivo 24 h después de la siembra en placas, en medio completo complementado con NGF 100 ng/ml (NGF 2,5 S, Invitrogen). El medio complementado con NGF se renovó cada tres días y se indujo diferenciación durante un periodo de 8 días.

Todos los compuestos para ensayar se prepararon justo antes del experimento como una solución de reserva 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración de DMSO final fue de 0,1 % en el medio de todos los grupos experimentales.

Para mediciones del crecimiento de neuritas, las células diferenciadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se recogieron después de desprendimiento y se volvieron a sembrar en placas a una densidad de 5.000 células/pocillo (placa de captura de imágenes de biorrecubrimiento de 96 pocillos) en medio completo complementado con NGF 100 ng/ml, con o sin SP600125 10 µM (control negativo), AMPcdb 1 mM (control positivo) o compuesto ensayado a 5 x 10<sup>-7</sup> M. En el grupo de control indiferenciado, no se añadió NGF después de volver a sembrar en placas.

Después de 72 h en cultivo, las células PC-12 se lavaron con PBS y se fijaron en solución de paraformaldehído 1 % durante 20 minutos. Después de 3 lavados con PBS, se realizó marcaje de inmunofluorescencia con sonda de

maleimida Texas Red, que reacciona con grupos tiol de restos de cisteína de proteínas, lo que permite la visualización de la morfología celular completa, incluyendo neuritas.

5 Se realizó análisis de inmunofluorescencia en microscopia confocal automática. Se adquirieron imágenes con un sistema 855 de ruta BD, con un objetivo X20 con montaje de campo 8X8. Después se midió el crecimiento de neuritas a partir de imágenes adquiridas con el módulo de neuritas de software Metamorph®. Se analizaron el crecimiento total y medio, el número total y medio de prolongaciones por célula y total y porcentaje de células con crecimiento extenso (definido como crecimiento de más de 20 µm).

10 Todos los compuestos, excepto PA y PB, aumentaron el número de células PC-12 en los pocillos en >30 %, como se muestra en la FIG. 6, lo que indica un efecto trópico para estos compuestos a una concentración de 0,5 µM ( $p < 0,001$  para UA, AE y TL frente a control diferenciado (ctrl)).

*Promoción del crecimiento de neuritas*

15 Como se muestra en la FIG. 7 y la FIG. 8, todos los compuestos ensayados (PA, PB, TL, AE y UA) fueron capaces de inducir crecimiento de neuritas robusto de células PC-12 diferenciadas. El crecimiento medio (FIG. 7) mostró un aumento de >30 % con respecto al control diferenciado para todos los compuestos ensayados. El porcentaje de células que mostraban crecimiento significativo (FIG. 8) fue significativamente mayor que el observado para células diferenciadas para todos los compuestos ensayados ( $p < 0,05$  para UA y PB (26 % de aumento),  $p < 0,01$  para PA (>26 % de aumento),  $p < 0,001$  para AE y TL, (>37 % de aumento)).

*Promoción de la formación y ramificación de prolongaciones*

25 Los compuestos PA, PB, UA, AE y TL, indujeron todos un aumento del número de prolongaciones cuando se aplicaron a células PC-12 diferenciadas. Los compuestos (UA,  $p < 0,05$  (15,7 % de aumento); PA,  $p < 0,01$  (26,3 % de aumento); AE y TL,  $p < 0,001$  (>31 % de aumento) fueron tan eficaces como o más eficaces que AMPcdb, el control positivo, en la promoción de la formación de prolongaciones (FIG. 9).

30 La ramificación de neuritas fue significativamente mayor que la observada en el control diferenciado, induciendo la mayoría de compuestos un aumento doble de la ramificación.

Ejemplo 6

35 *Ensayo de exploración para compuestos que promueven el crecimiento de neuritas en neuronas dopaminérgicas primarias TH positivas*

40 Las neuronas primarias debido a su estado no transformado, sirven como un buen modelo *in vitro* para los efectos de compuestos en marcadores de la plasticidad y diferenciación neuronal, tales como crecimiento neuronal y formación de dendritas y prolongaciones. Se examinaron los efectos de diferentes metabolitos de elagitaninos punicalagina (PA), urolitina (UA), ácido elágico (AE) y telimagrandina (TL) en este proceso. Los compuestos ensayados en los ensayos se obtuvieron de proveedores que incluyeron Funakoshi y Sigma, o se sintetizaron químicamente. Las soluciones de reserva se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

45 Se prepararon cultivos mesencefálicos primarios de embriones E14 de rata. El mesencéfalo ventral se diseccionó cuidadosamente y se disoció. Las células se sembraron después en placas en medio DMEM F12 que contenía suero de caballo termoinactivado 10 % a la densidad de 100.000 células/pocillo (placa de 96 pocillos), con o sin el inhibidor específico de JNK SP600125 (10 µM) (que actuó con un control negativo) o AMPcdb (1 mM) (que actuó como un control positivo), o los compuestos ensayados cada uno a las dosis de 0,1 µM.

50 72 h después de la siembra en placas, los efectos en el crecimiento de neuritas de neuronas dopaminérgicas tirosina hidroxilasa (TH) positivas se midieron a partir de imágenes adquiridas por microscopia confocal automática (objetivo X4, montaje 4X4) y que abarcaban la superficie del pocillo completa y se cuantificaron usando el módulo de crecimiento de neuritas del software Metamorph®. Se generaron por lo tanto varios parámetros representativos de crecimiento de neuritas: se analizaron el crecimiento total y medio, el número total y medio de prolongaciones por célula y total y porcentaje de células con crecimiento extenso (definido como crecimiento de más de 20 µm). Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

*Promoción del crecimiento de neuritas*

60 Tal como se muestra en las FIG. 10-16, los compuestos seleccionados en el ensayo de exploración de PC-12 anterior también fueron capaces de inducir crecimiento de neuritas en neuronas mesencefálicas primarias a una concentración de 0,1 µM. La mayoría de los compuestos fueron tan eficaces como AMPcdb en la promoción del crecimiento por célula (> 25 % de aumento del crecimiento) como se mide por el crecimiento medio por célula mostrado en la FIG. 10 ( $p < 0,001$  para UA, GA, AE, TL frente a control). Todos los compuestos ensayados tuvieron un rendimiento tan bueno como o mejor que AMPcdb (FIG. 11).

65

*Aumento de prolongaciones y ramificación de neuritas*

Todos los compuestos ensayados mostraron aumentos significativos en las prolongaciones medias por célula (> 10 %) (FIG. 12), así como en la longitud de prolongación máxima (> 10 %) (FIG. 13).

Las células primarias mostraron un aumento de la ramificación en presencia del control positivo (AMPcdb). Sin embargo, el inhibidor de JNK SP600125 no inhibió la ramificación de células primarias, como en células PC12, pero fue capaz de promover la ramificación aunque no hasta el mismo nivel que AMPcdb (60 % frente a 86 % de aumento visto para AMPcdb). Los compuestos UA, AE y TL fueron capaces de promover la ramificación hasta los mismos niveles que AMPcdb (> 111 % de aumento de la ramificación, FIG. 14).

*Aumentos de dendritas por célula y longitud de las dendritas*

El número de dendritas aumentó significativamente para UA, AE y TL, a niveles mayores que el de AMPcdb, mostrando todos los compuestos un aumento >18 % (FIG. 15).

Ácido elágico, urolitina A y telimagrandina todos produjeron aumentos de la longitud dendrítica > 26 %, mayores que los observados para AMPcdb (FIG. 16).

## Ejemplo 7

*Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A reducen el aumento de peso y la masa adiposa en ratones alimentados con una dieta alta en grasas*

Se obtuvieron ratones C57BL6/J macho de Charles River Laboratory (L'Arbresle, Francia) a la edad de 7 semanas y se aclimataron a la instalación animal durante 2 semanas antes del inicio de los experimentos. Los ratones se alojaron en grupos de 5 en condiciones de alojamiento convencionales, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y acceso libre a alimento y agua. Comenzando a las 9 semanas de edad, los ratones se alimentaron con una dieta alta en grasas (DAG) (60 % de kcal de grasa; D12492; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, Estados Unidos) durante catorce semanas. El peso corporal se supervisó semanalmente.

Se administraron a ratones en grupos de tratamiento diferentes (i) urolitina A mezclado con alimento (mezcla de alimento) hasta alcanzar una dosificación de 55 mg/kg de peso corporal/día (mkd); (ii) ácido elágico mezclado con alimento (mezcla de alimento) hasta alcanzar una dosificación de 75 mkd; (iii) punicalagina (sonda) hasta alcanzar una dosificación de 90 mkd; o (iv) extracto de granada (EG) (sonda) hasta alcanzar una dosificación de 140 mkd de polifenoles totales. Un extracto de granada típico usado en estos experimentos tuvo la siguiente composición: polifenoles, 140 mkd; punicalagina, 13,1 mkd; y ácido elágico, 13,2 mkd. Para animales tratados por sonda, se realizó una sonda diariamente (7 días/semana) entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana; se mezclaron compuestos con solución salina (NaCl 0,9 %) y se proporcionaron a un volumen final de 5 ml/kg de peso corporal. Los ratones con grupos de control de alta cantidad de grasa se alimentaron con la misma dieta que los animales experimentales. Se administró a ratones en grupos de control diferentes correspondientes dieta alta en grasas sola o dieta alta en grasas más sonda diaria con vehículo (solución salina). Otro grupo de control de ratones se alimentó con dieta de pienso convencional sola.

La composición corporal se supervisó por EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX, Estados Unidos) 5 semanas después del inicio del tratamiento para ratones alimentados con dieta alta en grasas y 2 semanas después del inicio del tratamiento para ratones alimentados con dieta de pienso. Los animales se colocaron individualmente en un cilindro de plástico y después se introdujeron en un sistema EchoMRI durante aproximadamente 2 min para exploración de composición corporal (masa magra y adiposa).

Los resultados se muestran en las FIG. 17 y 18.

Los ratones alimentados con una dieta alta en grasas (DAG) desarrollaron una obesidad grave en comparación con ratones de control alimentados con una dieta de pienso (DP) convencional (FIG. 17A). El aumento de peso corporal en ratones alimentados con alta cantidad de grasa no tratados se asoció con un aumento del porcentaje de masa adiposa (FIG. 17B) y una reducción del porcentaje de masa muscular (masa magra) (FIG. 17C), ambas como se miden por EchoMRI después de 5 semanas de tratamiento. En ratones alimentados con una dieta alta en grasas, el tratamiento con urolitina A (administrada mediante mezcla de alimento) o con punicalagina o extracto de granada (EG) (ambos administrados por sonda) evitaron la aparición de obesidad con una fuerte reducción del aumento de peso corporal en ratones alimentados con DAG tratados en comparación con ratones alimentados con DAG de control (FIG. 17A). Junto con esto, la masa adiposa se redujo significativamente en ratones alimentados con DAG tratados con urolitina A, punicalagina o EG en comparación con ratones alimentados con DAG (FIG. 17B).

Los ratones alimentados con una dieta de pienso convencional y tratados con ácido elágico o urolitina A también vieron una reducción de la masa adiposa con un aumento conjunto en músculo (masa magra), que ilustra que estos tratamientos favorecen el control del peso y un físico delgado o muscular (FIG. 18B).

## Ejemplo 8

*Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A aumentan la masa muscular en ratones normales y obesos*

5

Los ratones C57BL6/J macho se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7.

Tanto en ratones alimentados con dieta de pienso convencional como en ratones alimentados con DAG, el tratamiento con EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de masa magra. Los ratones alimentados con una dieta alta en grasas y tratados con urolitina A, punicalagina o EG vieron una reducción de masa grasa con un aumento conjunto en el músculo (masa magra) (FIG. 17B y 17C). Los ratones alimentados con una dieta de pienso y tratados con ácido elágico o urolitina A también vieron una reducción de la masa adiposa con un aumento conjunto en músculo (masa magra), que ilustra que estos tratamientos favorecen el control del peso y un físico delgado o muscular (FIG. 18A y 18B). Ya que la masa magra se representa predominantemente por la masa muscular, estos resultados ilustran cómo los tratamientos con EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A dan como resultado un aumento de la proporción de masa muscular en ratones normales y obesos con respecto a masa corporal total. Este efecto se observó después de tan poco como dos semanas de tratamiento.

## Ejemplo 9

*Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A aumentan el gasto de energía en ratones normales y obesos*

Los ratones C57BL6/J macho se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7. Además, sin embargo, el gasto de energía basal de ratones se midió mediante consumo de oxígeno por calorimetría indirecta, producción de dióxido de carbono y relación de intercambio respiratorio), 8 semanas después del inicio del tratamiento para los ratones alimentados con DAG y 2 semanas después del inicio del tratamiento para ratones alimentados con dieta de pienso convencional, usando el sistema de supervisión de animales de laboratorio exhaustivo (CLAMS; Columbus Instruments, Columbus, OH, Estados Unidos). Los animales se aclimataron en primer lugar durante 22 h a jaulas de CLAMS (temperatura ambiente  $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ) comenzando entre 11 y 12 de la mañana. Después se realizó medición durante al menos 20 h en las mismas condiciones. La medición incluyó un ciclo de oscuridad completo. Los parámetros medidos durante el CLAMS fueron los siguientes: (i) Consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$  en ml/kg/h):  $\text{VO}_2$  está correlacionado directamente con el gasto de energía; (ii) Producción de dióxido de carbono ( $\text{VCO}_2$  en ml/kg/h); y (iii) Relación de intercambio respiratorio (RIR):  $\text{VCO}_2 / \text{VO}_2$ ; RIR es un indicador del uso de sustrato de energía. En un estado estacionario, RIR es equivalente al cociente respiratorio (CR). El uso de carbohidratos puros proporciona RIR=1, mientras que la quema de grasas puras produce una RIR=0,7. Una dieta mixta proporciona una RIR=0,85.

Los resultados se muestran en las FIG. 19 y 20.

El consumo de oxígeno es un marcador fisiológico de la actividad mitocondrial y el gasto de energía. Los tratamientos con EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A aumentaron significativamente el consumo de oxígeno en ratones. Ácido elágico y urolitina A aumentaron el gasto de energía en ratones alimentados con pienso convencional (FIG. 19A y 19B). Este efecto se observó después de tan poco como 2 semanas de tratamiento. El tratamiento con extracto de granada (EG), punicalagina y urolitina A aumentó el gasto de energía en ratones alimentados con DAG (FIG. 20A y 20B).

## Ejemplo 10

*Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A aumentan el uso de ácidos grasos como sustratos de energía en ratones normales y obesos*

Los ratones C57BL6/J macho se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 9.

Como se ha indicado anteriormente, además del consumo de oxígeno, la calorimetría indirecta también supervisa la producción de dióxido de carbono. La relación entre la producción de dióxido de carbono ( $\text{VCO}_2$ ) y el consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ) se denomina relación de intercambio respiratorio (RIR). RIR es un indicador excelente del uso de sustratos de energía. En un estado estacionario, RIR es equivalente al cociente respiratorio (CR). Un uso preferente de carbohidratos como sustrato de energía proporciona una RIR cercana a 1, mientras que un uso de grasa como sustrato de energía (quema de grasas) produce una RIR menor que es cercana a 0,7 cuando se usan preferentemente ácidos grasos.

Como se representa en la FIG. 21 y la FIG. 22, el tratamiento con EG, punicalagina, ácido elágico y urolitina A redujo RIR significativamente reducida en ratones alimentados tanto con dieta de pienso como con DAG. Este efecto fue drástico en ratones alimentados con dieta de pienso tratados con ácido elágico y urolitina A (FIG. 21). Estos

resultados apoyan los cambios de la composición corporal después del consumo de EG, punicalagina, ácido elálgico o urolitina A que favorecen un físico más muscular (magro) con composición de grasa reducida.

#### Ejemplo 11

5 *Extracto de granada, punicalagina y urolitina A reducen los niveles en plasma de triglicéridos y ácidos grasos libres en ratones obesos*

10 Los ratones C57BL6/J macho se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7. Además, se realizó bioquímica en plasma 14 semanas después del inicio del tratamiento usando un analizador de química clínica automática convencional (Dimension Xpand, SIEMENS). Los animales se sometieron a ayunas durante 12 h (de 20:00 a 8:00) antes de la recogida de sangre. Se recogieron aproximadamente 500 µl de sangre de la vena cava en animales anestesiados en anestesia de isoflurano. Se recogió sangre en tubos heparinizados y se colocaron inmediatamente en hielo húmedo. El plasma se preparó por centrifugación (1500 x g), 15 min, 4 °C). Después se transfirieron muestras de plasma en microtubos de 1,5 ml limpios y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizaron mediciones bioquímicas en un analizador de química clínica automática (Dimension Xpand, SIEMENS) usando kits correspondientes.

20 Se midieron los niveles en circulación de triglicéridos y ácidos grasos libres mediante bioquímica convencional en la sangre de ratones alimentados con DAG de control y tratados (FIG. 23). El tratamiento con EG, punicalagina y urolitina A condujo a una mejora estadísticamente significativa de niveles en plasma de triglicéridos y ácidos grasos libres. Estos resultados indican que EG, punicalagina y urolitina A son eficaces en el tratamiento de dislipidemia en ratos obesos y en consecuencia pueden actuar para mejorar la función cardiovascular y prevenir la enfermedad cardiovascular.

#### 25 Ejemplo 12

*Punicalagina, ácido elálgico y urolitina A mejoran la tolerancia a la glucosa en ratones obesos*

30 Los ratones C57BL6/J macho se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7. Además, se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG) para ratones alimentados con DAG que desarrollaron intolerancia a la glucosa. El ensayo de tolerancia a la glucosa se supervisó 10 semanas después del inicio del tratamiento mediante ensayo de tolerancia a la glucosa oral (ETGo). Los animales se sometieron a ayunas durante 12 h (de 20:00 a 8:00) antes del ETGo. El día del ETGo, se recogió una pequeña gota de sangre (< 2 µl) de la vena lateral de la cola y se supervisó la glucemia usando un glucómetro (AccuCheck Aviva, Roche Diagnosis). Cada animal recibió después, en tiempo 0, una dosis oral de D-glucosa a una dosificación de 2 g/kg de peso corporal. Después se supervisó la glucemia en tiempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min después de la carga de glucosa oral.

40 Como en seres humanos, la alimentación con dieta alta en grasas en ratones dio como resultado la aparición de obesidad y diabetes de tipo 2 que se caracteriza por una intolerancia a la glucosa grave como se evalúa por el seguimiento de la glucemia inmediatamente después de una exposición a glucosa (2 g/kg de peso corporal) (ensayo de tolerancia a la glucosa) (FIG. 24). Como se representa en la FIG. 24, el tratamiento con punicalagina, ácido elálgico y urolitina A mejoran la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DAG. En consecuencia, estos tratamientos también pueden ser enfoques terapéuticos eficaces para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

#### 45 Ejemplo 13

*Urolitina A aumenta la función mitocondrial en C. elegans de edad avanzada*

50 Se cultivaron cepas de *C. elegans* a 20 °C en placas de agar con medio de crecimiento de nematodos (NGM) sembradas con *E. coli* cepa OP50. La cepa usada fue Bristol N2 de tipo silvestre proporcionada por el centro de genética de *Caenorhabditis* (Universidad de Minnesota). Se disolvió urolitina A en DMSO. Los animales se expusieron a compuestos de huevos en placas sembradas con bacterias OP50. Se prepararon placas de control con la concentración correspondiente de DMSO (0,1 %).

55 La medición del consumo de oxígeno es un indicador directo de la actividad mitocondrial. El efecto de la urolitina A en la actividad mitocondrial de *C. elegans* de edad avanzada (10 días de edad) se evaluó tratando *C. elegans* con urolitina A durante 10 días de adultez, momento en el cual se midió el consumo de oxígeno usando el equipamiento Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience Inc., North Billerica, MA). Se usaron 250 *C. elegans* de diez días de edad por cada condición. Se recuperaron *C. elegans* de placas de NGM con medio M9, se lavaron tres veces en 2 ml de M9 para eliminar bacterias residuales y se resuspendieron en 500 µl de medio M9. Los gusanos se transfirieron a placas Seahorse convencionales de 24 pocillos (n.º 100777-004) (50 gusanos por pocillo) y se midió el consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno basal de los gusanos se midió en primer lugar durante 30 minutos a intervalos de 5 minutos (0 min, 5 min, 15 min, 20 min, 25 min y 30 min) con 5 repeticiones por intervalo. Las tasas de respiración se normalizaron con respecto al número exacto de gusanos por pocillo determinado después de completarse el experimento usando un estereomicroscopio. Después de determinar el consumo de oxígeno basal, el consumo de

oxígeno desacoplado se midió añadiendo carbonilcianuro-p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) en el punto temporal de 30 minutos al medio para evaluar la capacidad de consumo de oxígeno máxima y la capacidad mitocondrial máxima. Se midió el consumo de oxígeno desacoplado a intervalos de 5 minutos (35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min y 60 min) para permitir medir la función mitocondrial a lo largo del tiempo. FCCP es un agente de desacoplamiento químico que anula el enlace obligatorio entre la cadena respiratoria y el sistema de fosforilación que se observa con mitocondrias intactas. Este efecto se debe a las propiedades anfipáticas de la molécula que se disuelve en bicapas fosfolipídicas mitocondriales. Esto aumenta drásticamente la permeabilidad iónica de la membrana mitocondrial y genera una filtración de protones drástica que conduce a aumento del consumo de oxígeno debido a la inactivación por oxígeno de los electrones bombeados en la cadena respiratoria en paralelo a la filtración de protones. Ya que este consumo de oxígeno se disocia (desacopla) de la producción de ATP (fosforilación oxidativa), FCCP aumenta el consumo de oxígeno reduciendo al mismo tiempo la generación de energía (ATP) por las mitocondrias. Las mitocondrias completamente desacopladas, como se obtuvieron con FCCP, presentan la máxima capacidad de su cadena respiratoria mitocondrial (consumo de oxígeno máximo) sin el "freno" que representa la fosforilación oxidativa y la producción de energía).

Los resultados representados en la FIG. 25 ilustran que la urolitina A aumenta la capacidad mitocondrial máxima de *C. elegans* de edad avanzada, como se representa por un efecto prolongado en la respiración desacoplada aumentada en gusanos tratados con urolitina A frente a control (DMSO). Los gusanos de control, no tratados mostraron un breve aumento de la respiración desacoplada que volvió rápidamente a niveles basales de consumo de oxígeno. Los gusanos tratados con urolitina A mostraron una elevación más extendida en el consumo de oxígeno. El alcance de la actividad mitocondrial potenciada se muestra comparando el área bajo la curva (ABC) durante el periodo de desacoplamiento con la respiración acoplada promedio empleada como la línea basal. Se observó que la urolitina A aumentaba significativamente la respiración desacoplada en gusanos de edad avanzada en comparación con gusanos de control no tratados durante el periodo de 30 minutos evaluado.

#### Ejemplo 14

##### *Urolitina A aumenta la actividad mitocondrial en C. elegans*

Se cultivaron cepas de *C. elegans* a 20 °C las placas de agar con medio de crecimiento de nematodos sembrado con bacterias HT115 y que contenían urolitina A 50 µM o una concentración correspondiente de DMSO como control. Los gusanos se trataron durante 24 horas. Las cepas usadas fueron la SJ4103 (zcls14[myo-3::GFP(mit)]), que es una línea transgénica estable que expresa una proteína verde fluorescente (GFP) localizada en mitocondrias con un péptido señal de importación a mitocondrias escindible bajo el control del promotor del músculo de la pared corporal específico *myo-3*. La expresión y cuantificación de GFP se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito (Durieux *et al.*, 2011). Los gusanos se trataron con urolitina A 50 µM de huevos, y se supervisó la GFP después de un día de adultez. Se realizaron ensayos fluorométricos usando un lector de placas multimarcador Victor X4 (Perkin-Elmer Life Science). Se seleccionaron ochenta gusanos aleatoriamente (20 gusanos por pocillo de una placa de 96 pocillos de pared negra) y cada pocillo se leyó cuatro veces y se promedió.

Los resultados en la FIG. 26 muestran que el tratamiento de gusanos con urolitina A indujo la expresión del indicador de GFP mitocondrial conducido por el promotor de *myo-3* específico de músculo en *C. elegans*. Este aumento sorprendente en la expresión de GFP proporciona pruebas claras de que la capacidad mitocondrial aumentaba debido a la urolitina A. Para permitir dicho aumento de la señal de GFP observada, las mitocondrias en músculo deben agrandarse o ser más numerosas en estos gusanos.

#### Ejemplo 15

##### *Efectos de compuestos derivados de granada en el estado de ánimo la cognición en respuesta a estrés crónico*

Se expusieron ratones macho C57BL/6J de tipo silvestre de 7 semanas de edad a estrés impredecible crónico durante un periodo de cuatro semanas. Se llevaron a cabo varios experimentos conductuales antes, durante y después del periodo de estrés crónico para determinar el efecto en el estado de ánimo y la cognición. Como se ha indicado previamente, el estrés crónico influye negativamente en el estado de ánimo y la cognición. Se administraron compuestos naturales obtenidos de granada a estos ratones para determinar qué efecto tendrían estos compuestos en el alivio de este efecto negativo en el estado de ánimo y la cognición.

Los ratones se habituaron a la instalación animal de los inventores durante 9 días antes de comenzar los experimentos. Todos los ratones se alojaron en grupos de tres en jaulas de plástico convencionales y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (7:00 - 19:00) con acceso a voluntad a alimento y agua. Todos los procedimientos llevados a cabo se realizaron de acuerdo con las directrices del instituto nacional suizo sobre experimentación animal y fueron aprobados por el comité de la oficina veterinaria cantonal suiza para experimentación animal.

*Caracterización de animales*

Después de la adaptación a la instalación animal, todos los ratones se caracterizaron con respecto a peso corporal, comportamiento de tipo ansiedad en el laberinto cero elevado (EZM) y locomoción y exploración en campo abierto y ensayos de objetos nuevos. El objetivo de estos experimentos fue emparejar animales según sus tasas de ansiedad y exploración para establecer grupos experimentales y de control que son equivalentes según estos rasgos.

*Laberinto cero elevado*

La ansiedad se midió en un laberinto cero elevado (EZM). Los ratones se observaron durante 5 min en el EZM (una pasarela anular de 5,5 cm de ancho con un diámetro de 46 cm y elevada 46 cm sobre el suelo) en condiciones de luz tenue y dispersa. Se protegieron dos sectores a 90° opuestos mediante paredes internas y externas de 13,5 cm. Por lo tanto, se definieron tres zonas de la siguiente manera: una zona intermedia que comprendía cuatro segmentos a 30° en los extremos de las paredes de protección separados por las dos zonas de exploración cerradas protegidas de 50° de anchura y las dos abiertas desprotegidas de 70° de anchura. Con estos límites, las entradas en los sectores abiertos se detectaron solamente cuando el animal entró en ellos con las cuatro patas. Las trayectorias de cada ratón se registraron automáticamente mediante seguimiento de vídeo (Ethovision 3.0, Noldus, Wageningen, Países Bajos). El número total de entradas en todos los sectores actuaron como un indicador de la actividad locomotora, mientras que las diferencias en el número de entradas y el tiempo pasado en los sectores abiertos se tomaron como indicadores de la ansiedad. Entre sesiones el laberinto se limpió con etanol/agua 4 %.

*Campo abierto y objeto nuevo*

Se evaluó la locomoción y reactividad a un campo abierto (CA) en una caja cuadrada blanca (50 x 50 x 37 cm) con condiciones de luz tenue y dispersa. El ratón se coloca en el centro del campo y se permite que se mueva libremente durante 10 min. La distancia total de movimiento, la frecuencia de entradas en el centro, el tiempo y el porcentaje de tiempo en el centro del CA se analizaron. La evitación del área interior o "desprotegida" del campo se interpreta como un comportamiento de tipo ansiedad. Las medidas de distancia total se usan como un índice de actividad. El comportamiento exploratorio se evaluó usando el ensayo de nuevo objeto (NO). El ensayo de NO se realizó inmediatamente después del ensayo de CA. Se colocó un objeto pequeño, metálico (3 x 1,5 x 5 cm) en el centro del campo abierto mientras el ratón estaba dentro. Se proporcionaron a los ratones después 5 min para explorar libremente el nuevo objeto. El tiempo pasado en el centro y la periferia del compartimento, el número y el tiempo de entradas en el centro y la distancia de movimiento total en el centro y el compartimento completo se analizaron. El porcentaje de tiempo y la distancia del ratón en el centro, explorando el nuevo objeto, se consideraron indicadores de actividad exploratoria "centrada".

*Tratamiento con extracto obtenido de granada*

Tres semanas antes del inicio del protocolo de estrés crónico los ratones se separaron en cuatro grupos diferentes. Un grupo recibió dieta de pienso de ratón convencional (control), mientras que los tres grupos restantes recibieron diversas dosis de extracto 1011, un extracto obtenido de zumo de granada. La dosis baja correspondía a una dosis de extracto de 21 mg/kg/d de equivalentes de ácido gálico de polifenoles (GAE PPE), la dosis media correspondía a una dosis de extracto de 43 mg/kg/d de GAE PPE, la dosis alta correspondía a una dosis de extracto de 86 mg/kg/d de GAE PPE (véase tabla 5).

Tabla 5. Extracto de polvo de granada 1011.

Extracto 1011	Polifenoles	Punicalagina	Punicalina	Ácido elágico
Dosis baja	21 mg/kg/d	2,1 mg/kg/d	5,2 mg/kg/d	2,0 mg/kg/d
Dosis media	43 mg/kg/d	4,2 mg/kg/d	10,5 mg/kg/d	3,9 mg/kg/d
Dosis alta	86 mg/kg/d	8,5 mg/kg/d	21 mg/kg/d	7,8 mg/kg/d

El tratamiento con la dieta comenzó tres semanas antes del inicio del protocolo de estrés crónico y continuó hasta terminar el experimento.

*Tratamiento con urolitina A, un metabolito obtenido de granada*

Tres semanas antes del inicio del protocolo de estrés crónico, los ratones se separaron en dos grupos. Un grupo recibió dieta de pienso de ratón convencional (control), mientras que el otro grupo recibió una dieta que contenía urolitina A, suministrada a una dosis de 25 mg/kg/d.

*Estrés impredecible crónico*

El protocolo de estrés crónico impredecible implicó exposición de animales a una situación estresante diaria en un momento impredecible durante 4 semanas (entre las 8:00 y las 16:00, y distribuido aleatoriamente durante los 28 días). Los estímulos de estrés fueron: 6 min de suspensión de la cola; 3 x 0,4 mA de choque en el pie ineludible; 4 h de exposición a serrín húmedo, sucio; 2 h de exposición en una plataforma elevada; 1 h de inmovilización en un tubo

de plástico; 30 min de exposición a 16 °C; 2 días de ciclo de luz/oscuridad invertido; 10 min de exposición a un coespecífico mayor, agresivo; exposición a luz intensa (600 lux); 2 h en jaula superpoblada (6 ratones) y 8 h con una inclinación de la jaula de 40°. Todos los animales se pesaron y se evaluó el estado de su capa de pelo regularmente (cada 3-5 días). Durante este experimento un grupo de ratones se expuso al estrés crónico y el otro grupo de animales se dejó sin perturbaciones y actuó como control.

*Ensayos conductuales*

*Ensayo de suspensión de la cola*

El ensayo de suspensión de la cola (TST) se usa como un modelo para evaluar la actividad de tipo antidepresivo en ratones. El ensayo se basa en el hecho de que los animales sometidos al estrés a corto plazo (6 min), ineludible, de estar suspendido por la cola, desarrollarán una postura inmóvil. El ratón se colgó de una barra de metal por una cinta adhesiva colocada a 20 mm del extremo de la cola. La distancia entre el suelo y la barra fue de aproximadamente 25 cm. La inmovilidad se define como la ausencia de movimientos iniciados e incluye balanceo pasivo. El tiempo de investigación, que incluía la inmovilidad, lucha y escalada, se puntuaron a partir de una cinta.

Como se muestra en la FIG. 27, el estrés crónico dio como resultado una mayor inmovilidad en el TST, un indicador de mayor depresión y sensación de indefensión. Sin embargo, los ratones tratados con dosis crecientes de extracto de granada demostraron una inversión de este patrón y una restauración de la movilidad y la lucha hasta niveles observados en ratones no estresados. Por lo tanto el extracto de granada previene la respuesta de depresión observada en ratones no tratados estresados de forma crónica.

*Reconocimiento contextual*

El condicionamiento de miedo contextual es una medición de la capacidad de un animal para recordar un contexto particular. En este ensayo, los ratones se colocan en una caja y después reciben dos choques suaves, con un minuto de diferencia. En reacción a los choques los ratones se bloquean. La capacidad de los ratones para reconocer el contexto en que recibieron el choque se ensaya poniéndolos de nuevo en la caja en un punto temporal posterior. Si reconocen el contexto, los ratones se bloquearán en anticipación de la recepción de un choque.

En ratones normales, la capacidad para reconocer el contexto en ausencia de cualquier choque es una medida de la memoria contextual. Los ratones con mejor memoria contextual reconocen el contexto inicial mejor y por lo tanto tienen un mayor nivel de bloqueo.

Este ensayo también puede usarse para medir la ansiedad en ratones estresados. En ratones estresados, pudo observarse el aumento de ansiedad en el aumento del tiempo de reacción de bloqueo en respuesta a los choques iniciales, así como un mayor periodo de extinción para la memoria del contexto. La extinción de la memoria contextual se mide colocando el ratón en el mismo contexto una vez al día durante varios días en ausencia del estímulo adverso inicial. Con el tiempo los ratones desaprendieron la asociación del contexto con el estímulo adverso, que se demuestra por una reducción gradual del bloqueo. En ratones estresados que están ansiosos esta extinción de la memoria adversa tarda más.

Se usó acondicionamiento de miedo contextual para ensayar el efecto del extracto de granada en la inducción de ansiedad (es decir, ansiedad aprendida) en ratones en respuesta a reconocimiento contextual. El entrenamiento y ensayo tuvieron lugar en una cámara de acondicionamiento de roedores (20 x 20x 28 cm), colocada en una caja de plexiglás e iluminada por una bombilla de 20 W. Las paredes laterales de la cámara de acondicionamiento se construyeron de metacrilato blanco y la puerta y la cubierta superior se construyeron de plexiglás. El suelo consistió en 20 cilindros de acero a través de los que podría administrarse un choque mixto de un generador de choques.

Unos ventiladores proporcionaron un ruido de fondo de 68 dB (sistema completo: Panlab, S.L., Barcelona, España). Se realizó condicionamiento del miedo al contexto durante la tercera semana del protocolo de estrés crónico en el grupo estresado. El día del condicionamiento del miedo, se transportaron los ratones de la sala de colonia al laboratorio conductual adyacente y se colocaron en la cámara de condicionamiento. El entrenamiento consistió en exposición de los ratones a un contexto de condicionamiento durante 3 min seguido de tres choques eléctricos en los pies (2 s, 0,4 mA) suministrados después de cada min. Después del último choque en los pies el animal permaneció durante 30 s en la cámara. La cámara de condicionamiento del miedo se limpió exhaustivamente con ácido acético 0,5 % antes de colocar cada ratón en la caja. Para determinar el efecto del estrés crónico y las diversas dosis de extracto de granada en el nivel de ansiedad inducido por esta memoria contextual, se midió el nivel de comportamiento inducido por ansiedad en respuesta a este contexto. Se examinaron las siguientes respuestas conductuales, que se sabe que son sensibles a los niveles de ansiedad: % de bloqueo, % de cría y % de acicalamiento. Estas mediciones conductuales se realizaron 48 h más tarde después de volver a exponer los ratones al contexto de condicionamiento durante 8 min. Después de sesiones de entrenamiento y ensayo, los animales se devolvieron inmediatamente a sus jaulas de alojamiento. Se grabó el comportamiento de los animales y más tarde fue puntuado con software de observación de comportamiento preparado de forma interna por un observador que desconoce el tratamiento de los animales.

El bloqueo, definido como una falta de movimiento excepto para latido y respiración, se puntuó y se usó como un índice de la ansiedad. El tiempo de bloqueo se transformó a porcentaje de niveles de bloqueo. El extracto de granada mostró una respuesta dependiente de dosis, con una reducción significativa en el % de congelación a la dosis más alta (FIG. 28), que indica una protección contra la ansiedad. Se ve reducción similar en el comportamiento de ansiedad en la cría, con una protección significativa y dependiente de la dosis del comportamiento de cría tras la administración de extracto de granada (FIG. 29). La fuerte supresión de inhibición inducida por ansiedad de acicalamiento por la mayor dosis de extracto de granada (FIG. 30) completa estas observaciones. Estos resultados demuestran que el extracto de granada y los compuestos redujeron la ansiedad inducida por experiencia en ratones.

Esta reducción de la ansiedad inducida por experiencia en ratones con estrés crónico también se observó para urolitina A, un metabolito de punicalagina. En este estudio, los niveles de ansiedad se midieron por la extinción de memoria del contexto adverso proporcionado en el ensayo de miedo contextual descrito anteriormente. En este estudio los ratones que han experimentado entrenamiento usando el paradigma de miedo contextual se exponen a este contexto diariamente durante cuatro días pero en ausencia de cualquier estímulo adverso. La capacidad de reconocer el contexto se mide por bloqueo durante un periodo de 3 minutos de observación. Se ha mostrado que los niveles aumentados de ansiedad conducen a un periodo más largo para extinción para la memoria de un contexto adverso. Como se muestra en la FIG. 31, los ratones que han experimentado estrés crónico mostraron un periodo de extinción más lento que los ratones normales. Sin embargo, tras el tratamiento con urolitina A a una dosis de 25 mg/kg/d, los ratones que habían experimentado estrés crónico mostraron una mejora significativa de la extinción de memoria adversa, que demuestra que urolitina A, como punicalagina, es capaz de reducir la ansiedad en ratones que han experimentado estrés crónico.

#### *Laberinto de agua de Morris*

La memoria espacial y el aprendizaje se ven afectados por estrés crónico. El aparato de laberinto de agua de Morris consistió en una piscina circular blanca grande (140 cm de diámetro) llena de agua coloreada opaca (25 °C +/- 1 °C) y con una plataforma (10 x 10 cm<sup>2</sup>) sumergida 1 cm bajo la superficie del agua. El laberinto de agua está rodeado de cortinas grises (25 cm desde la periferia de la piscina) que contiene varias pistas visuales prominentes. Antes del ensayo el ratón se entrena para aprender la localización de la plataforma. Utilizando las pistas visuales prominentes, el ratón aprende a localizar la plataforma. La fase de aprendizaje comienza con una fase de habituación en la que se introducen ratones en la habitación, el aparato y el agua proporcionándoles una prueba de natación libre de 2 min sin plataforma presente. Se recogen datos usando una videocámara fijada al techo, conectada a un sistema de seguimiento de vídeo (Ethovision 3.0, Noldus, Wageningen, Países Bajos).

Después de una sesión de habituación (día 0), los ratones se sometieron a diferentes protocolos para evaluar secuencialmente sus capacidades de aprendizaje espacial (días 1-3). Se realizaron sesiones de aprendizaje espacial en tres días consecutivos (días 1-3), realizando cuatro ensayos al día con un intervalo entre pruebas (IEP) de 6 min entre cada prueba.

Cada prueba comenzó introduciendo el ratón en el laberinto con la ayuda de una copa, frente a la pared de la piscina y en una de cuatro posiciones posibles que se equilibraron aleatoriamente entre pruebas y días. La distancia entre el ratón y la plataforma se midió en cada momento de toma de muestras, con 25 momentos de toma de muestras recogidos por segundo. Estas distancias se sumaron después durante el periodo de 60 segundos, para proporcionar una medición de la distancia a la plataforma (cm) para cada prueba. Si un ratón no encontró la plataforma en un periodo de 60 s, se le guio suavemente hacia ella. Cada ratón tuvo que permanecer en la plataforma durante 20 s antes de devolverlo a su jaula de espera.

Los resultados de este ejemplo demostraron que el estrés crónico tuvo un efecto negativo significativo en el aprendizaje y la memoria espacial. Durante la sesión de entrenamiento hubo un aumento significativo en la distancia que se viajaba para alcanzar la plataforma en comparación con el control sin estrés, que muestra que el estrés crónico altera la memoria normal que se forma durante el aprendizaje (FIG. 32). El tratamiento de ratones con extracto de granada fue capaz de proteger contra estos efectos negativos de estrés crónico en el aprendizaje y la memoria asociada. Se observó un efecto dependiente de dosis en ratones que recibieron el extracto de granada y los ratones con estrés crónico, tratados, fueron capaces de rendir a los mismos niveles de controles no estresados (FIG. 33).

Se observó un efecto similar para ratones tratados con urolitina A, como se muestra en la FIG. 34. Los ratones que se habían sometido al protocolo de estrés crónico mostraron aprendizaje errático, como se demuestra por la alta variabilidad entre pruebas secuenciales. El tratamiento de ratones con estrés crónico con urolitina A a una dosis de 25 mg/kg/d mostró una estabilización de esta variabilidad. Esto destaca el hecho de que urolitina A, un metabolito corriente abajo de punicalagina, también es capaz de proteger contra estos efectos negativos de estrés crónico en la cognición, incluyendo aprendizaje y memoria.

En resumen, estos resultados juntos demuestran que el extracto de granada y compuestos derivados tales como urolitina A son capaces de actuar para reducir los efectos negativos del estrés crónico en la cognición, incluyendo memoria y aprendizaje. Adicionalmente, el extracto de granada y compuestos derivados tienen actividad

antidepresiva como se ve en el ensayo de suspensión de la cola y reducen la ansiedad provocada por estrés crónico. Los resultados también demuestran que el extracto de granada previene el deterioro del rendimiento de memoria y aprendizaje y reconocimiento espacial normalmente observado después de estrés crónico.

5 Ejemplo 16

*Efecto en la memoria y cognición en el modelo de rata de edad avanzada*

10 Durante el envejecimiento hay varios efectos en la cognición y la memoria, que pueden recapitularse en el modelo de rata de envejecimiento. Para una revisión véase Gallagher y Rapp (1977) *Annu Rev Psychol.* 48:339-70. El modelo de rata de edad avanzada se ha usado de forma extensa para caracterizar los efectos del envejecimiento en la memoria y la cognición. En los experimentos presentados aquí, se observó rendimiento mejorado en presencia de extracto de granada.

15 Ratas Sprague-Dawley de edad avanzada (comenzando a los 19 meses de edad) recibieron extracto de granada (1108) en su agua para beber, a una concentración de 0,34 mg/ml de polifenoles (PPE). Se midió el contenido de polifenoles usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, con el contenido fenólico expresado como equivalentes de ácido gálico. El tratamiento de control consistió en sacarosa 1,36 %, D-glucosa 0,12 % y D-fructosa 0,12 % disueltos en agua. Las ratas consumieron en promedio 30 ml/día de los tratamientos tanto de control como  
20 de 1108 (véase tabla 6), con un peso promedio de 660 g/rata. Esto dio como resultado una dosis de 15 mg de PPE/kg/d o 1,1 mg de punicalagina/kg/d para animales que reciben el extracto 1108.

Tabla 6. Extracto líquido de granada.

	Extracto 1108
Dosis de polifenoles suministrada	15 mg/kg/d
Dosis de punicalagina suministrada	1,11 mg/kg/d

25 Después de 2,5 meses de tratamiento, se evaluó la memoria de trabajo a corto plazo usando una tarea de reconocimiento social, un ensayo convencional que implica cognición social. Thor y Hallaway (1981) *Animal Learning Behavior.* 9:561-5. En esta tarea, cada rata de edad avanzada se colocó en su jaula de alojamiento junto con una rata Sprague-Dawley macho juvenil (<5 semanas de edad) durante 5 minutos. Treinta minutos después, se repitió exactamente el mismo procedimiento con el mismo juvenil para determinar una segunda vez el grado de interacción  
30 entre los dos animales. Se espera menos contacto en la segunda interacción, ya que los dos animales han tenido una interacción previa. Esta reducción del contacto entre los animales es una medida del rendimiento cognitivo y la conservación de memoria. Treinta minutos después, se colocó una nueva rata juvenil durante 5 minutos junto con la rata de edad avanzada, para medir si el animal puede diferenciar entre los dos individuos juveniles diferentes. Durante cada periodo de contacto entre los dos animales, se midió el tiempo total de contacto para evaluar la  
35 intensidad de interacción social.

Los resultados se muestran en la FIG. 35. Los animales de edad avanzada tratados con control no mostraron ninguna preferencia por el objeto familiar y pasaron el mismo tiempo explorando ambos objetos, un efecto que se ha  
40 mostrado previamente en ratas de edad avanzada y se cree que refleja una reducción de la memoria de orden temporal durante el envejecimiento. Hauser *et al.* (2009) *Behav Neurosci.* 123:1339-45. Sin embargo, las ratas tratadas con el extracto 1108 mostraron una reducción del tiempo pasado con el mismo juvenil durante el segundo periodo de exposición, así como un aumento del tiempo de interacción con una nueva rata juvenil. Esta diferencia observada ilustra el beneficio protector del extracto 1108 en el desarrollo y la conservación de la memoria.

45 Ejemplo 17

*Efecto en la memoria espacial en el modelo de rata de edad avanzada*

50 También se ha indicado que la memoria espacial se ve afectada por el envejecimiento, con una reducción del rendimiento resultante del envejecimiento. Bergado *et al.* (e-pub 29 de octubre de 2010) *Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral analysis. Neurociencia.* Para examinar los efectos del extracto de granada en la reducción de la memoria espacial durante el envejecimiento, se trataron ratas Sprague-Dawley de edad avanzada (comenzando a los 19 meses de edad) con extracto de granada 1108 o control en su agua para beber como se describe para el ejemplo 16.

55 Las ratas de edad avanzada se trataron con el extracto 1108 o un control isocalórico durante tres meses, después de lo cual se evaluaron su rendimiento de aprendizaje y memoria usando la tarea de laberinto de agua de Morris, descrita en el ejemplo 15.

60 Las capacidades de aprendizaje de cada animal se evaluaron mediante su rendimiento en la tarea de inversión (tres pruebas). En esta tarea se enseñó primero a los animales la localización de la plataforma en el cuadrante (OESTE) mediante tres pruebas de entrenamiento. Después se cambió la localización de la plataforma y se coloca en el

cuadrante opuesto (ESTE). Los animales se sometieron a tres nuevas sesiones de entrenamiento para aprender la nueva localización de la plataforma. Se midió el esfuerzo para determinar la nueva localización de la plataforma, como se midió por la distancia viajada antes de localizar la plataforma. Los resultados se muestran en la FIG. 36. Los animales tratados con el extracto fueron significativamente más eficaces en la localización de la plataforma en el ensayo de inversión (ANOVA de una vía,  $p < 0,02$ ; control N=11; PJ: N=13; extracto: N=14), lo que demuestra un beneficio terapéutico del extracto administrado para este aspecto de la memoria espacial.

Ejemplo 18

*Efectos de compuestos obtenidos de granada en la memoria espacial y de trabajo en enfermedad de Alzheimer*

Se ha mostrado que la enfermedad de Alzheimer (EA) tiene efectos perjudiciales en la memoria espacial, un efecto que también se observa en modelos de ratón de EA de la enfermedad. Para determinar los efectos de compuestos obtenidos de granada en el alivio de la memoria espacial y de trabajo en EA, se han ensayado diversos extractos de granada y punicalagina en dos ensayos conductuales de memoria espacial, el laberinto en Y y el laberinto de agua de Morris.

Laberinto en Y

En este estudio, se utilizó el modelo de ratón 5XFAD de EA. El modelo de ratón 5XFAD para enfermedad de Alzheimer se basa en modificaciones genéticas (introducción de los genes de APP y PS1 humanos mutados) que conducen a la producción de péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) en tejido cerebral. Se descubrió que estos ratones tenían una reducción significativa en el rendimiento cognitivo en el laberinto en Y tan pronto como a los 7 meses de edad.

Para determinar el efecto de compuestos obtenidos de granada, un extracto de granada (EG) obtenido de granada completa se suministró por sonda a una dosis de 60 mg/kg/d de polifenoles, que incluye aproximadamente 5,6 mg/kg/d de punicalagina. Los ratones se sondaron 3 veces semanalmente comenzando a los 3 meses de edad hasta el final del tratamiento. Los ratones se ensayaron después de 7 meses de edad con respecto a los efectos de EG en la memoria de trabajo en el laberinto en Y. Los ratones se colocaron en el laberinto en Y durante 15 minutos y se permitió que exploraran dos ramas, estando cerrada la tercera rama. Cuatro horas después, el animal se colocó de nuevo en el laberinto durante cinco minutos, esta vez con la tercera rama abierta, permitiendo que el ratón tenga la posibilidad de explorar libremente las tres ramas. La actividad de exploración en la nueva rama evaluó la capacidad del animal para reconocer que esta zona particular no se ha explorado aún, según pistas espaciales. Se puntuó que los ratones hacían una alteración correcta durante la exploración si exploraron cada una de las tres ramas y no solamente las dos primeras presentadas.

Como se muestra en la FIG. 37, se observó una mejora significativa en el rendimiento de la memoria de trabajo, como se midió por el número de alteraciones correctas, en ratones 5XFAD tratados con EG.

Laberinto de agua de Morris

Los extractos de granada 31008, 61109 y 71109 se ensayaron en un segundo modelo animal transgénico de enfermedad de Alzheimer que expresaba tanto las mutaciones London de mutante de amiloide como la mutación humana de prenilina-1. Los animales en este modelo desarrollan placas a los 4 meses de edad y déficits de memoria a los 6 meses. Una carga de placas densa es visible después de 7 meses.

En un conjunto de experimentos, se alimentaron ratones transgénicos APP-PS1 de cuatro meses de edad con una dosis fija de aproximadamente 97 mg de polifenoles totales/kg/día, que incluye aproximadamente 15 mg/kg/d de punicalagina del extracto 31008, que se obtuvo de granada completa, a través de su agua para beber. En un conjunto de experimentos, se alimentaron ratones transgénicos APP-PS1 de cuatro meses de edad con una dosis fija de aproximadamente 468 mg totales/kg/día del extracto 61109, que estaba altamente enriquecido en punicalagina (>91 %), a través del agua para beber. En un conjunto de experimentos, se alimentaron ratones transgénicos APP-PS1 de cuatro meses de edad con una dosis fija de aproximadamente 180 mg de polifenoles totales/kg/día del extracto 71109, que se obtuvo de cáscara de granada, a través del agua para beber. Después de 3 meses de alimentación, los ratones (entonces de 7 meses de edad) se ensayaron en el ensayo espacial del laberinto de agua de Morris.

El laberinto de agua de Morris se realizó durante los días 84-87 del tratamiento. La piscina (un recipiente circular, blanco, de 1 m de diámetro) contenía agua a 20 °C con dióxido de titanio como un aditivo inodoro, no tóxico, para ocultar la plataforma de escape (1 cm por debajo del nivel del agua). La natación de cada ratón se grabó en vídeo y se analizó (Ethovision, Noldus information Technology, Wageningen, Países Bajos). Antes del entrenamiento, cada ratón se colocó sobre la plataforma durante 15 segundos. Para ensayos de navegación de lugar, los ratones se entrenaron para localizar la plataforma oculta en cinco bloques de tres pruebas durante tres días consecutivos. Cada prueba consiste en un ensayo de natación forzada de como máximo 120 segundos, seguido de 60 segundos de descanso. El tiempo que cada ratón necesitó para localizar la plataforma se midió durante los cinco bloques consecutivos de entrenamiento para determinar una curva de aprendizaje para cada ratón.

Veinticuatro horas después del entrenamiento final, cada animal se sometió a una prueba de sondeo con la plataforma retirada. Se permitió a los ratones buscar la plataforma ausente durante 60 segundos y se midió el tiempo de búsqueda pasado en cada cuadrante de la piscina, así como el número de cruces de la posición de plataforma original. Como se muestra en la FIG. 38, los ratones alimentados con extracto 31008 mostraron un aumento del rendimiento en el ensayo de sondeo como se demostró por el aumento de la frecuencia de cruces del área donde la plataforma se había localizado anteriormente. Los ratones alimentados con extractos 61109 y 71109 tuvieron un rendimiento aún mejor.

Las composiciones de los extractos 61109 usados en este experimento se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.

	Extracto 61109
Punicalagina	91,3 % (p/p)
Dosis de punicalagina suministrada	295 mg/kg/d

#### Ejemplo 19

#### *Efectos de los compuestos derivados de granada en la depresión, la ansiedad y la cognición en respuesta a estrés en la vida temprana*

Se evaluaron compuestos derivados de granada con respecto a su capacidad para mejorar las funciones cerebrales, incluyendo la cognición, la depresión y la ansiedad, en un modelo de estrés en la vida temprana asociado con la separación materna.

El estrés en la vida temprana tiene un efecto significativo en el rendimiento cognitivo en la vida adulta posterior, incluyendo (i) aumento de toma de decisiones anómalas y asunción de riesgos excesiva; (ii) susceptibilidad a mayores tasas de depresión y ansiedad; y (iii) aprendizaje y memoria alterados.

Todos los procedimientos llevados a cabo se realizaron de acuerdo con las directrices del instituto nacional suizo sobre experimentación animal y fueron aprobados por el comité de la oficina veterinaria cantonal suiza para experimentación animal.

#### *Estrés en la vida temprana producido por separación materna*

El día postnatal 1, las crías se sacrificaron para tener 6 crías por madre. Desde el día postnatal 1 al 14, se llevó a cabo separación materna (SM) impredecible de un periodo de 3 horas al día. Se realizó separación materna en momentos aleatorios (de 8:00 a 14:00) para evitar la habituación de la madre al procedimiento. El protocolo consistió en retirar crías de su madre a otra jaula a temperatura ambiente durante un periodo de 3 horas, después de lo cual las crías se devolvieron a su nido original. Estos grupos están indicados como estrés en la vida temprana en las figuras. Un grupo de control de madre/crías se dejó sin perturbaciones y se indica en las figuras como normal.

#### *Tratamiento con punicalagina aislada de la granada*

Una semana después de la separación materna los ratones se separaron en dos grupos. Un grupo de control recibió la dieta de pienso de ratón convencional (sin tratamiento), mientras que el otro grupo recibió el elagitanino punicalagina mezclado en el alimento y diseñado para suministrar una dosis de 90 mg/kg/día a los ratones. El tratamiento con la dieta comenzó 1 semana después de terminar el tratamiento de separación materna.

#### *Ensayos conductuales*

Los efectos del estrés en la vida temprana en la depresión, la ansiedad y la cognición se examinaron utilizando los siguientes ensayos conductuales que se llevaron a cabo 166 días después de completar el protocolo de separación materna. Se compararon ratones criados con normalidad frente a ratones con separación materna (estrés en la vida temprana) y ratones con separación materna tratados con punicalagina.

#### *Ensayo de caja oscura/clara*

En este ensayo se colocan ratones en una caja de PVC que se separa en dos compartimentos: un compartimento oscuro (15 x 20 x 25 cm, PVC negro y cubierta por arriba) y un compartimento iluminado (30 x 20 x 25 cm, PVC blanco e iluminada a 200 lux), ambos unidos por una puerta de interconexión (5 x 5 cm) (Ligna, París, Francia). El experimento se inicia colocando el animal en el compartimento oscuro, después de lo cual una cámara graba durante un periodo de 5 minutos la cantidad de tiempo que el ratón pasa en el área iluminada, el número de transiciones del área oscura a la iluminada y el tiempo hasta escapar del área oscura a la iluminada.

Normalmente, los ratones evitarán el área iluminada en la caja. Los ratones con separación materna pasaron un tiempo anormalmente largo en el compartimento iluminado en comparación con sus compañeros de camada sin

separación materna como consecuencia de su estrés en la vida temprana (FIG. 39). Este aumento del tiempo pasado explorando el área iluminado refleja un comportamiento de toma de decisiones alterado caracterizado por asunción de riesgos anómala y excesiva.

- 5 El tratamiento con punicalagina de ratones con separación materna invirtió y normalizó el comportamiento de asunción de riesgos excesiva observado y restauró el proceso de toma de decisiones a la normalidad (FIG. 39).

*Laberinto en O elevado (EOM)*

- 10 Otro ensayo conductual que mide la asunción de riesgos anómala es el laberinto en O elevado (EOM). En este ensayo un aparato que consiste en un anillo con un diámetro de 41,5/46,5 cm (diámetro interno/externo) se divide en cuatro partes iguales. Dos partes del anillo, una en frente de la otra, están encerradas por paredes que son de 5 cm de altura. Las dos partes restantes del anillo no tienen paredes. El laberinto está elevado 1 m por encima del suelo. La tendencia natural de los ratones es evitar superficies abiertas y pasar más tiempo en las regiones cerradas del anillo que tienen las paredes de 5 cm, a diferencia de las regiones abiertas del anillo.

- 15 Para examinar el efecto del estrés en la vida temprana, los ratones se colocaron en la entrada de una de las áreas del laberinto con las paredes de 5 cm, con la nariz hacia el brazo cerrado, y se permitió que exploraran el EOM durante 5 min. Durante este periodo se grabó en vídeo el comportamiento animal. Se calculó el tiempo pasado en cada rama (cerrada frente a abierta), considerándose solamente que se había producido una entrada en la rama cuando el animal puso las cuatro patas en la rama.

- 20 Normalmente, los ratones colocados en el laberinto en O elevado evitarán las regiones abiertas del anillo y pasarán un tiempo limitado explorando esta área. Los ratones estresados por la separación materna pasaron un tiempo anormalmente largo en las secciones abiertas del laberinto en O en comparación con sus compañeros de camada no estresados (FIG. 40). Como también se observa en el ensayo de caja oscura/clara, esto refleja una alteración del comportamiento de toma de decisiones en ratones sometidos a estrés en la vida temprana que se caracteriza por asunción de riesgos anómala y excesiva.

- 25 El tratamiento con punicalagina de ratones con separación materna invirtió y normalizó su comportamiento de asunción de riesgos excesiva anómalo debido a estrés en la vida temprana (FIG. 40).

*Ensayo de natación forzada*

- 35 El ensayo de Porsolt o natación forzada se usa habitualmente para ensayar tratamientos antidepresivos (Porsolt *et al.*, 1977a; Porsolt *et al.*, 1977b). Para este ensayo conductual, se coloca un ratón en un cilindro de 5 l (11 cm de diámetro y 25 cm de altura) lleno hasta dos tercios con agua a 23 °C. Se consideró que los animales estaban nadando y móviles si hubo un claro desplazamiento del cuerpo. Se consideró que los animales que flotaban con movimiento mínimo durante el periodo de análisis estaban inmóviles. El comportamiento animal se grabó durante un periodo de ensayo de 6 minutos usando una cámara y un espejo detrás del cilindro. Los primeros 2 minutos y los últimos 4 minutos de la natación se analizaron por separado con respecto a actividad de natación de ratones. El aumento del nivel de depresión se correlaciona con un aumento de la inmovilidad del ratón, particularmente durante los últimos 4 minutos. Los animales que han experimentado estrés en la vida temprana mostraron un aumento significativo de la inmovilidad en comparación con sus compañeros de camada no estresados, lo que indica un nivel elevado de depresión (FIG. 41). El tratamiento con punicalagina de ratones con estrés en la vida temprana invirtió este comportamiento anómalo (aumento de la inmovilidad) y aumentó la actividad de natación hasta niveles vistos en ratones no estresados. Este efecto conductual de punicalagina demuestra su actividad como un antidepresivo (FIG. 41).

50 *Condicionamiento del miedo contextual*

- Se usó condicionamiento del miedo contextual para determinar los efectos del elagitanino punicalagina en la susceptibilidad de animales adultos, sometidos a estrés en la vida temprana, a ansiedad. Los animales se entrenaron en una cámara de condicionamiento del miedo (Contexto A, An x L x Al: 30 cm x 24 cm x 26 cm) (PanLab) que contenía un suelo en rejilla con cilindros de acero inoxidable y se conectó a un generador de choques desarrollado por Panlab. Durante el entrenamiento, los animales se colocaron en la cámara uno cada vez. Después de cuatro minutos de exploración dentro de la cámara, se administró un choque en los pies (2 segundos y 0,4 mA), seguido de un segundo choque en los pies (2 segundos y 0,4 mA) un minuto después. Treinta segundos después del segundo choque en los pies, el ratón se colocó de vuelta en su jaula de alojamiento. El comportamiento animal se supervisó cada 2 segundos durante el transcurso del experimento. El periodo que los ratones pasaron inmóviles en la cámara se consideró "bloqueo" y se puntuó durante estos periodos. El tiempo que los ratones pasaron inmóviles después del primer choque se grabó durante un periodo de 60 segundos y se expresó como un porcentaje.

El comportamiento de los ratones para permanecer inmóviles y "bloquearse" en respuesta a un choque en los pies es una medida de su nivel de ansiedad. Cuanto mayor sea la duración del "bloqueo" durante este ensayo conductual, mayor será el nivel de ansiedad de los animales.

5 Se observaron diferencias entre los grupos ensayados (normales no estresados, estrés en la vida temprana y estrés en la vida temprana + punicalagina) después del primer choque (FIG. 42). El estrés en la vida temprana condujo a aumento de la ansiedad en ratones como se demuestra por el mayor tiempo en bloqueo después del choque en los pies, en comparación con sus compañeros de camada no estresados (FIG. 42). El tratamiento con punicalagina redujo y normalizó estos niveles de ansiedad elevados dando como resultado estrés en la vida temprana, como se muestra por un tiempo de bloqueo reducido después del choque en los pies (FIG. 42). Estas observaciones en el modelo de estrés temprano ilustran los efectos ansiolíticos de punicalagina.

15 El aumento de la ansiedad experimentado por animales expuestos a estrés en la vida temprana también se observa en la extinción (es decir, desaparición) de la memoria contextual (es decir, la memoria que asocia el contexto del ambiente con el choque) inducida por este ensayo. Para examinar la fuerza de la ansiedad desarrollada durante el condicionamiento del miedo contextual (como se ha descrito anteriormente), los animales se colocaron en la misma cámara y contexto durante 3 min al día (mismo momento del día, sin embargo sin choque en esta ocasión) durante los 12 días después del ensayo inicial. El comportamiento de bloqueo inducido por el simple reconocimiento por los animales de la cámara, donde recibieron el choque inicial, se midió durante cada uno de estos periodos de 3 minutos diarios.

25 Los grupos de animales (normales no estresados, estrés en la vida temprana y estrés en la vida temprana + punicalagina) mostraron diferencias en la disminución de su recuerdo contextual del choque durante los siguientes 12 días (FIG. 43). En este gráfico, la duración del bloqueo se presenta como el porcentaje de tiempo pasado inmóvil el día 1 (por ejemplo, si un ratón estuvo inmóvil durante 60 segundos el día 1 y 30 segundos el día 8, el porcentaje de inmovilidad es del 100 % el día 1 y es del 50 % el día 8).

30 Los ratones normales, no estresados, mostraron una disminución predecible en el recuerdo contextual durante el periodo de 12 días (FIG. 43). Los ratones con estrés en la vida temprana tuvieron un recuerdo contextual aumentado, que se ilustra por un mayor nivel de bloqueo que sus compañeros de camada no estresados (FIG. 43). Esto muestra un nivel elevado prolongado de ansiedad en estos ratones con separación materna. El tratamiento con punicalagina de ratones con estrés en la vida temprana tuvo un claro efecto en la reducción de la ansiedad como se vio por la extinción del recuerdo contextual. Los ratones con estrés en la vida temprana tratados mostraron una extinción más rápida que ratones con estrés en la vida temprana no tratados, caracterizados por un periodo de tiempo reducido en bloqueo entre los días 8 y 12 (FIG. 43).

#### *Cilindro rotatorio*

40 Para medir los efectos de compuestos derivados de granada en la influencia cognitiva negativa de la separación materna, se ensayaron los efectos en el aprendizaje motor usando el ensayo conductual de cilindro rotatorio. El aparato de cilindro rotatorio consiste en un cilindro de 2 cm de diámetro. Se coloca un ratón en un cilindro rotatorio que se inicia a una velocidad inicial de 5 rpm. La velocidad del cilindro se acelera gradualmente a un ritmo de 8 rpm/min hasta alcanzar una velocidad de 45 rpm. El tiempo hasta la caída se midió con un tiempo de punto de corte de 300 s. Como se muestra en la FIG. 44, los ratones que han experimentado estrés en la vida temprana padecieron aprendizaje motor alterado. Los ratones con separación materna cayeron del cilindro rotatorio más rápido que ratones no estresados normales. El tratamiento con punicalagina restauró las habilidades de aprendizaje motor en animales con estrés en la vida temprana hasta niveles de rendimiento observados en compañeros de camada no estresados normales.

#### *Laberinto de agua de Morris*

55 El ensayo conductual del laberinto de agua de Morris se empleó para evaluar el efecto cognitivo de la separación materna. En este ensayo, el aprendizaje cognitivo se mide por la capacidad de un ratón para localizar una plataforma escondida en una piscina de agua opaca. El aparato consiste en una piscina (140 cm de diámetro) llena de agua a 22 °C. Los ratones escapan del agua nadando hasta una plataforma circular oculta (15 cm de diámetro) colocada 1 cm bajo la superficie del agua. Usando pistas visuales localizadas fuera del laberinto, los ratones son capaces de localizar la plataforma y recordar su localización durante pruebas posteriores. Durante la fase de entrenamiento, los ratones se colocaron en dos posiciones de partida (alternantes) cada hora. La tarea del laberinto de agua de Morris se realizó con 8 pruebas en T1, 6 pruebas en T2 y 4 pruebas en T3 (los días 1, 2 y 3). Los ratones tuvieron un máximo de 60 s para alcanzar la plataforma. El tiempo de escape para alcanzar la plataforma se midió mediante un sistema de seguimiento de vídeo. Como puede observarse en la FIG. 45, el estrés en la vida temprana tuvo un efecto significativo en el aprendizaje cognitivo, tardando los ratones un periodo de tiempo mayor en aprender la localización de la plataforma oculta, como se muestra por el tiempo de escape aumentado frente a ratones no estresados normales. El tratamiento de estos ratones con separación materna con punicalagina invirtió este efecto negativo del estrés en la vida temprana, reduciendo el tiempo para aprender la localización de la plataforma oculta hasta niveles observados en ratones normales no estresados. Estos resultados demuestran la capacidad de

punicalagina para invertir los efectos cognitivos negativos a largo plazo del estrés en la vida temprana en el aprendizaje y la formación de la memoria.

*Compuestos obtenidos de granada*

5 Tomados juntos los datos anteriores demuestran que compuestos derivados de elagitaninos son capaces de invertir el efecto negativo a largo plazo de la separación en la vida temprana en la depresión, la ansiedad y la cognición.

Ejemplo 20

10 *Efectos de compuestos obtenidos de granada en la memoria y cognición en el tratamiento de ratones normales con compuestos obtenidos de granada*

15 Comenzando a los 3 meses de edad, los ratones se alimentaron con (i) una dieta de control convencional tal como AIN-93G; (ii) una dieta que contiene punicalagina a una concentración de 0,87 mg/kg, para suministrar una dosis aproximada de 90 mg/kg/día (durante un periodo de 3 meses); o (iii) una dieta que contiene urolitina A a una concentración de 0,57 mg/kg, para suministrar una dosis apropiada de 55 mg/kg/día (durante un periodo de 2,5 meses). Las dosis reales varían ligeramente dependiendo del consumo de alimento de cada ratón individual, así como el peso del ratón. La evaluación conductual de cognición se midió después de este periodo.

20 *Ensayo conductual para medir los efectos de compuestos obtenidos de granada en la cognición*

25 Para examinar el efecto de compuestos obtenidos de granada en la memoria y la cognición, los ratones se examinaron con respecto a mejoras en la memoria contextual utilizando el ensayo de condicionamiento del miedo contextual. Los ratones se entrenaron en una cámara de condicionamiento del miedo como se describe en el ejemplo 19.

30 Durante el entrenamiento, los animales se colocaron en la cámara uno cada vez. Después de cuatro minutos de exploración dentro de la cámara, se administró un choque en los pies (2 segundos y 0,4 mA), seguido de un segundo choque en los pies (2 segundos y 0,4 mA) un minuto después. Treinta segundos después del segundo choque en los pies, el ratón se colocó de vuelta en su jaula de alojamiento.

35 Un día después, los animales entrenados se devolvieron a la cámara durante un periodo de tres minutos. Durante este periodo los ratones se supervisaron con respecto a su movimiento. La cantidad de tiempo pasado inmóvil o "bloqueado" se puntuó como un porcentaje del tiempo total (3 minutos) en observación. El tiempo pasado inmóvil es una medida de la fuerza de la memoria de los ratones para recordar el contexto en el que se entrenaron. El tratamiento tanto con el elagitanino obtenido de granada punicalagina como con el metabolito de ácido eláxico urolitina A condujo a mejoras significativas de la memoria contextual con respecto a ratones de control no tratados como se determinó por su memoria contextual 24 horas después del periodo de entrenamiento (FIG. 46).

40 Para determinar el efecto de estos compuestos obtenidos de granada en la conservación de memoria, los ratones normales alimentados con (i) una dieta de control; (ii) punicalagina (durante un periodo de 3 meses) o (iii) urolitina A (durante un periodo de 2,5 meses) se estudiaron con respecto a su recuerdo de memoria los días 1, 2, 3, 4 y 5 después del entrenamiento del miedo contextual inicial.

45 Los animales se colocaron en la misma cámara y contexto durante 3 min al día (mismo momento del día, sin embargo sin choque en esta ocasión) durante los 5 días después del ensayo inicial. El comportamiento de bloqueo inducido por el simple reconocimiento contextual por los animales de la cámara, donde recibieron el choque inicial, se midió durante cada uno de estos periodos de 3 minutos diarios. La capacidad para reconocer el contexto en ausencia del estímulo es una medida de la memoria contextual.

50 A medida que pasaban los días los ratones de control no tratados comenzaron a tener una extinción de su memoria para este estímulo contextual, como se demuestra por una reducción del alcance del bloqueo (FIG. 47). Los ratones tratados con punicalagina o urolitina A demostraron una conservación de memoria mejorada en comparación con ratones de control, no tratados. Esto se ilustra por una capacidad de recordar el contexto inicial durante un periodo más largo, demostrada por un periodo significativamente más largo para la extinción de la memoria contextual (FIG. 47).

55 Estos resultados demuestran que el tratamiento con punicalagina o urolitina A conduce a cognición mejorada, como se demuestra por un aumento significativo en el reconocimiento del contexto y mejora de la conservación de memoria.

Ejemplo 21

65 *Efectos de compuestos obtenidos de granada en la mejora del rendimiento muscular en ratones normales*

Se evaluaron los compuestos derivados de elagitaninos punicalagina y urolitina A con respecto a su capacidad para mejorar el rendimiento muscular. Para examinar los beneficios de punicalagina y urolitina A en la mejora del rendimiento muscular, sus efectos se examinaron usando dos ensayos conductuales: (i) el ensayo de cilindro rotatorio, que mide el rendimiento muscular y las habilidades motoras, incluyendo la coordinación, y (ii) el ensayo de resistencia en cinta continua, que mide el rendimiento muscular y la resistencia.

#### *Ensayos conductuales para medir los efectos de compuestos obtenidos de granada en el rendimiento muscular*

##### *Ensayo de cilindro rotatorio*

Comenzando a los 3 meses de edad, los ratones se alimentaron con una dieta de control convencional tal como AIN-93G o una dieta que contenía punicalagina para suministrar una dosis de 90 mg/kg/día durante un periodo de 3 meses.

Para examinar el efecto de compuestos obtenidos de granada en el rendimiento muscular y las habilidades motoras, los ratones se ensayaron en el ensayo conductual de cilindro rotatorio. El aparato de cilindro rotatorio consiste en un cilindro con un diámetro de 2 cm con 5 compartimentos, de 5 cm de anchura. Se coloca un ratón en un cilindro rotatorio que se inicia a una velocidad inicial de 5 rpm. La velocidad del cilindro se acelera gradualmente a un ritmo de 8 rpm/min. El tiempo hasta la caída se midió con un tiempo de punto de corte de 300 segundos. Los ratones se ensayaron para cuatro pruebas. El tiempo hasta la caída es una medida del rendimiento muscular y las habilidades motoras de los ratones, con un mejor rendimiento reflejado por un mayor tiempo hasta la caída. Se ensayaron ratones de control tanto no tratados como tratados con punicalagina. El elagitanino punicalagina fue capaz de mejorar significativamente el rendimiento muscular y las habilidades motoras en comparación con ratones no tratados. Los ratones tratados con punicalagina fueron capaces de permanecer en el cilindro rotatorio durante un tiempo mayor y a velocidades mayores en comparación con ratones no tratados durante periodos de prueba secuenciales (FIG. 48).

##### *Ensayo de resistencia*

Se aclimataron ratones de 8 semanas de edad normales durante 2 semanas antes del inicio del estudio. Los ratones se alimentaron con una dieta de roedores convencional (dieta de pienso) o una dieta que contenía urolitina A mezclada con el alimento hasta alcanzar una dosis de 55 mg/kg/día suministrada a los ratones. Después de 6 semanas de tratamiento, los ratones se ensayaron con respecto a su rendimiento muscular por medio de un ensayo de resistencia.

Se realizó un ensayo de resistencia usando una cinta continua de velocidad variable en una cámara de plexiglás con un dispositivo de estímulo que consiste en una rejilla de choque unida a la parte posterior de la cinta (Panlab, Barcelona, España). Se hizo correr a los ratones a 10 cm/s y a 0° de pendiente durante 5 min. La velocidad se incrementó después en 2 cm/s cada 5 min, hasta que los ratones estuvieron agotados. Se registró la distancia corrida y el número de choques obtenidos durante intervalos de 5 min. Los ratones se consideraron agotados y se retiraron del experimento cuando recibieron aproximadamente 20 choques en un periodo de 1 min. Los ratones de control no tratados y tratados con urolitina A se ensayaron y se compararon con respecto a su rendimiento.

La mejora del rendimiento muscular y la resistencia se refleja por una capacidad para correr a velocidades mayores en la cinta continua. Los ratones intentarán evitar el choque y correrán a pesar de la velocidad creciente. En un punto determinado los ratones serán incapaces de mantener la velocidad de la cinta y recibirán un choque. Después de alcanzar los tres niveles umbral de choques, los ratones se retiran de la cinta continua. Los ratones que tienen mejor rendimiento muscular y resistencia mejorada serán capaces de mantener la velocidad creciente de la cinta continua y experimentarán menos choques a una velocidad particular. Los ratones tratados con urolitina A corrieron a velocidades mayores que los ratones de control no tratados en este ensayo conductual, lo que ilustra que la urolitina A mejoró el rendimiento muscular y la resistencia en este contexto (FIG. 49).

Estos resultados demuestran que el elagitanino punicalagina y su metabolito urolitina A son capaces de mejorar el rendimiento muscular y las habilidades motoras en mamíferos.

#### Referencias citadas

Bai, N., K. He, *et al.* (2008). "Active compounds from Lagerstroemia speciosa, insulin-like glucose uptake-stimulatory/inhibitory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells." *J Agric Food Chem* 56(24): 11668-74.

Bishop, N. A., T. Lu, *et al.* (2010). "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline." *Nature* 464(7288): 529-35.

Bloss, E. B., W. G. Janssen, *et al.* (2010). "Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex." *J Neurosci* 30(19): 6726-31.

- Bowman, R. E., K. D. Beck, *et al.* (2003). "Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity." *Horm Behav* 43(1): 48-59.
- 5 Cerda, B., J. C. Espin, *et al.* (2004). "The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans." *Eur J Nutr* 43(4): 205-20.
- 10 Cerda, B., P. Periago, *et al.* (2005). "Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds." *J Agric Food Chem* 53(14): 5571-6.
- 15 De Souza Schmidt Goncalves, A. E., F. M. Lajolo, *et al.* "Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps." *J Agric Food Chem* 58(8): 4666-74.
- 20 Del Pozo-Insfran, D., C. H. Brenes, *et al.* (2004). "Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.)." *J Agric Food Chem* 52(6): 1539-45.
- 25 Dumitriu, D., J. Hao, *et al.* (2010). "Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment." *J Neurosci* 30(22): 7507-15.
- 30 Gasperotti, M., D. Masuero, *et al.* "Profiling and accurate quantification of *Rubus* ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis." *J Agric Food Chem* 58(8): 4602-16.
- 35 Gil, M. I., F. A. Tomas-Barberan, *et al.* (2000). "Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing." *J Agric Food Chem* 48(10): 4581-9.
- 40 Greene, L. A. y A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(7): 2424-8.
- 45 Gunning, P. W., G. E. Landreth, *et al.* (1981). "Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells." *J Cell Biol* 89(2): 240-5.
- 50 Harper, M. E., K. Green, *et al.* (2008). "The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity." *Annu Rev Nutr* 28: 13-33.
- 55 Hebert, L. E., P. A. Scherr, *et al.* (2003). "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census." *Arch Neurol* 60(8): 1119-22.
- 60 Joels, M., Z. Pu, *et al.* (2006). "Learning under stress: how does it work?" *Trends Cogn Sci* 10(4): 152-8.
- 65 Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, *et al.* (2005). "Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds." *Am J Clin Nutr* 81(1 Supl): 313S-316S.
- Kujoth, G. C., A. Hiona, *et al.* (2005). "Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging." *Science* 309(5733): 481-4.
- Lee, J. H., J. V. Johnson, *et al.* (2005). "Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS." *J Agric Food Chem* 53(15): 6003-10.
- 50 Maier, S. F. y L. R. Watkins (2005). "Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor." *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5): 829-41.
- 55 Puech, J. L., C. Mertz, *et al.* (1999). "Evolution of castalagin and vescalagin in ethanol solutions. Identification of new derivatives." *J Agric Food Chem* 47(5): 2060-6.
- 60 Pinnock, S. B. y J. Herbert (2001). "Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress." *Eur J Neurosci* 13(3): 576-84.
- 65 Rea, S. L., N. Ventura, *et al.* (2007). "Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*." *PLoS Biol* 5(10): e259.
- Roosendaal, B. (2003). "Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(8): 1213-23.

- Rozovsky, I., M. Wei, *et al.* (2005). "Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP." *Neurobiol Aging* 26(5): 705-15.
- 5 Sandi, C. (2004). "Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules." *Nat Rev Neurosci* 5(12): 917-30.
- Sandi, C. y M. Loscertales (1999). "Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments." *Brain Res* 828(1-2): 127-34.
- 10 Sandi, C. y M. T. Pinelo-Nava (2007). "Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms." *Neural Plast* 2007: 78970.
- Satomi, H., K. Umemura, *et al.* (1993). "Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L." *Biol Pharm Bull* 16(8): 787-90.
- 15 Schriener, S. E., N. J. Linford, *et al.* (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." *Science* 308(5730): 1909-11.
- Shors, T. J. (2004). "Learning during stressful times." *Learn Mem* 11(2): 137-44.
- 20 Tanaka, K., G. Nonaka, *et al.* (1986). "Tannins and Related Compounds. XLI. 1) Isolation and Characterization of Novel Ellagitannins, Punicacorteins A, B, C, and Punigluconin from the bark of *Punica granatum* L." *Chem. Pharm. Bull* 34(2): 656-663.
- 25 Tanaka, K., G. Nonaka, *et al.* (1986). "Tannins and Related Compounds. XLI. 1) Isolation and Characterization of Novel Ellagitannins, Punicacorteins A, B, C, and Punigluconin from the bark of *Punica granatum* L." *Chem. Pharm. Bull* 34(2): 656-663.
- 30 Tanaka, K., G. Nonaka, *et al.* (1986). "Tannins and Related Compounds. XLI. 1). Revision of the Structures of Punicalin and Punicalagin, and Isolation and Characterization of 2-O-Galloylpunicalin from the Bark of *Punica granatum* L." *Chem. Pharm. Bull* 34(2): 650-655.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, *et al.* (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature* 429(6990): 417-23.
- 35 Vrhovsek, U., A. Palchetti, *et al.* (2006). "Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus ellagitannins* evaluated by optimized acid methanolysis." *J Agric Food Chem* 54(12): 4469-75. Wang, C. H., C. C. Wang, *et al.* (2010). "Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 1201: 157-65.
- 40 Xiao, J., A. Pradhan, *et al.* (2006). "Functional role of JNK in neurogenesis of PC12-N1 cells." *Neurosci Lett* 392(3): 231-4.
- 45 Yang, G., F. Pan, *et al.* (2009). "Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories." *Nature* 462(7275): 920-4.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Amazentis SA
- 50 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y TRATAR ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y TRASTORNOS COGNITIVOS
- <130> AZX-005.25
- 55 <150> US 61/426957  
<151> 23-12-2010
- <160> 18
- 60 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
<211> 23  
<212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 1  
 aagtgaggaa ctctctggaa ctg 23

10 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 2  
 ggggtatctt ggtggcttt atg 23

25 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 3  
 aagtggtttt ccagcatggg 20

40 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 4  
 ggctgcaatt ttctaacca 20

55 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 5  
 tcatggaata gagcgcc 17

70 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

80 <400> 6  
 gtgtgctcac cgattctaca 20

85 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 7  
 cccatgtgct cctaccagat 20

10 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 8  
 ccttgaagaa gcgaccttg 20

25 <210> 9  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 9  
 gatcgcaatg ggtgctttg atagaa 26

40 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 10  
 agctgattgg caatgtctcc agcaaa 26

55 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 11  
 gtagcttatg aatgtgtgca actc 24

70 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

80 <400> 12  
 gtcttgcgat cagctcttc atta 24

85 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 13  
 gcacacattt cccacactg 20

10 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 14  
 cccaacctgc ccattctgat 20

25 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 15  
 tccatcaggg tatcctctcc 20

40 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 16  
 ggaggcaagc ataagactgg 20

55 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 17  
 acgtcaaagg gtacctgtcc a 21

70 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

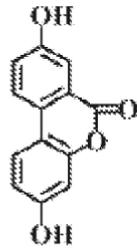
80 <400> 18  
 caatcccaga tggcagaact t 21

**REIVINDICACIONES**

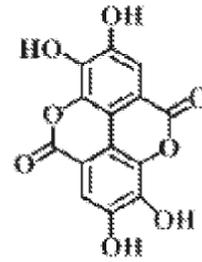
- 5 1. Un producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral que comprende una cantidad eficaz de una urolitina, para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.
- 10 2. El producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral para su uso de la reivindicación 1, en donde la afección es obesidad.
- 15 3. El producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral para su uso de la reivindicación 1, en donde la afección es diabetes mellitus.
- 20 4. El producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral para su uso de la reivindicación 1, en donde la afección es enfermedad cardiovascular.
- 25 5. El producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral para su uso según la reivindicación 1, en donde la afección es un trastorno metabólico.
- 30 6. El producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral para su uso según la reivindicación 1, en donde la afección es hiperlipidemia.
- 35 7. El producto alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la urolitina es urolitina A.
- 40 8. Una urolitina para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.
- 45 9. La urolitina para su uso según la reivindicación 8, en donde la afección es enfermedad cardiovascular.
- 50 10. La urolitina para su uso según la reivindicación 8, en donde la afección es hiperlipidemia.
- 55 11. La urolitina para su uso según la reivindicación 8, en donde la afección es diabetes mellitus.
- 60 12. La urolitina para su uso según la reivindicación 8, en donde la afección es obesidad.
- 65 13. La urolitina para su uso según la reivindicación 8, en donde la afección es un trastorno metabólico.
14. La urolitina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde la urolitina es urolitina A.
15. Uso de una urolitina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.
16. El uso de una urolitina según la reivindicación 15, en donde la afección es obesidad.
17. El uso de una urolitina según la reivindicación 15, en donde la afección es un trastorno metabólico.
18. El uso de una urolitina según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde la urolitina es urolitina A.
19. Una composición que comprende una urolitina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre el grupo que consiste en un trastorno metabólico, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, ácidos grasos libres elevados y síndrome metabólico.
20. La composición para su uso según la reivindicación 19, en donde la afección es obesidad.

21. La composición para su uso según la reivindicación 19, en donde la afección es un trastorno metabólico.
22. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde la urolitina es urolitina A.

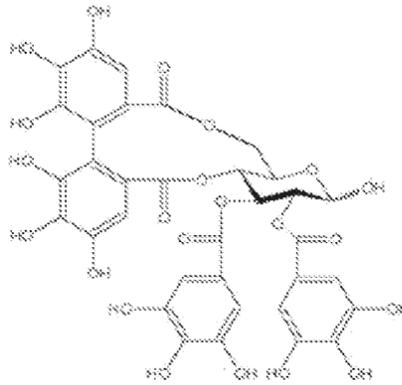
Figura 1



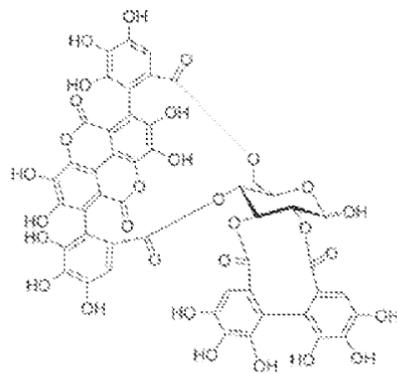
Urolitina A (UA)



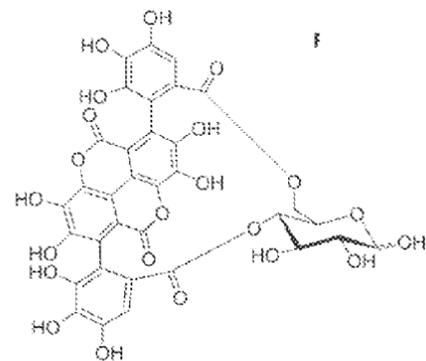
Ácido elágico (AE)



Telimagrandina (TL)



Punicalagina (PA)



Punicalina (PB)

Figura 2

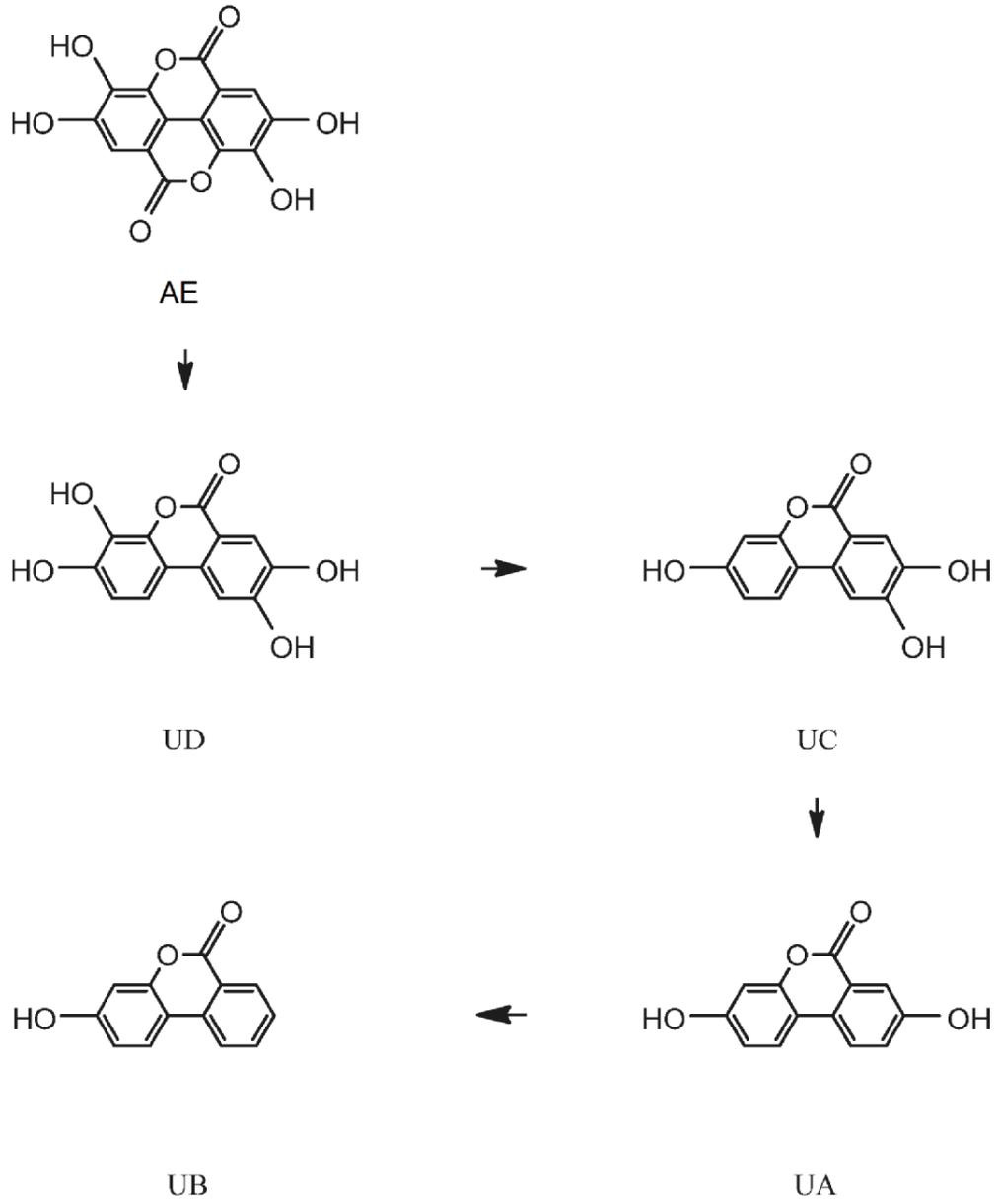
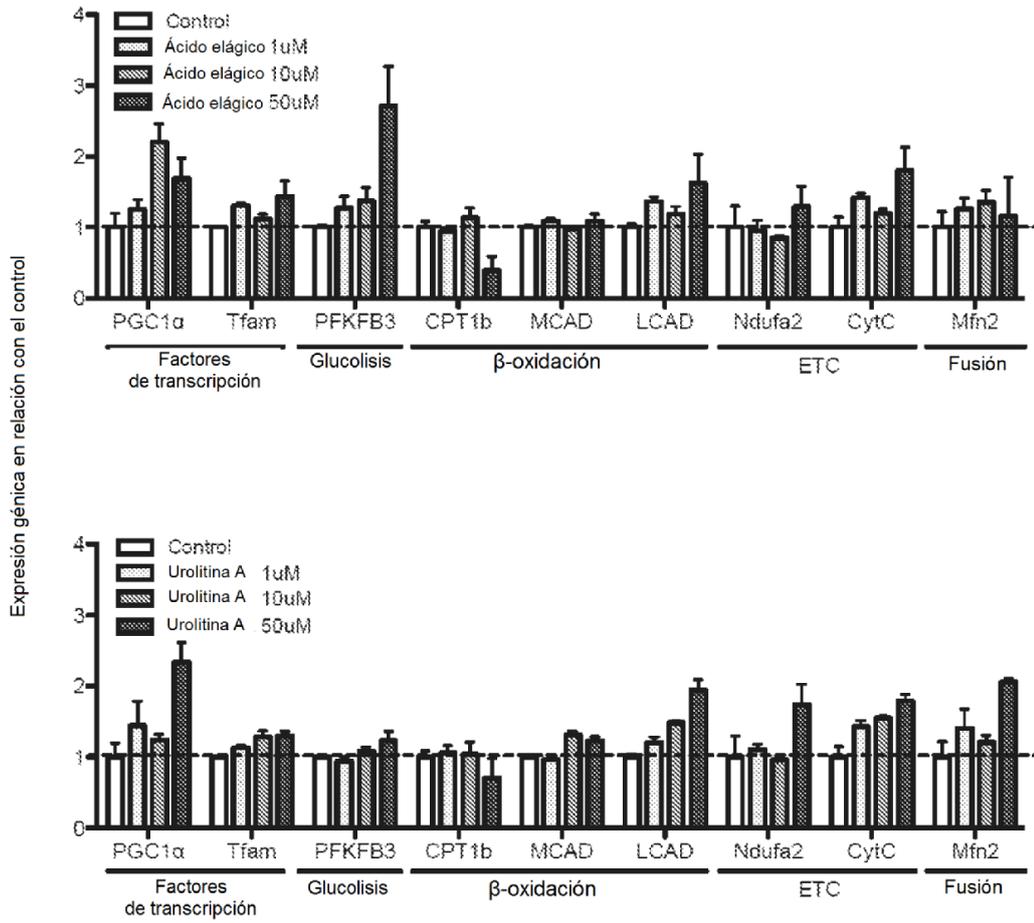


Figura 3



**Figura 4**

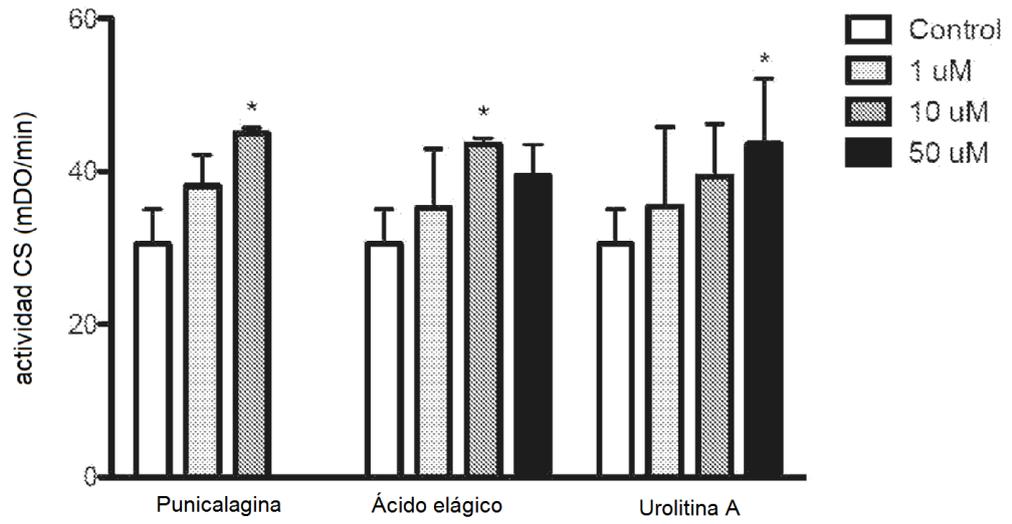


Figura 5

A

IB : P-AMPK



B

IB : AMPK



Control RSV AE 50  $\mu$ M

IB : P-AMPK



IB : AMPK



Control RSV UA 50  $\mu$ M

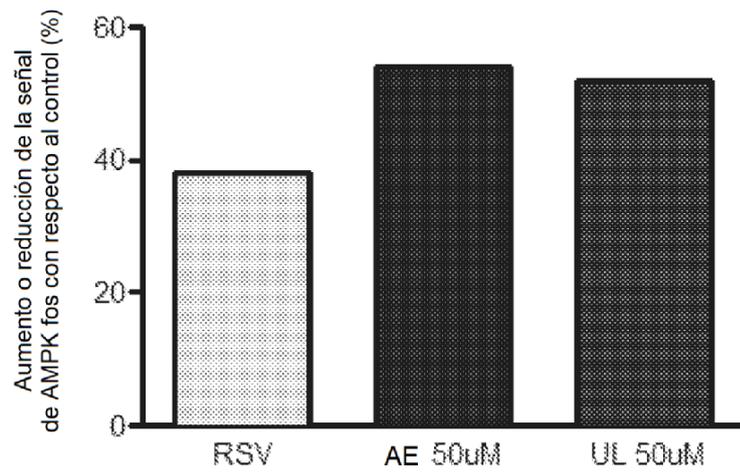


Figura 6

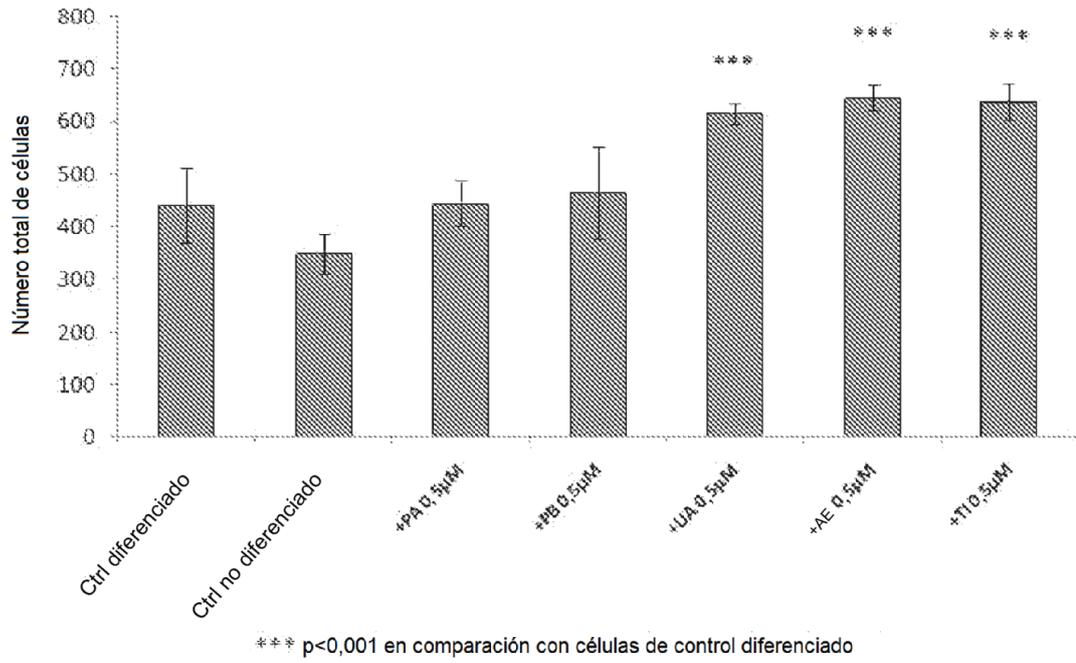
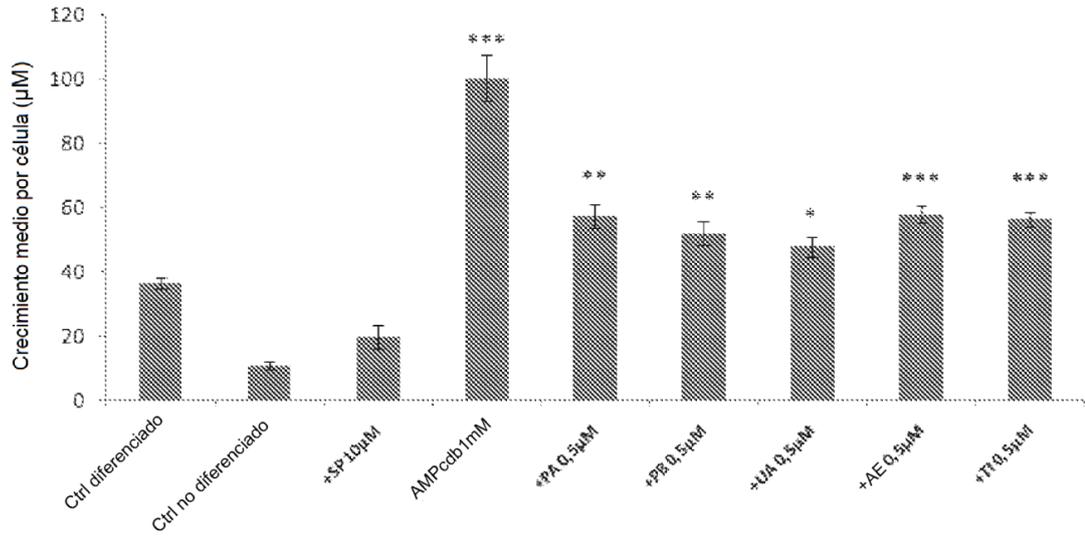
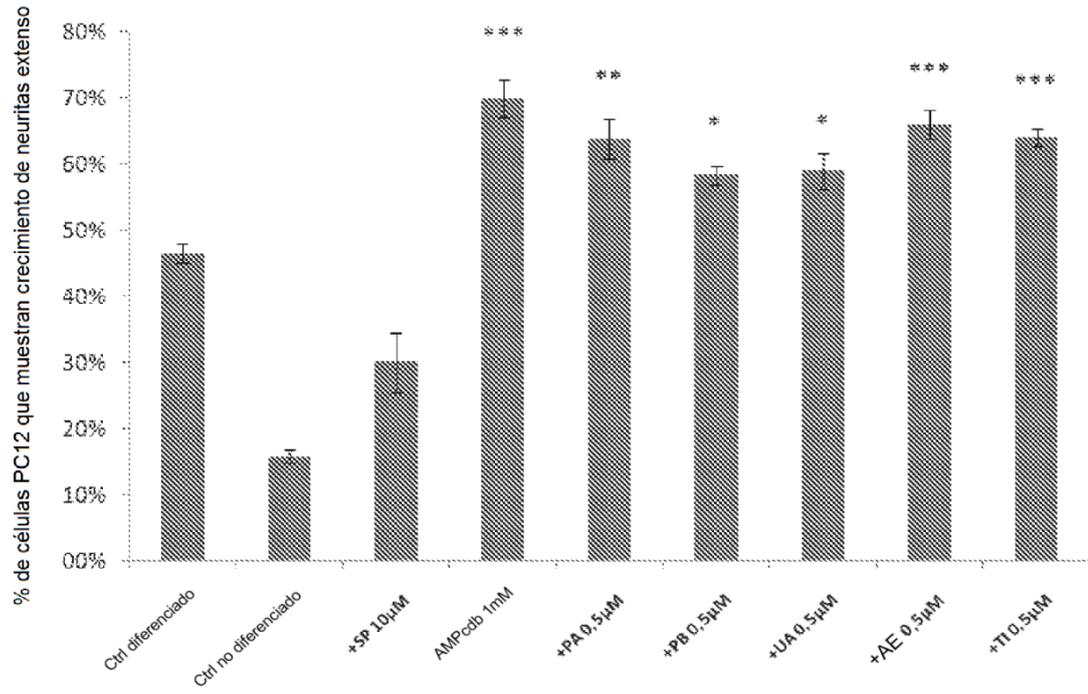


Figura 7



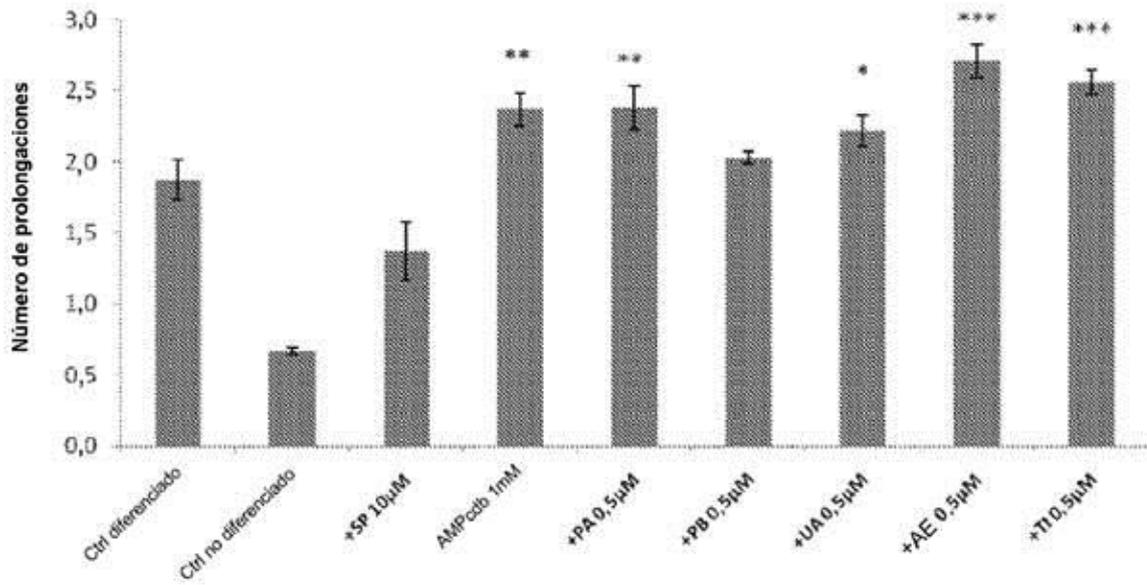
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con células de control diferenciado

Figura 8



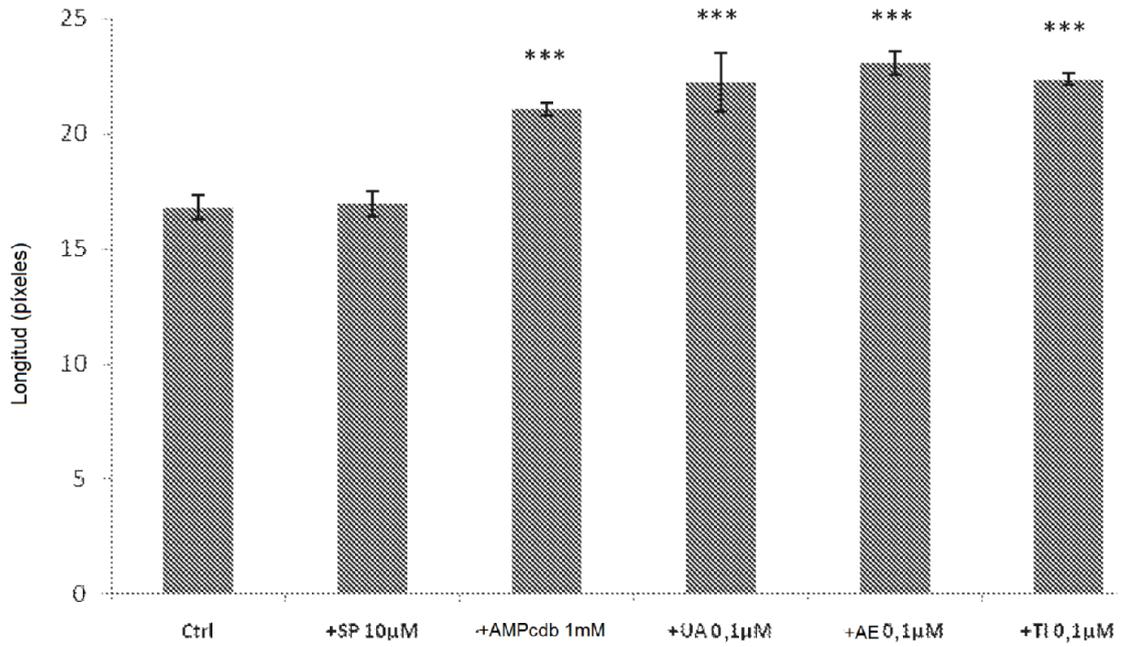
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con células de control diferenciado

Figura 9



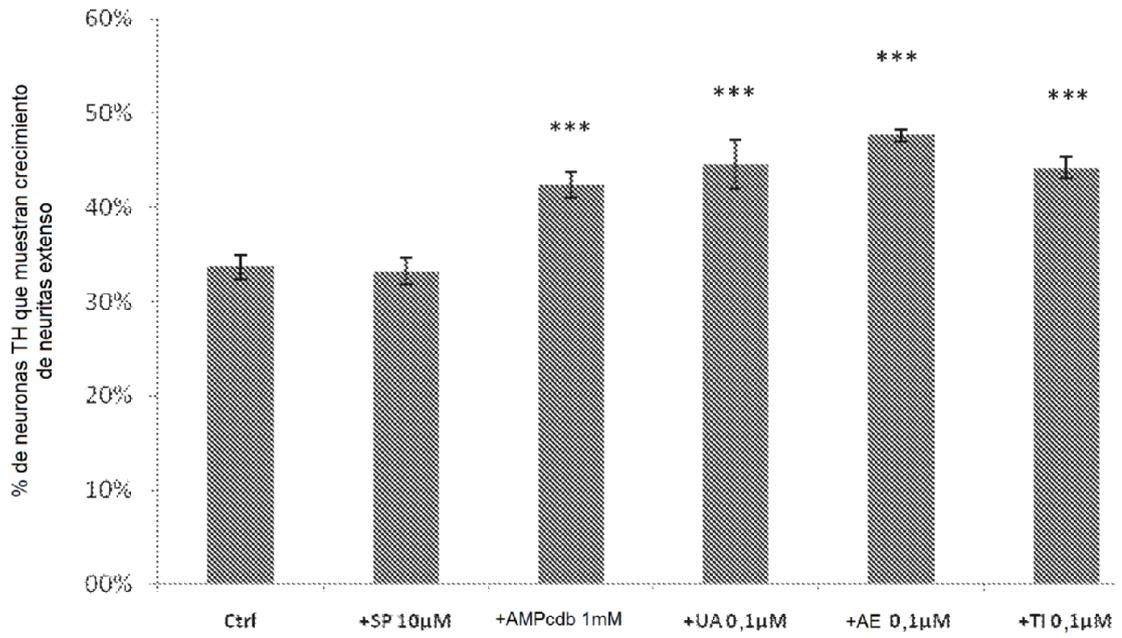
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con células de control diferenciado

Figura 10



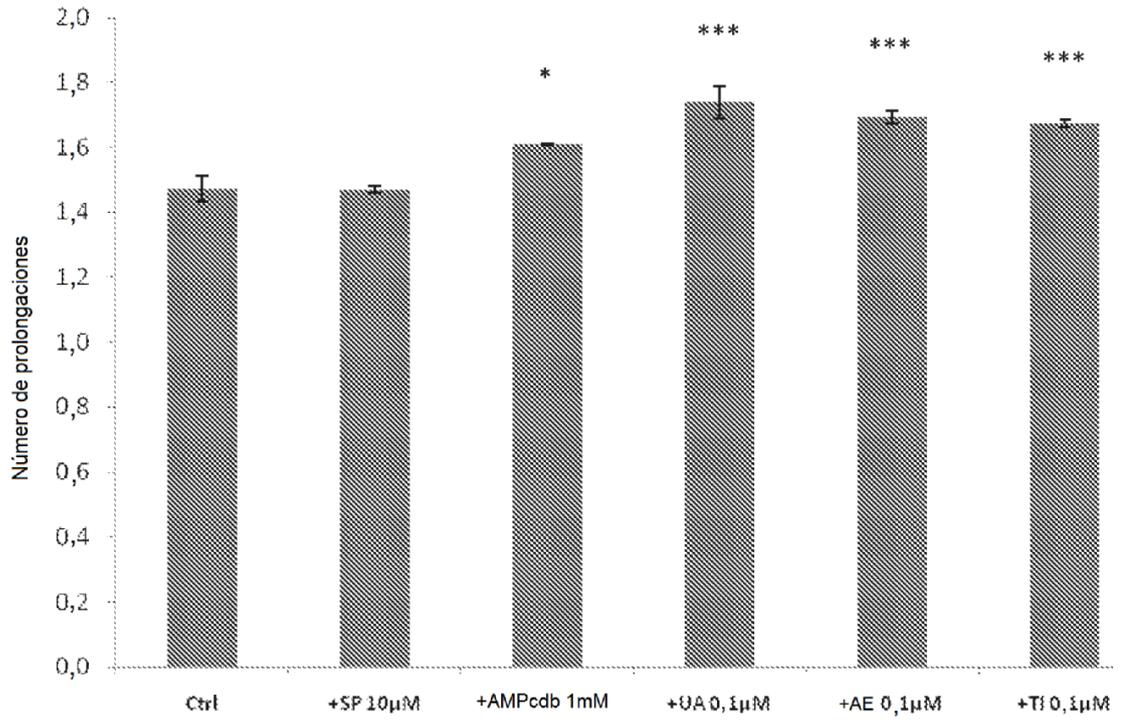
\*\*\* p<0,001 en comparación con células de control diferenciado

Figura 11



\*\*\* p<0,001 en comparación con células de control diferenciado

Figura 12



\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con células de control diferenciado

Figura 13

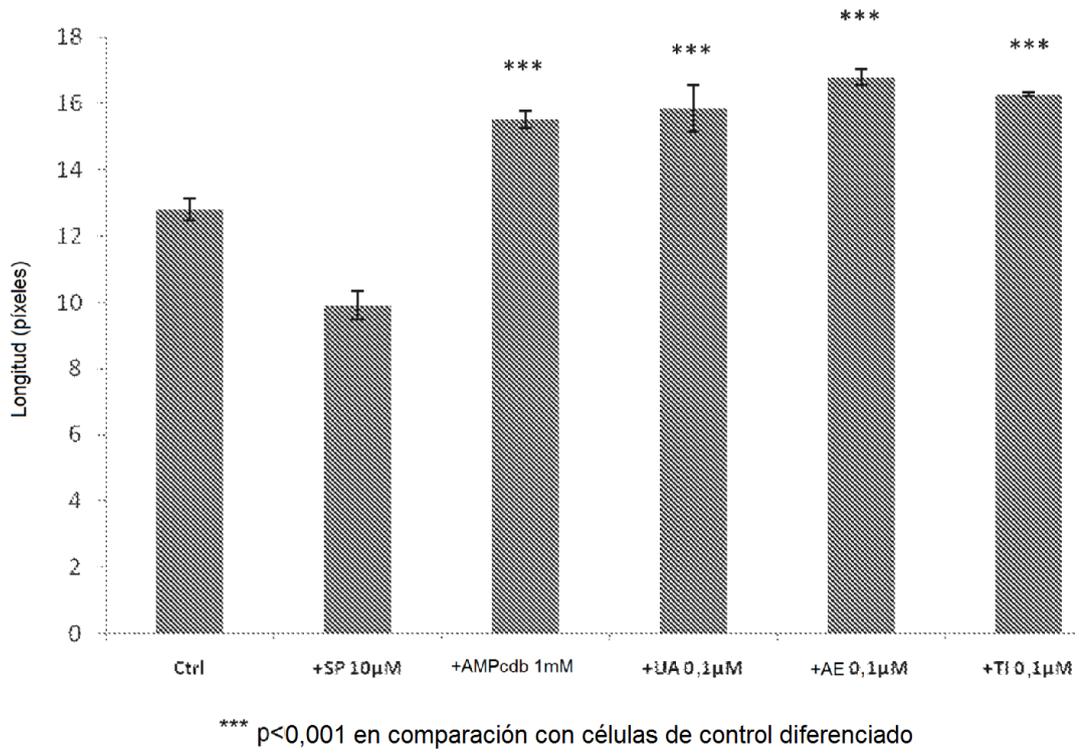
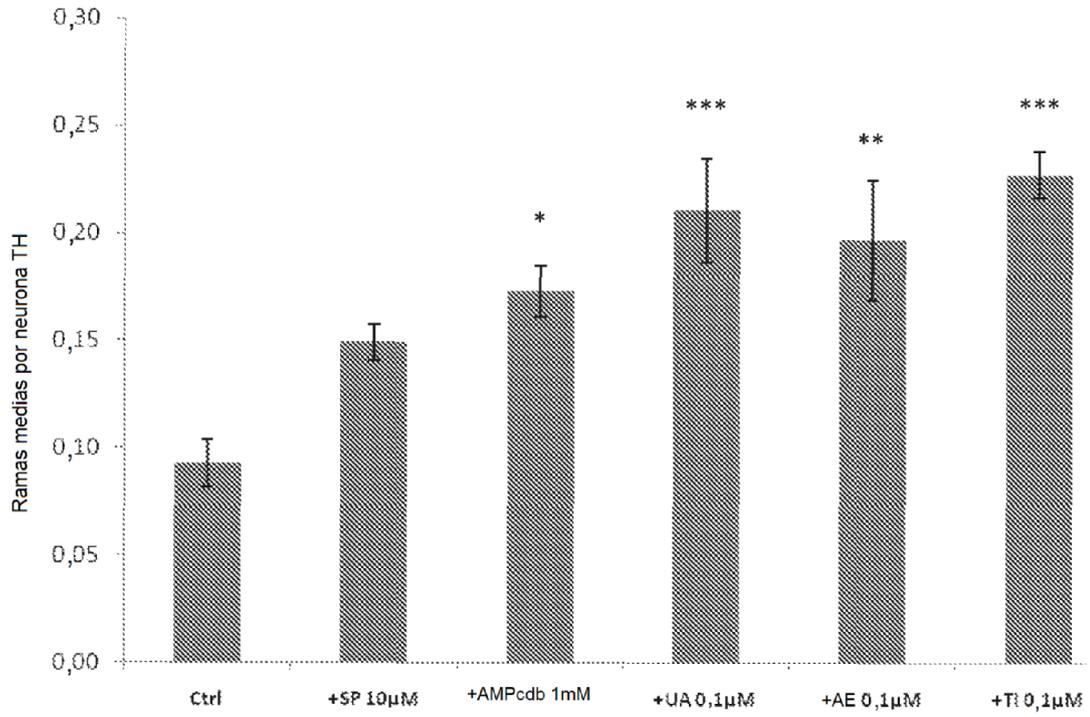
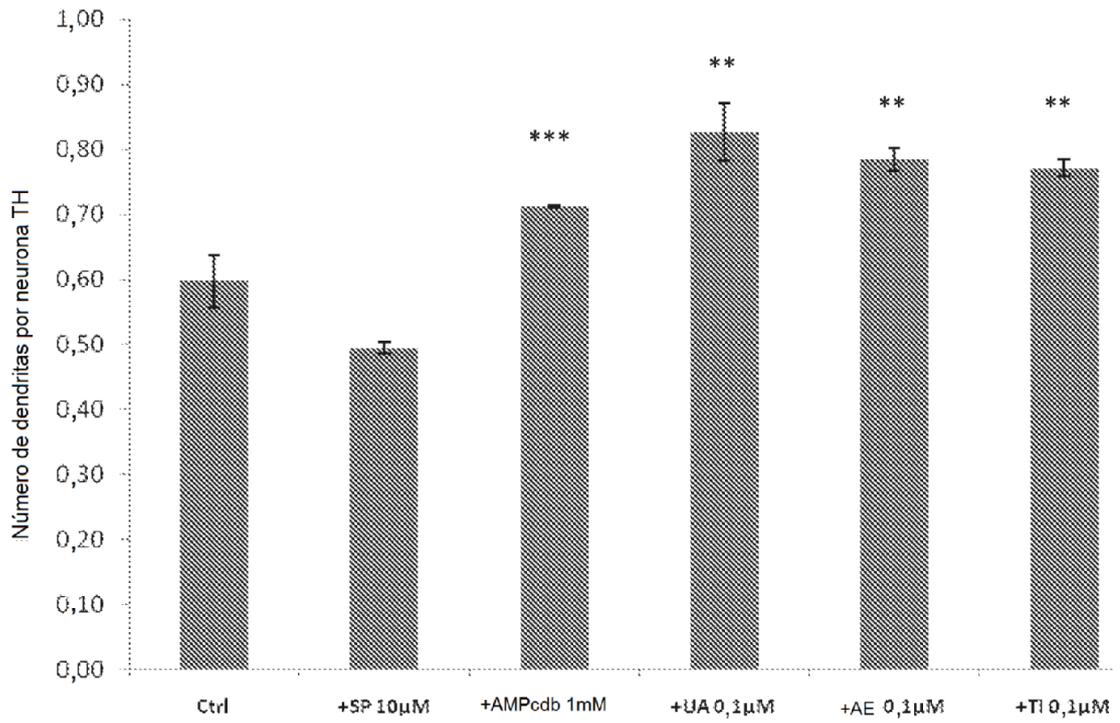


Figura 14



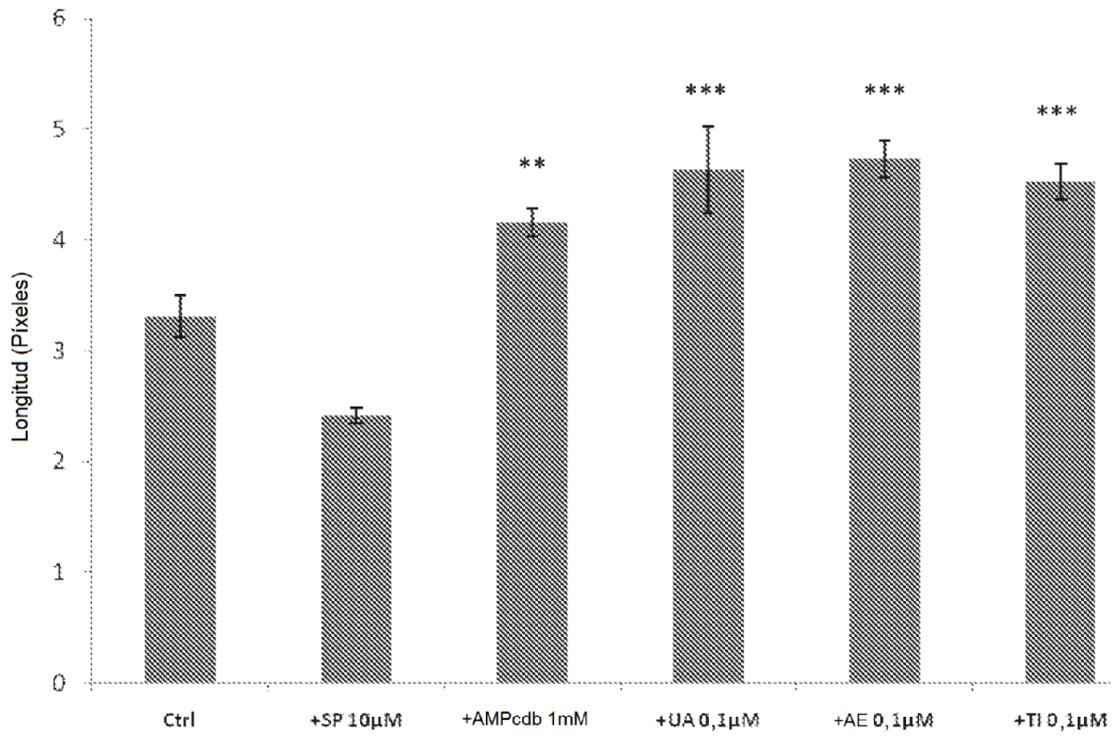
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con células de control diferenciado

Figura 15



\*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 en comparación con células de control diferenciado

Figura 16



\*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001 en comparación con células de control diferenciado

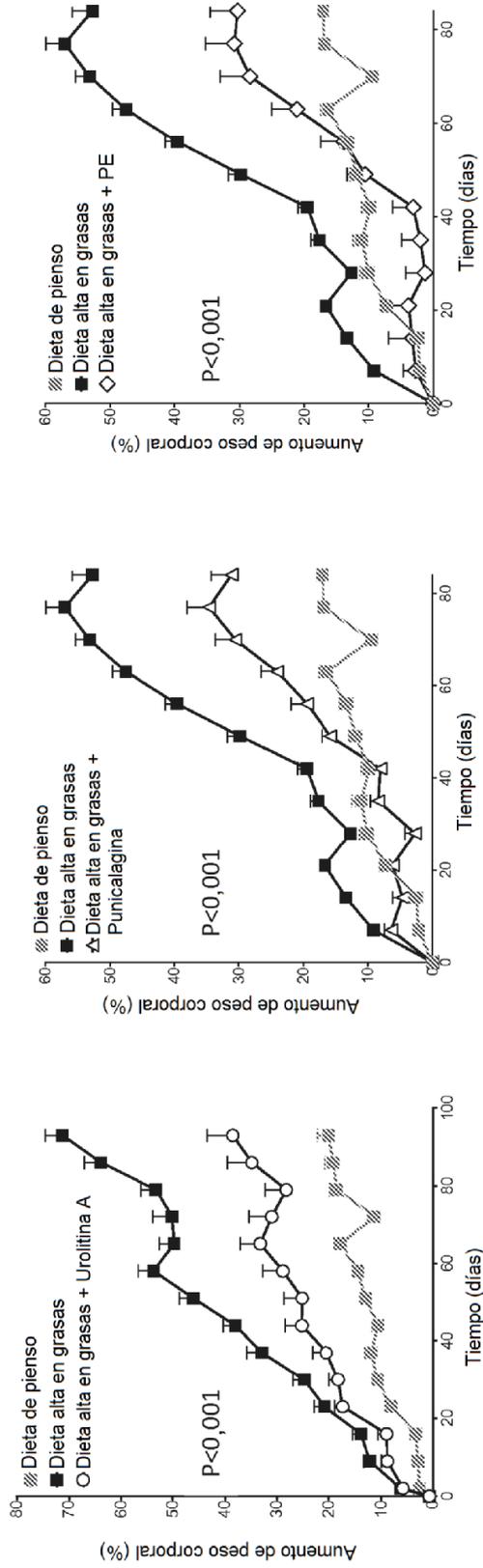


Figura 17A

Figura 17B

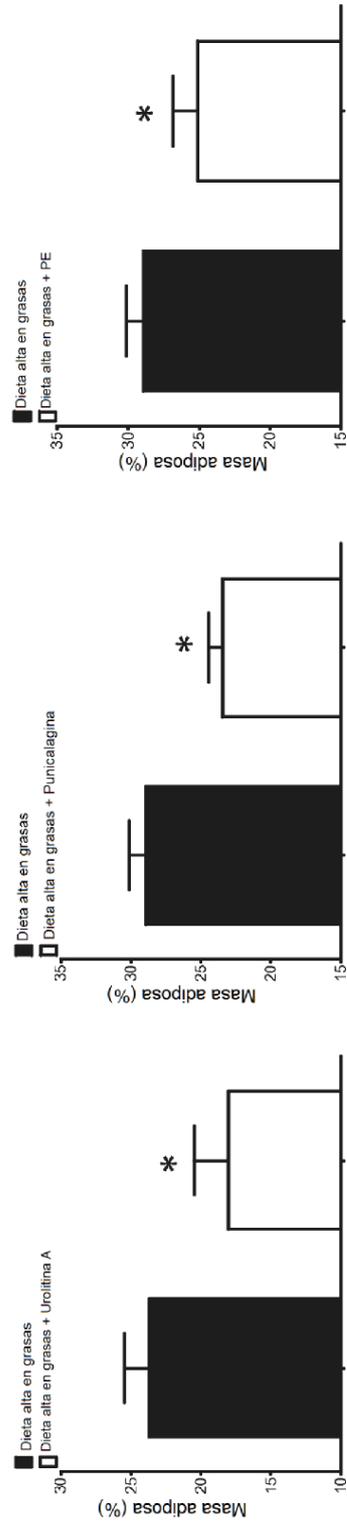


Figura 17C

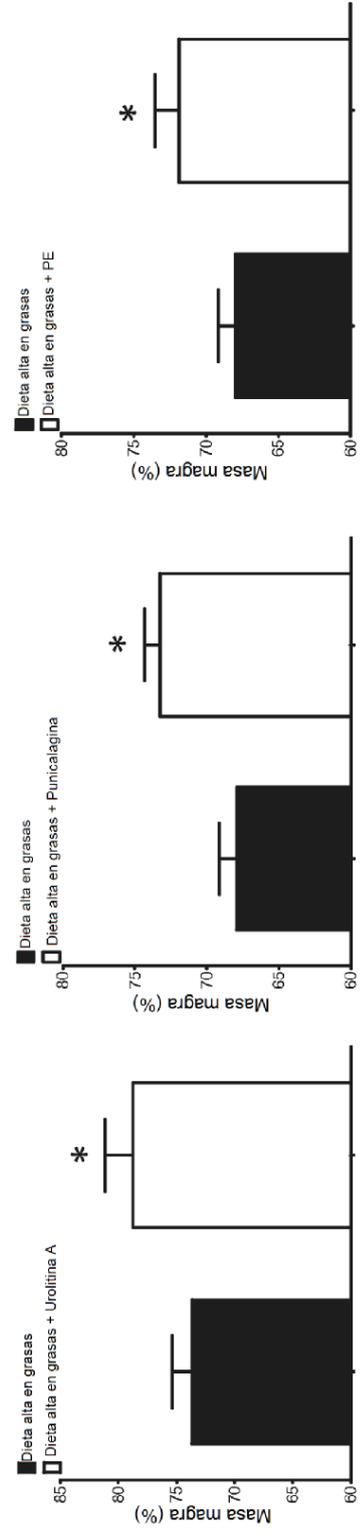


Figura 18

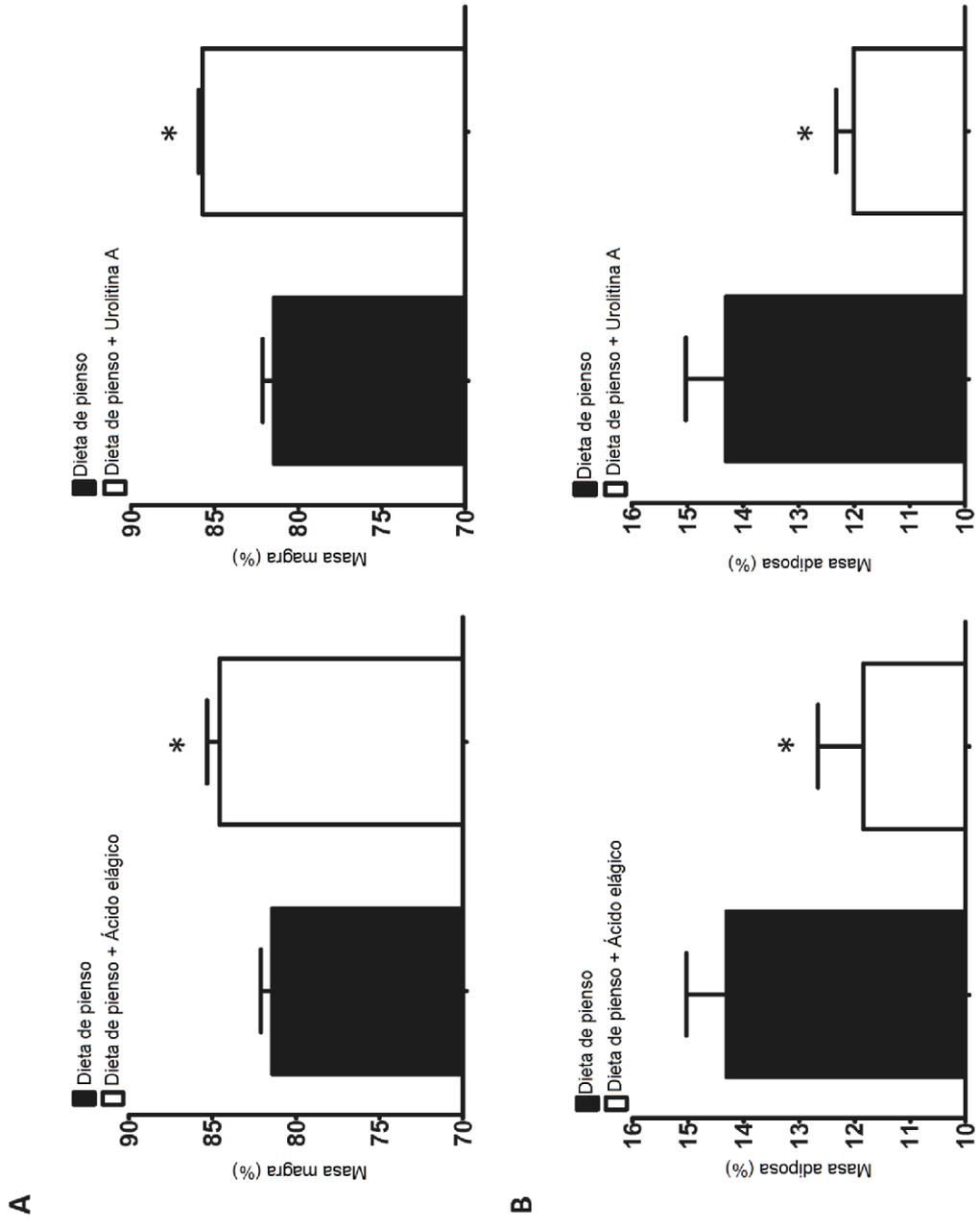


Figura 19

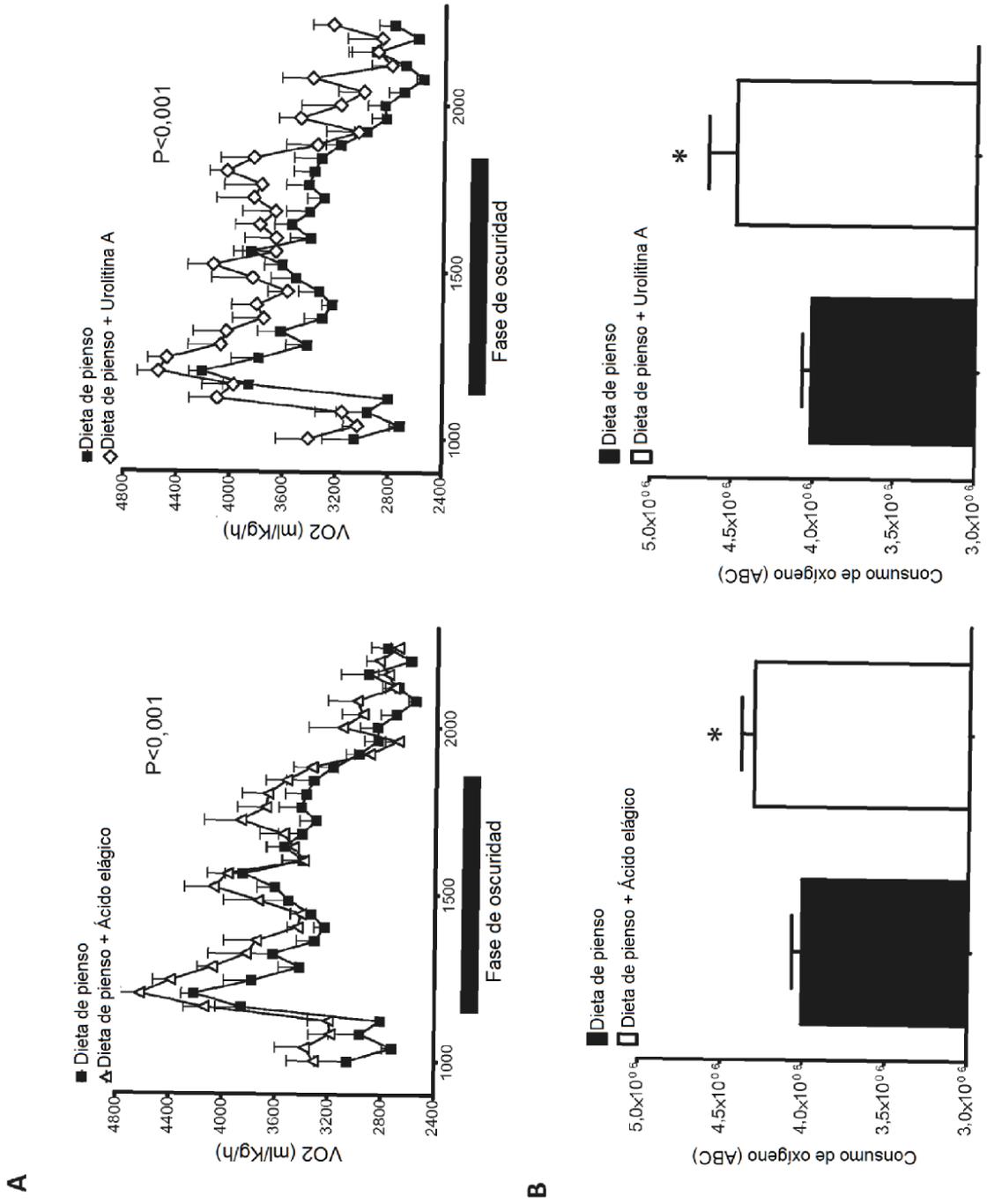


Figura 20

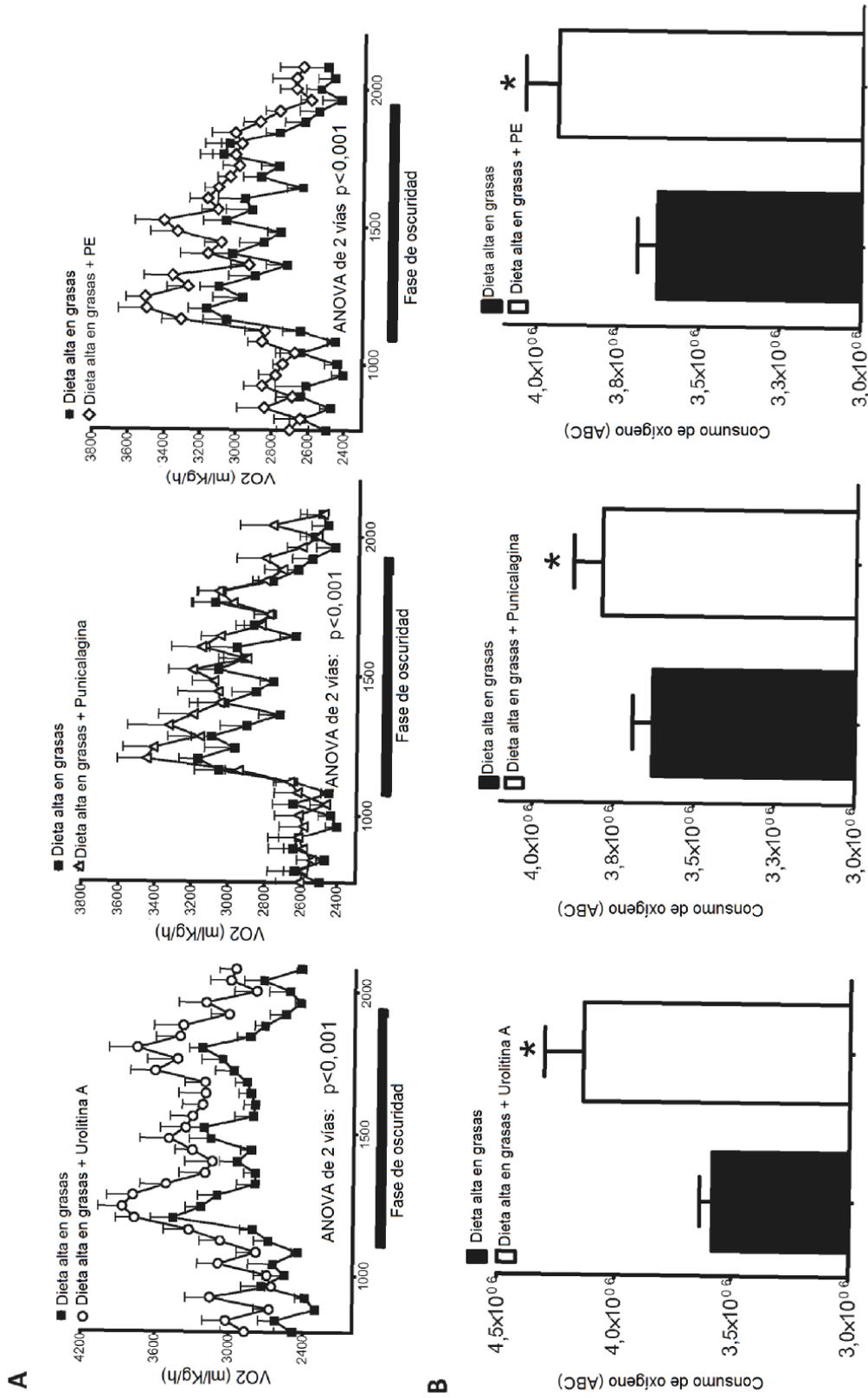
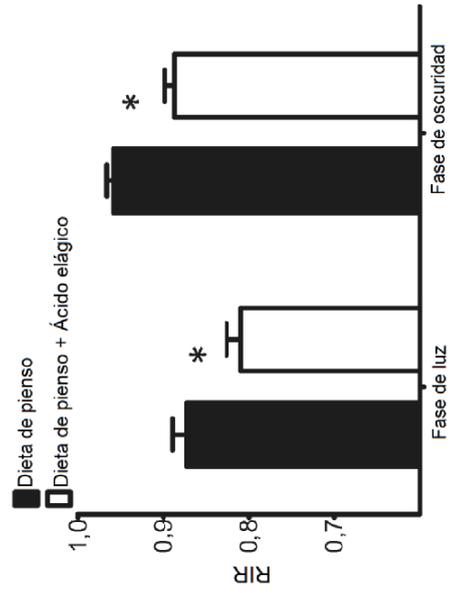
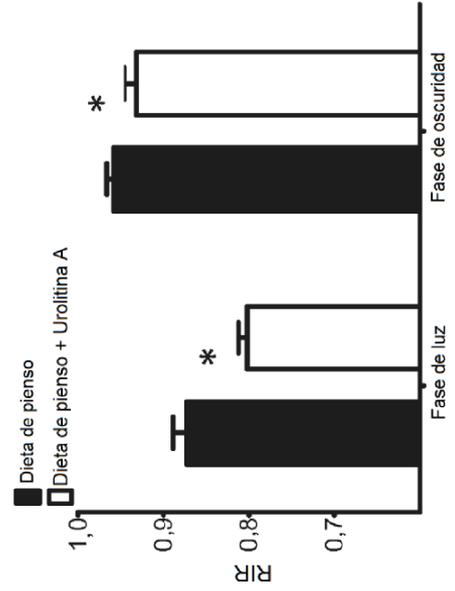
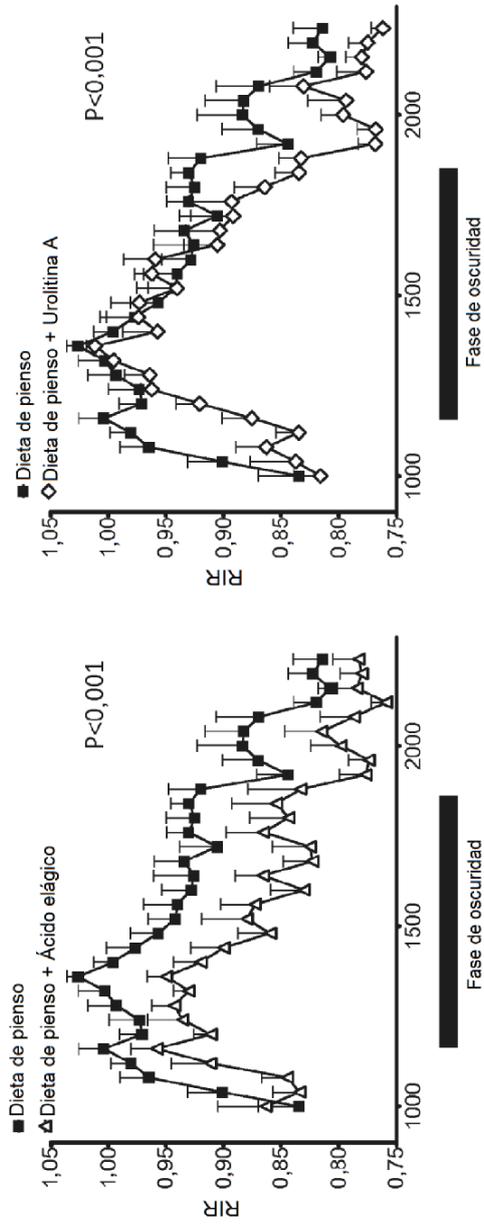


Figura 21

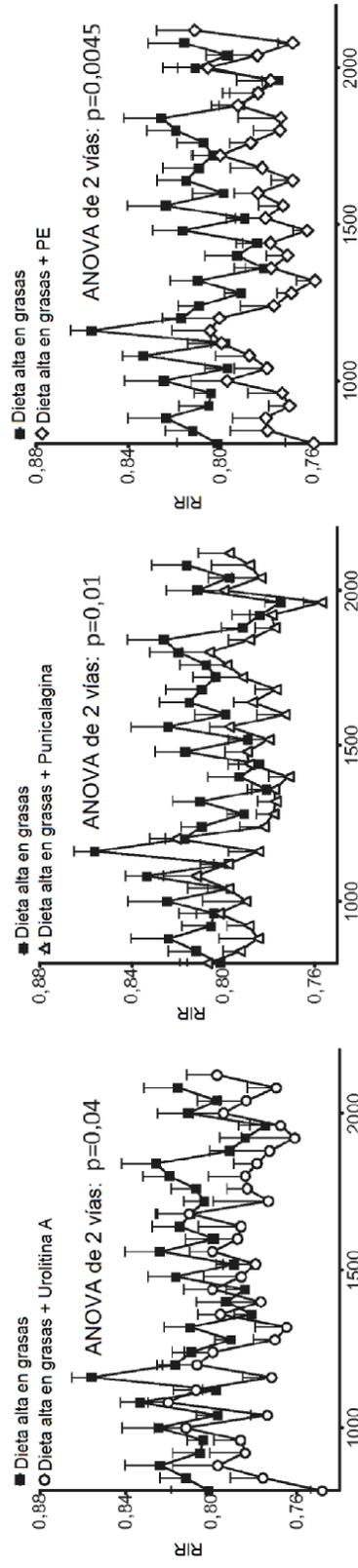
A



B

Figura 22

A



B

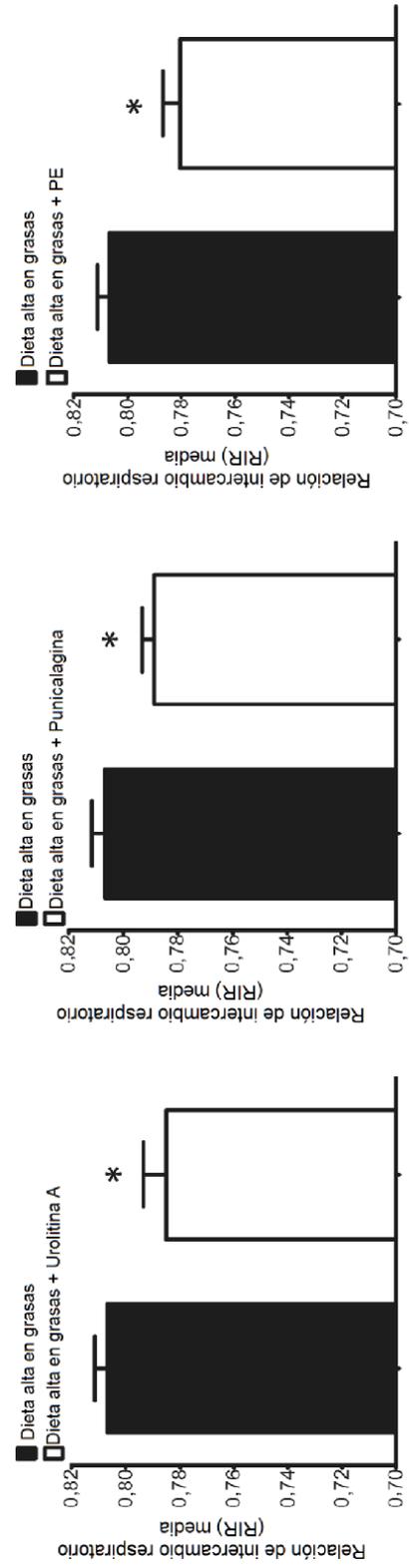
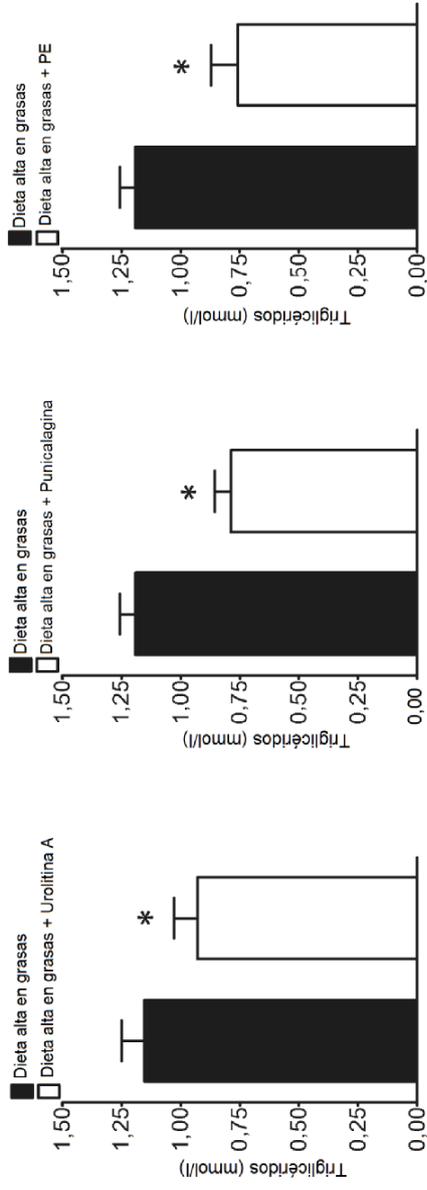


Figura 23

A



B

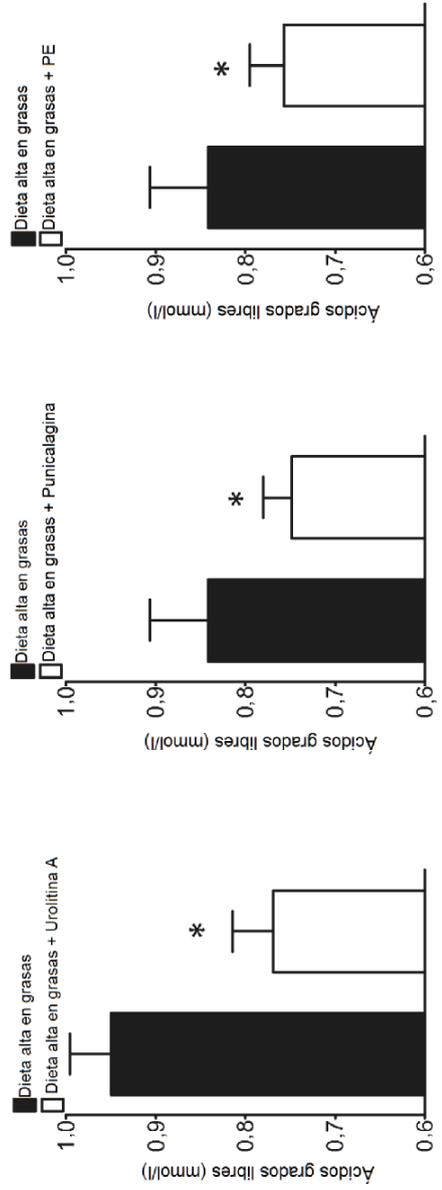
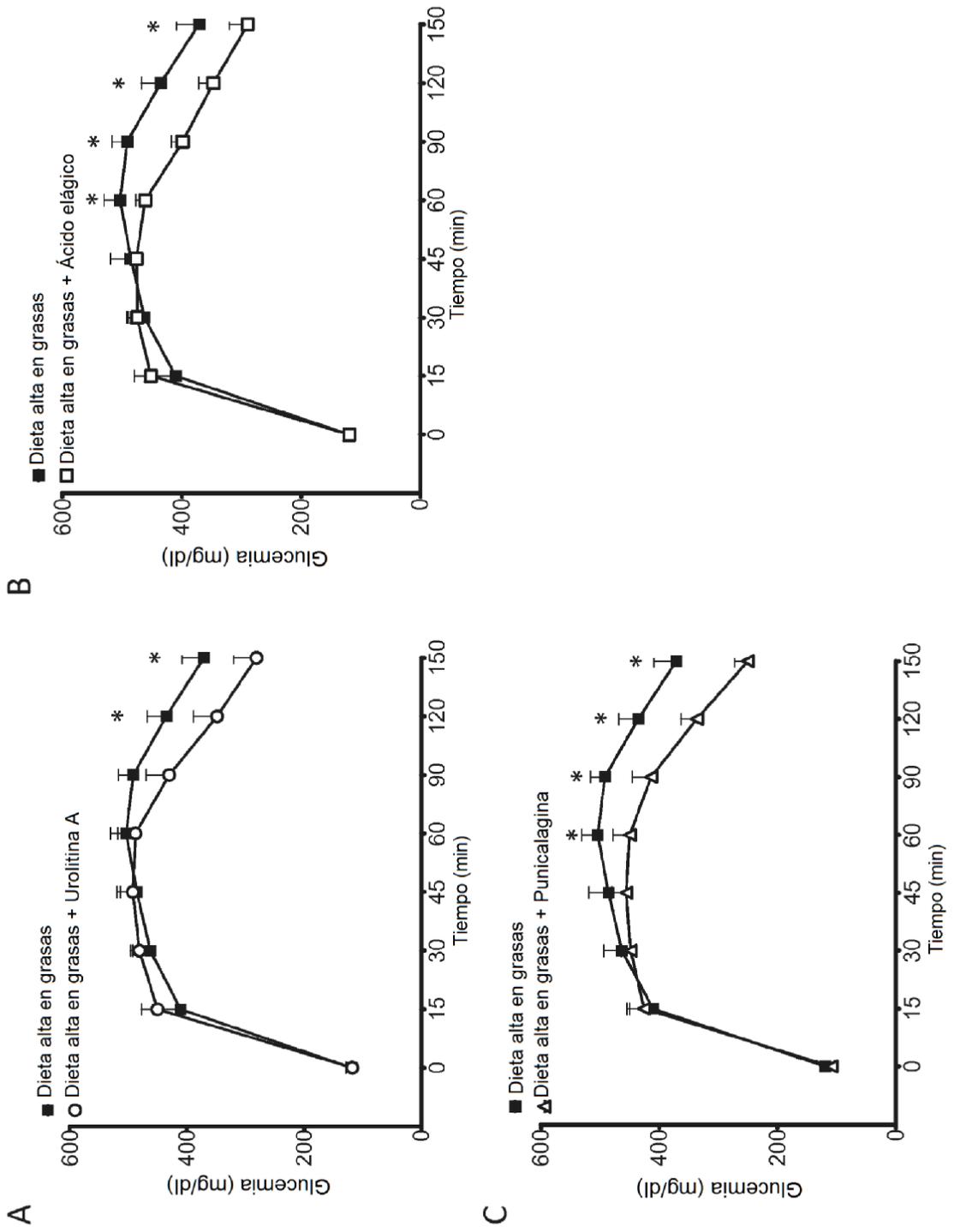


Figura 24



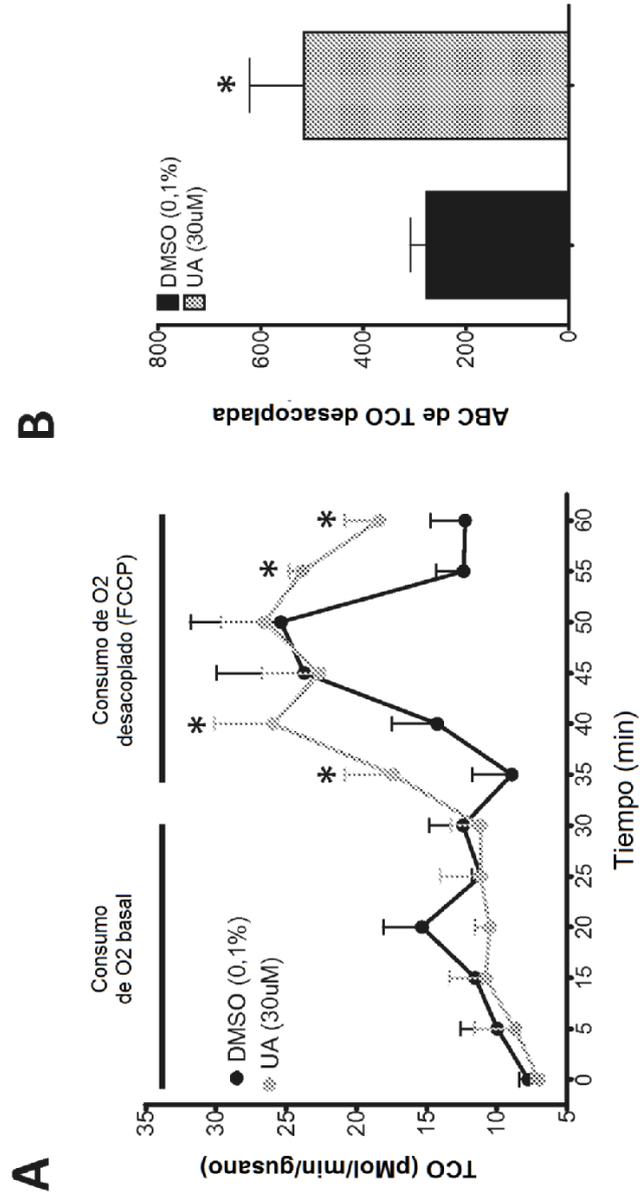


Figura 25

Figura 26

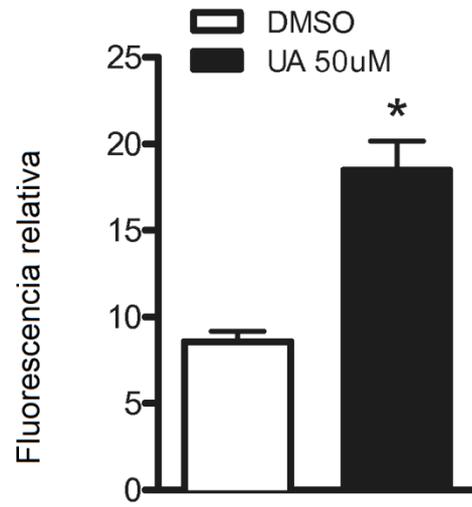


Figura 27

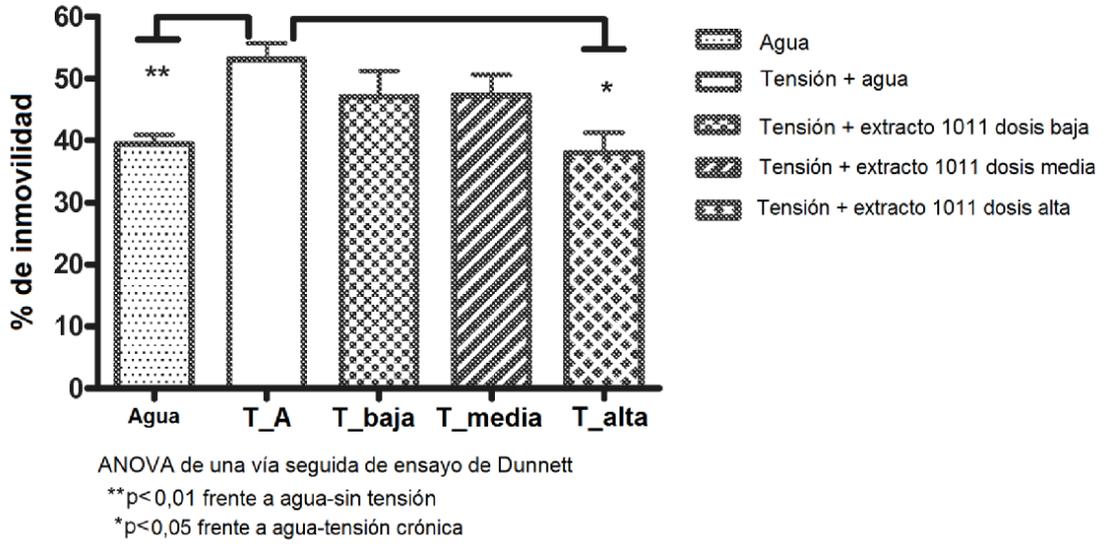


Figura 28

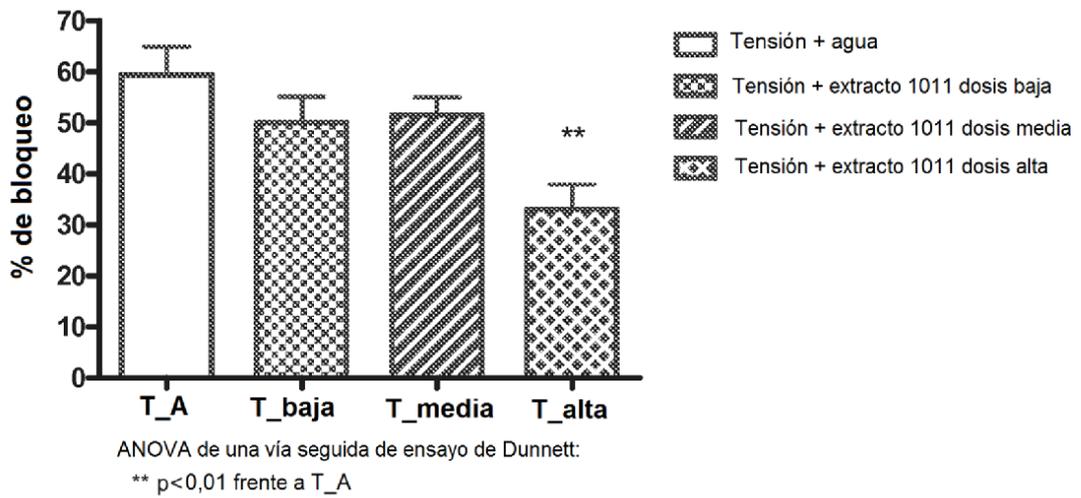


Figura 29

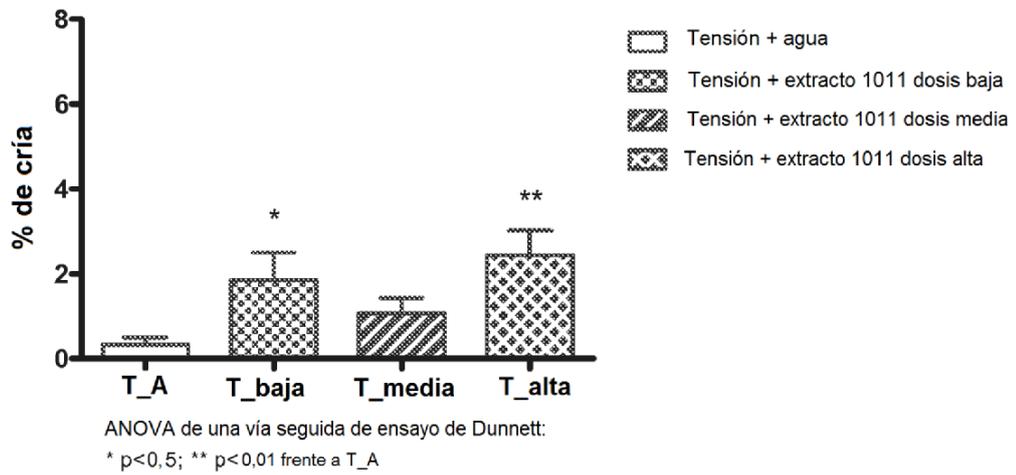


Figura 30

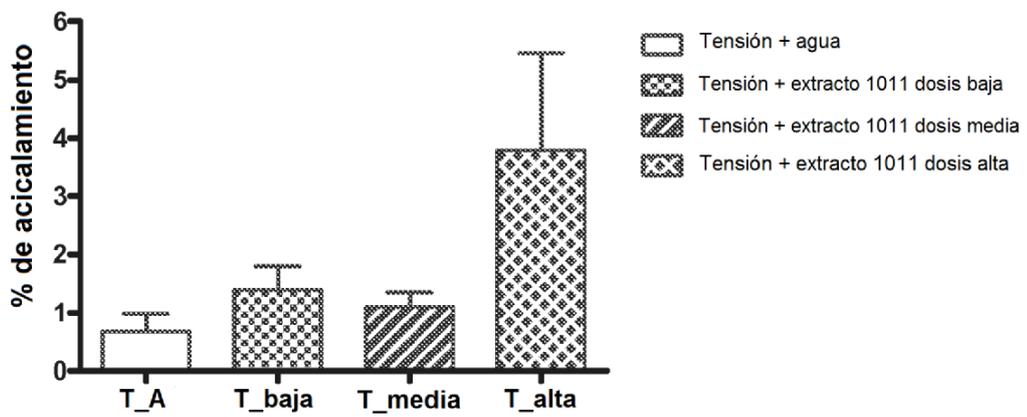


Figura 31

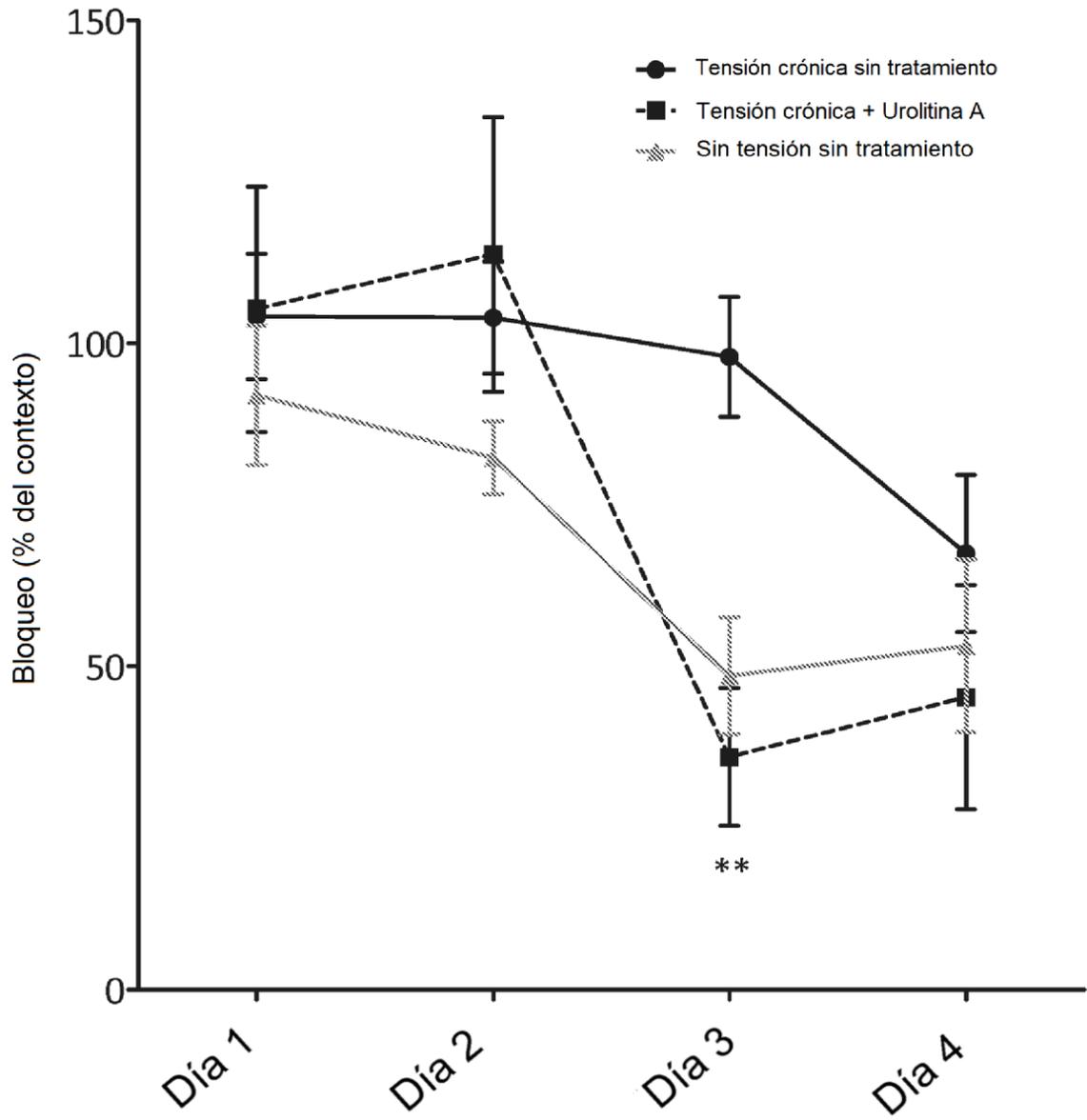


Figura 32

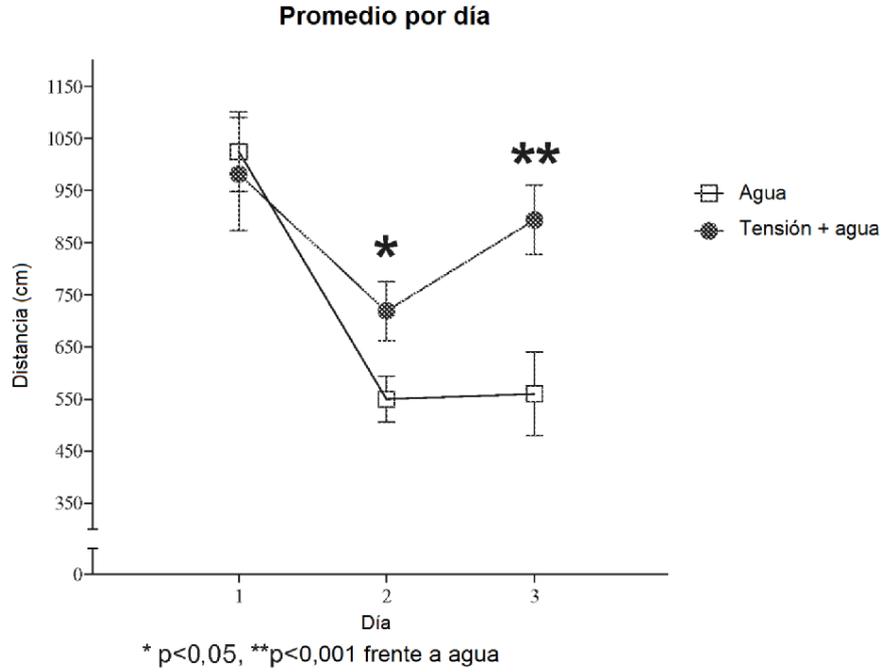


Figura 33

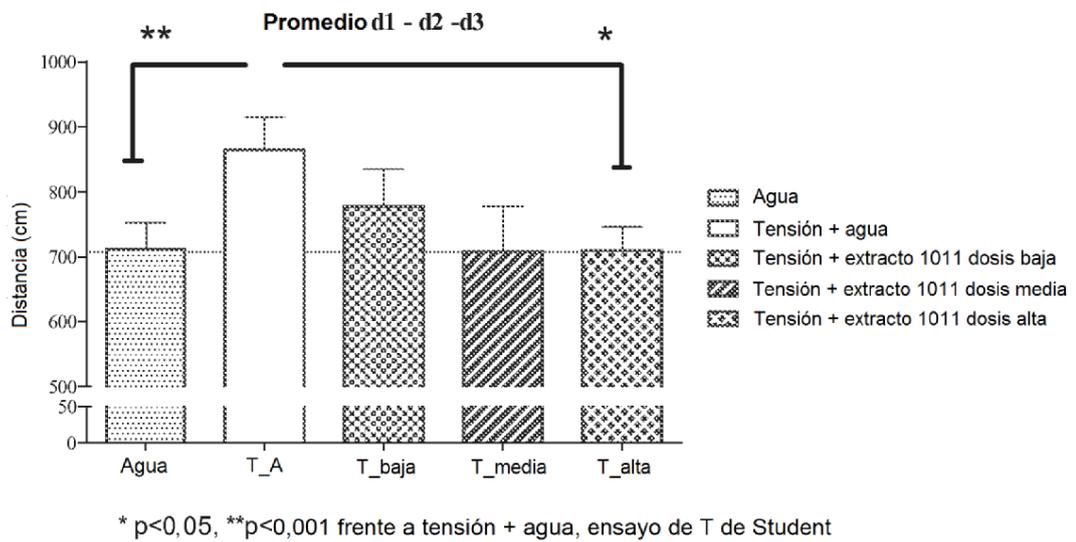


Figura 34

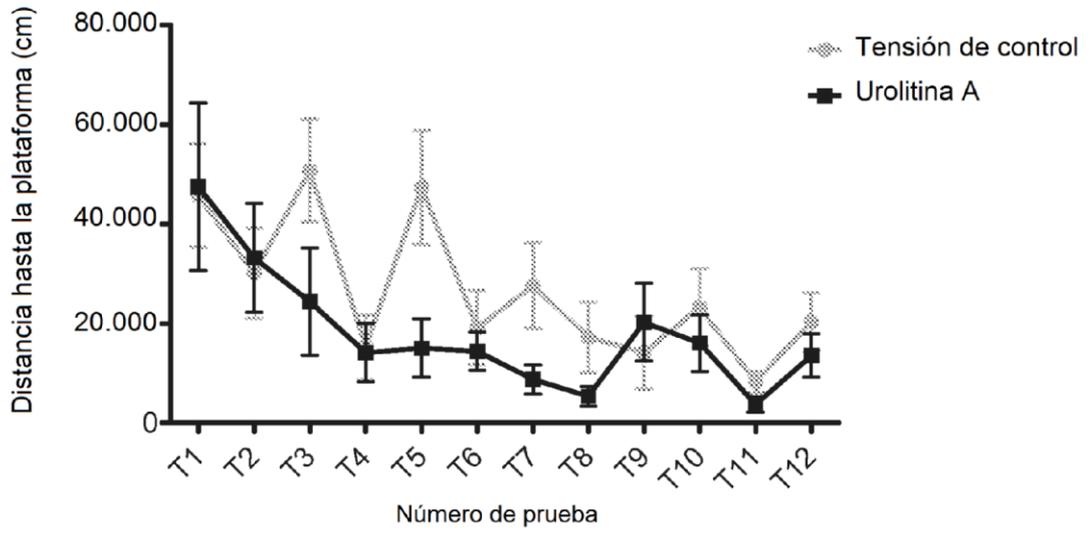


Figura 35

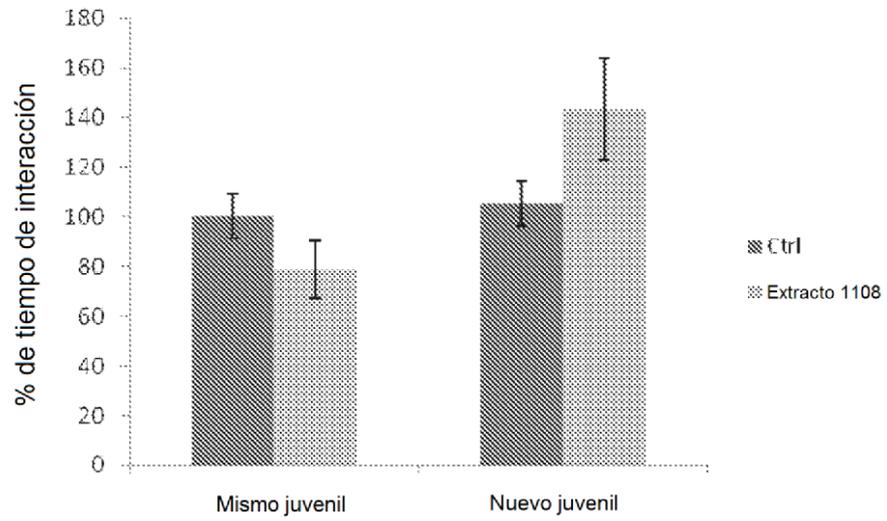


Figura 36

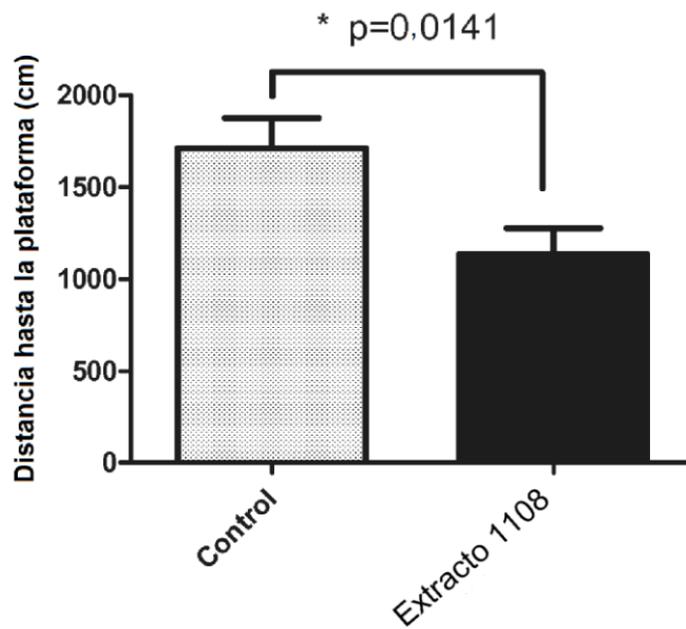


Figura 37

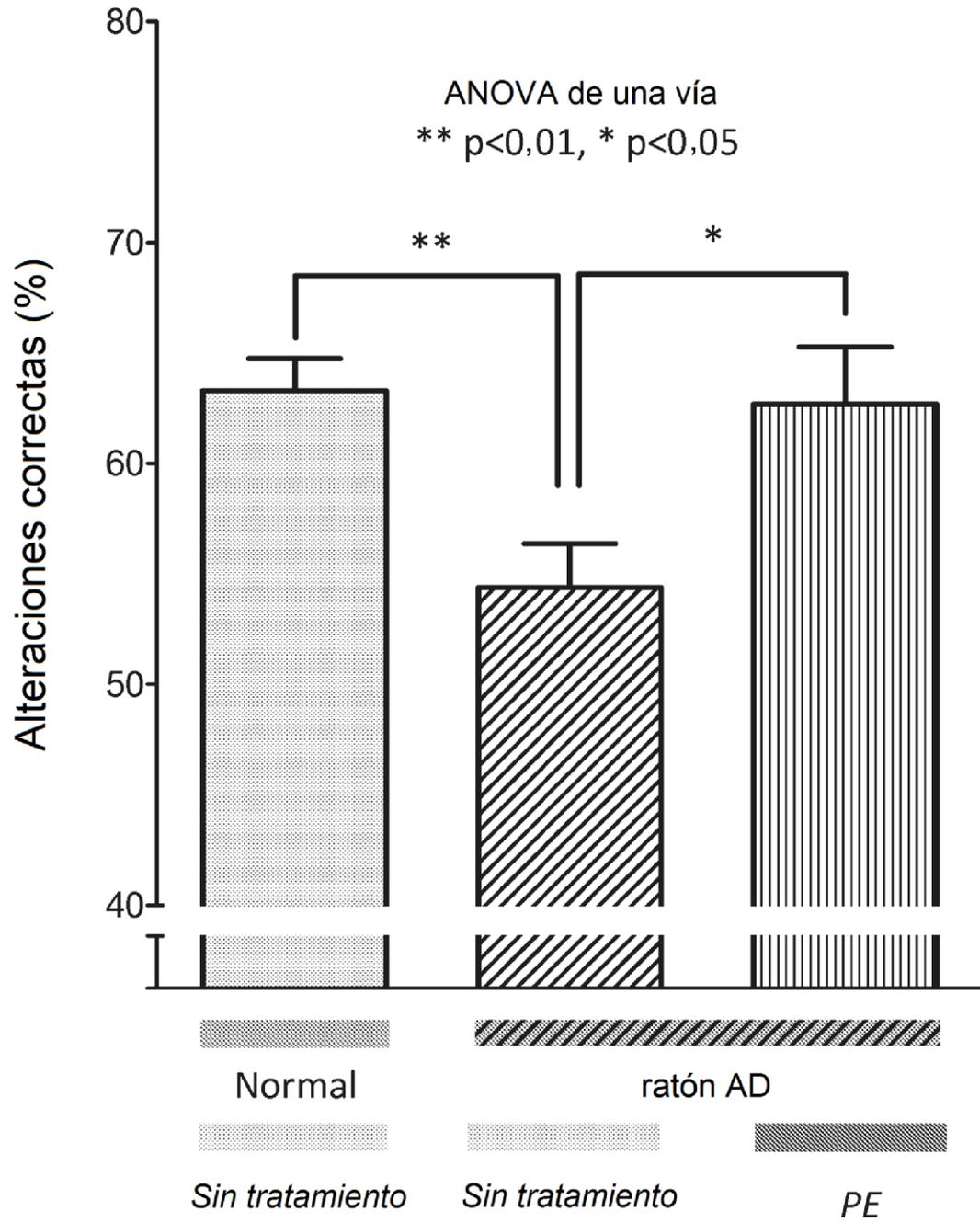


Figura 38

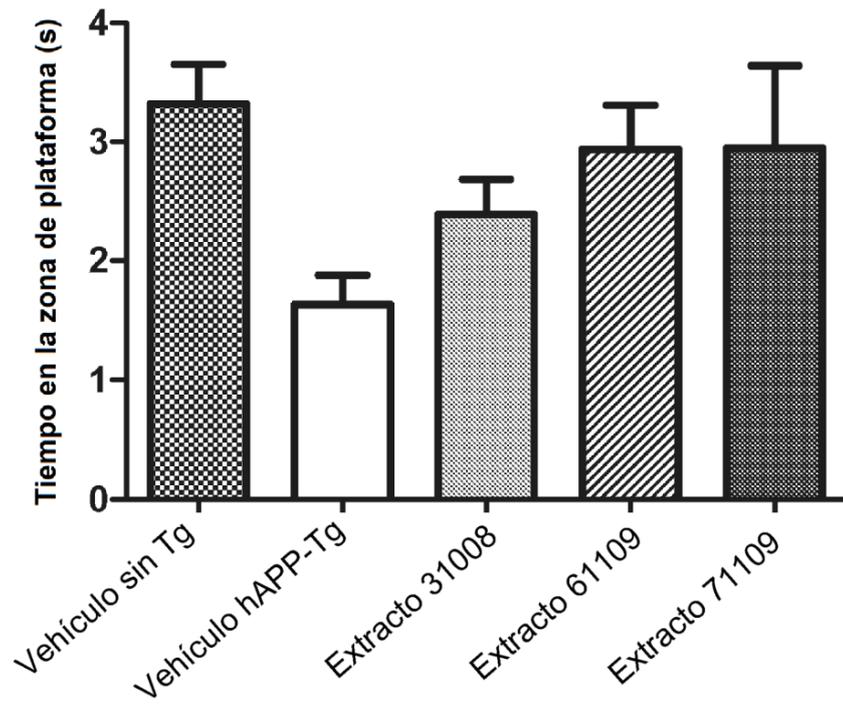


Figura 39

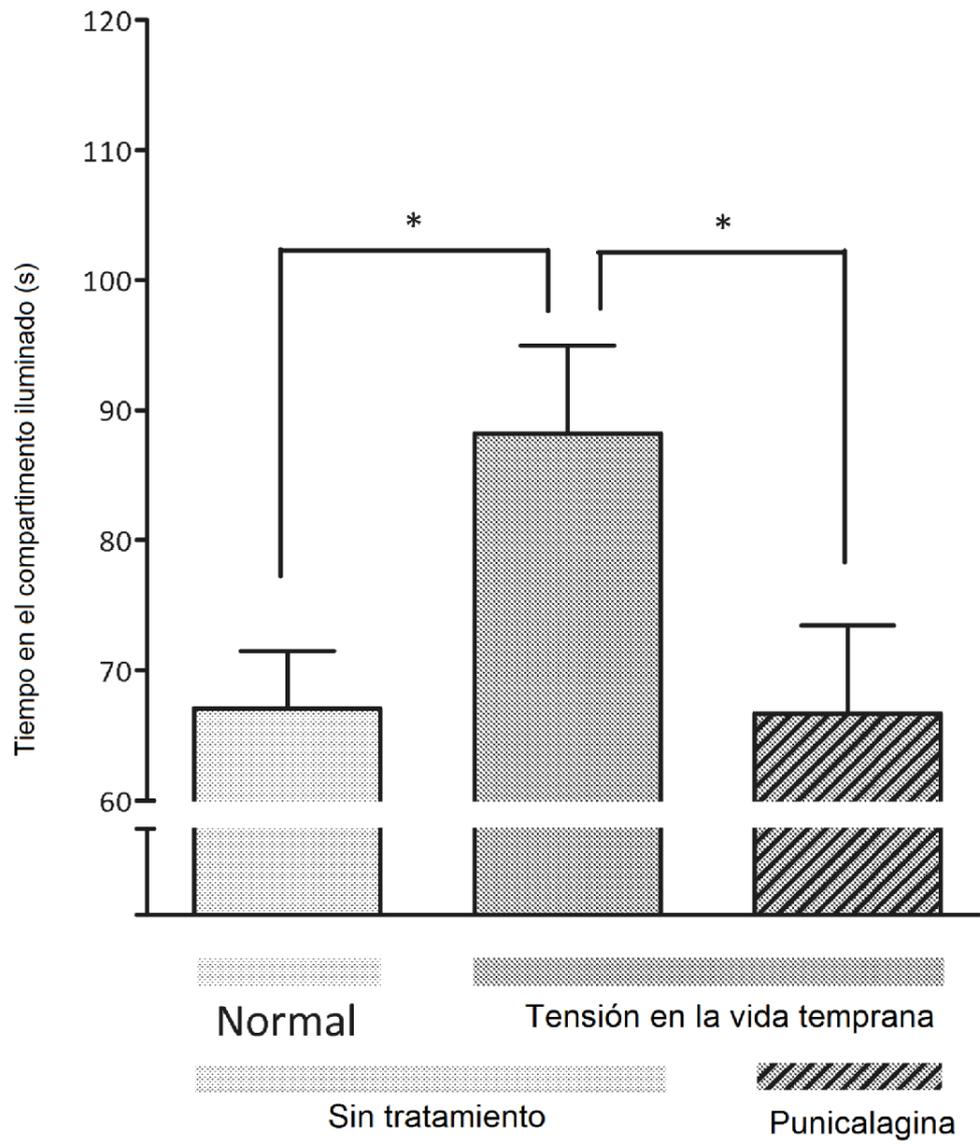


Figura 40

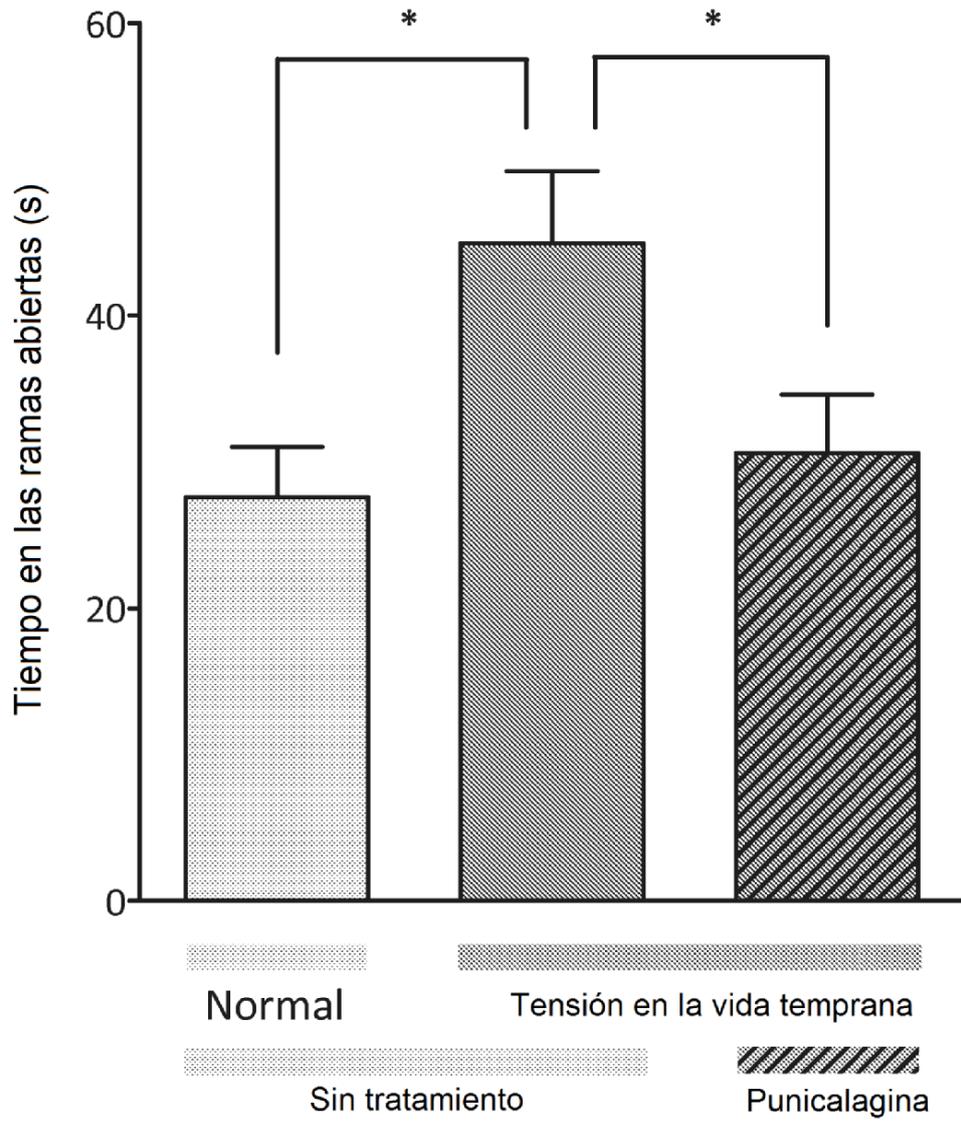


Figura 41

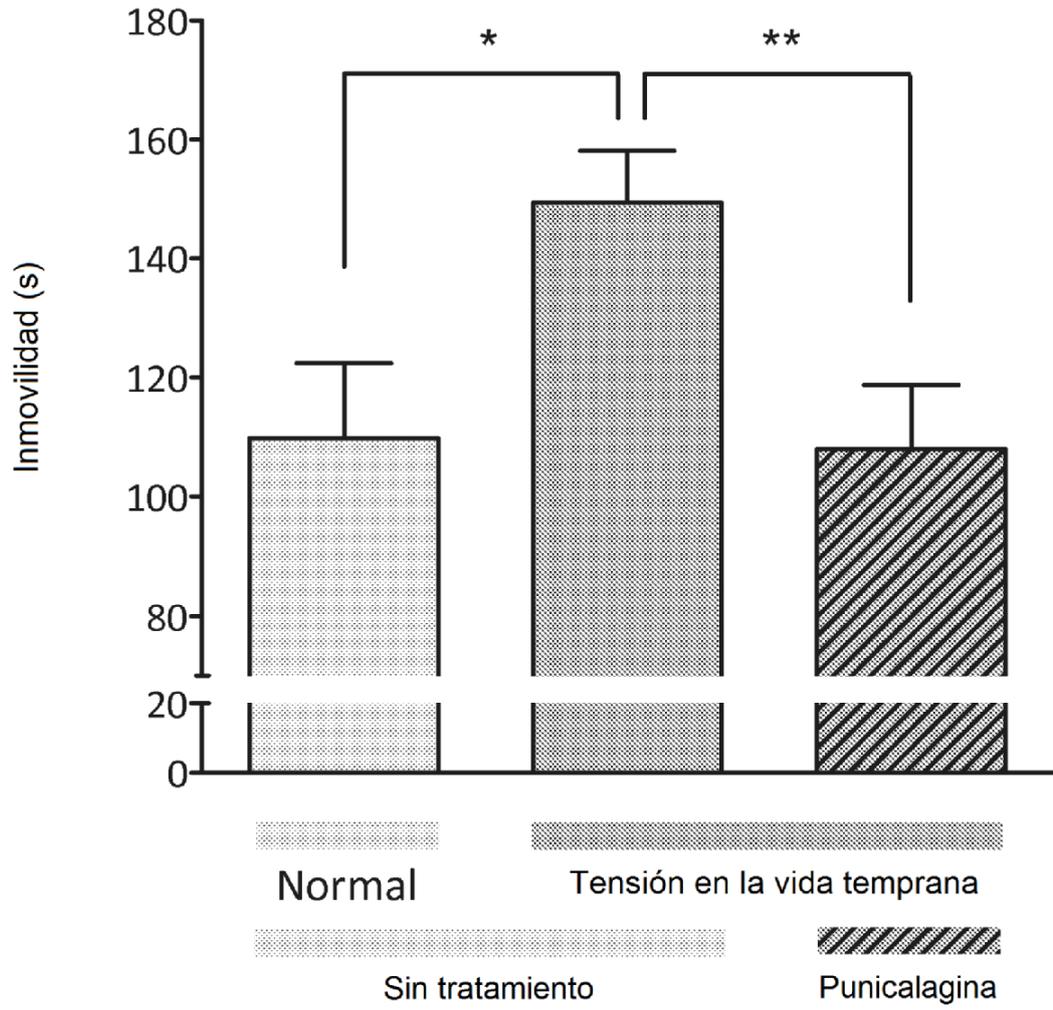


Figura 42

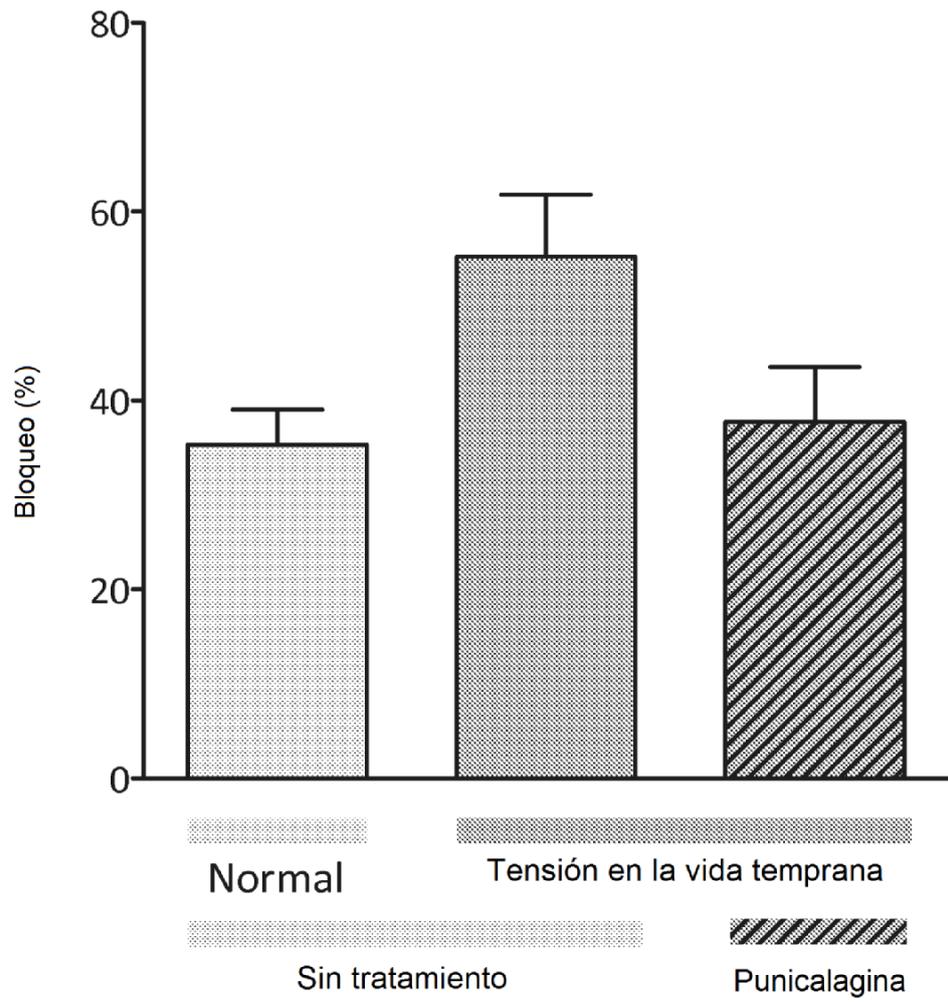


Figura 43

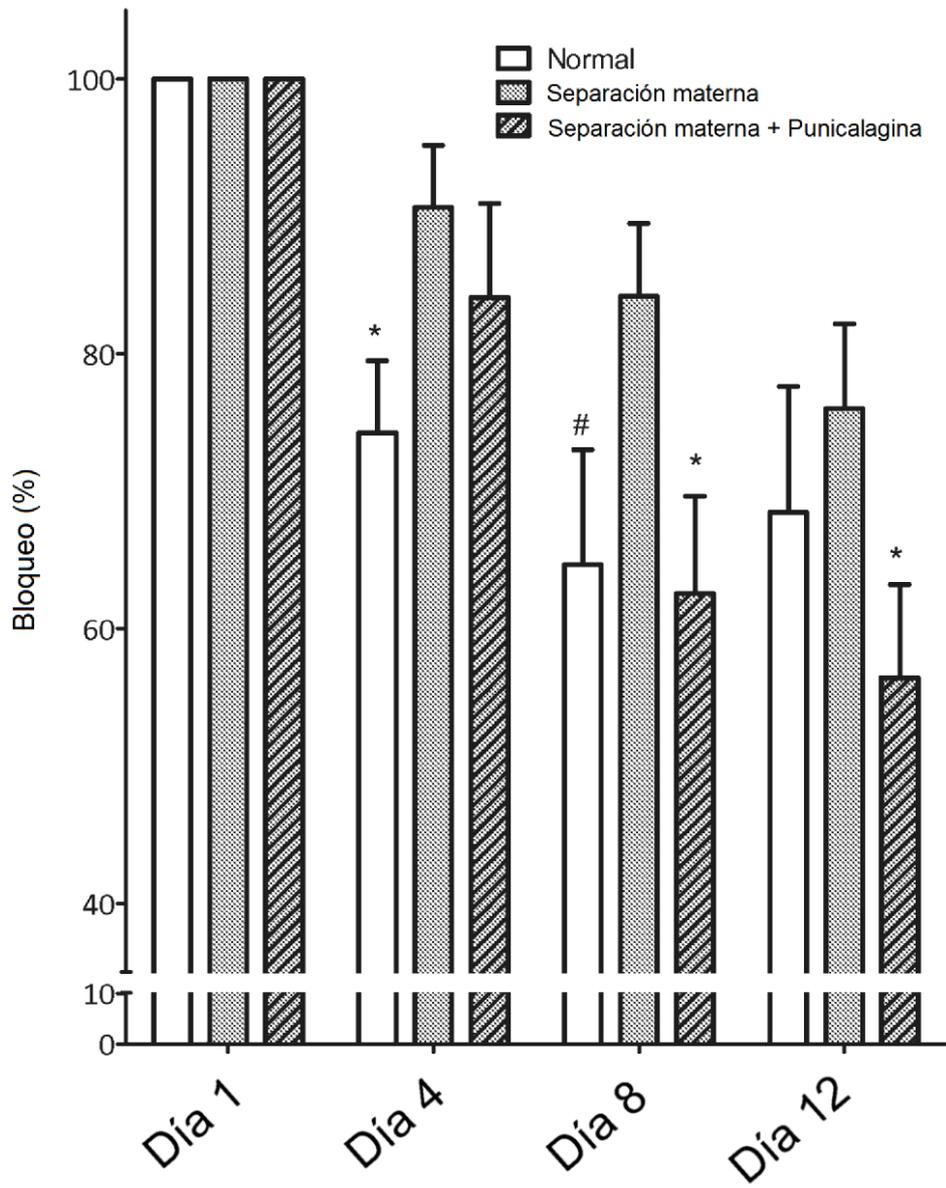


Figura 44

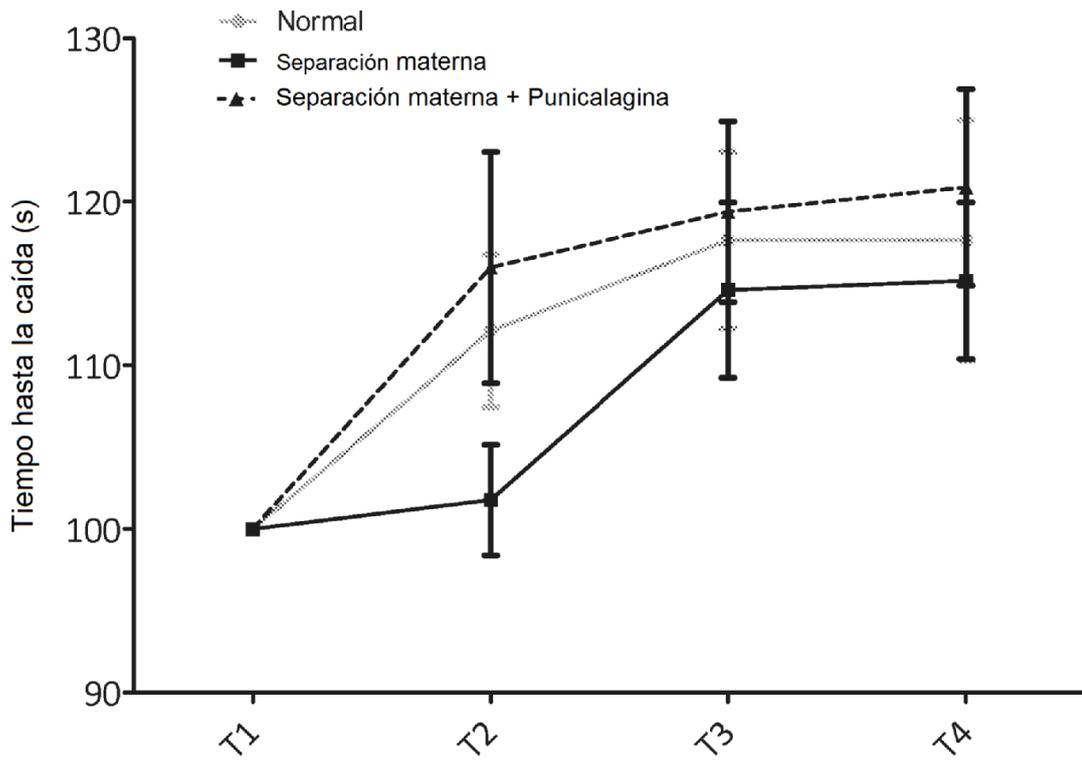


Figure 45

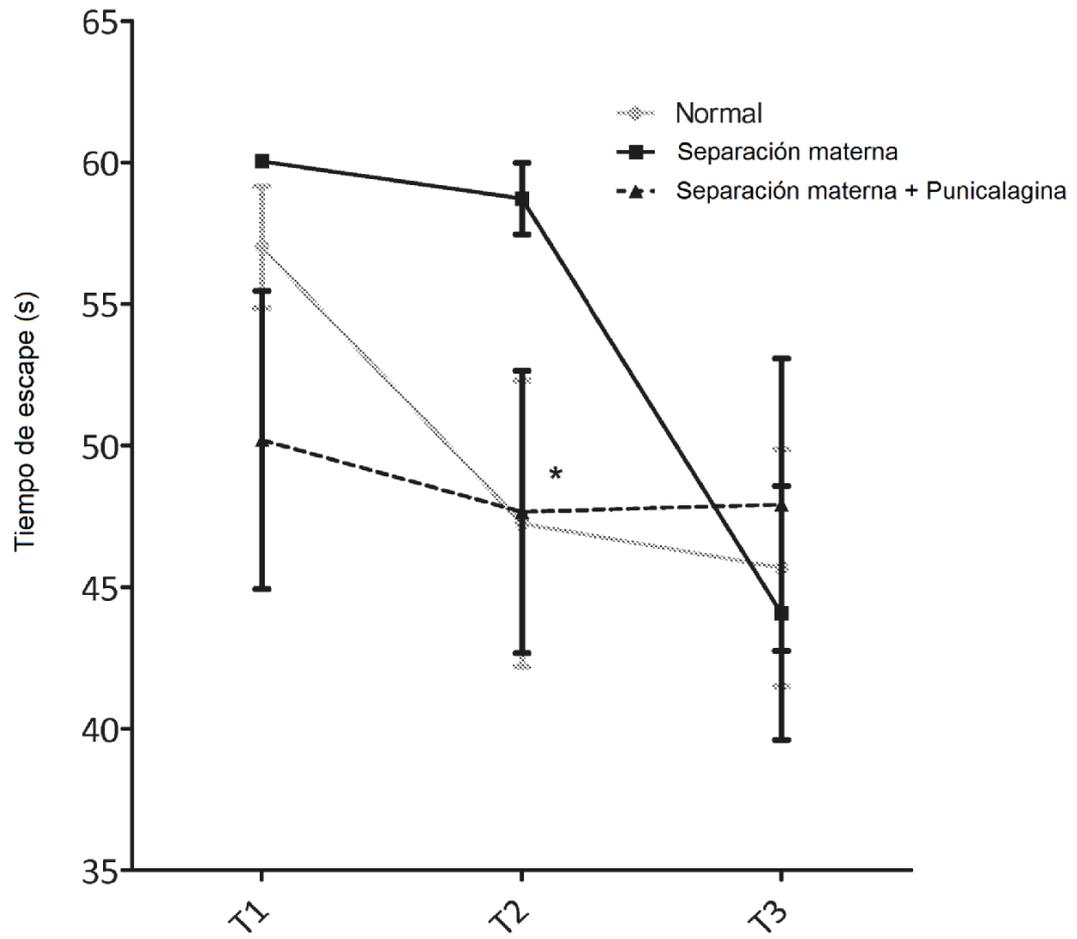


Figura 46

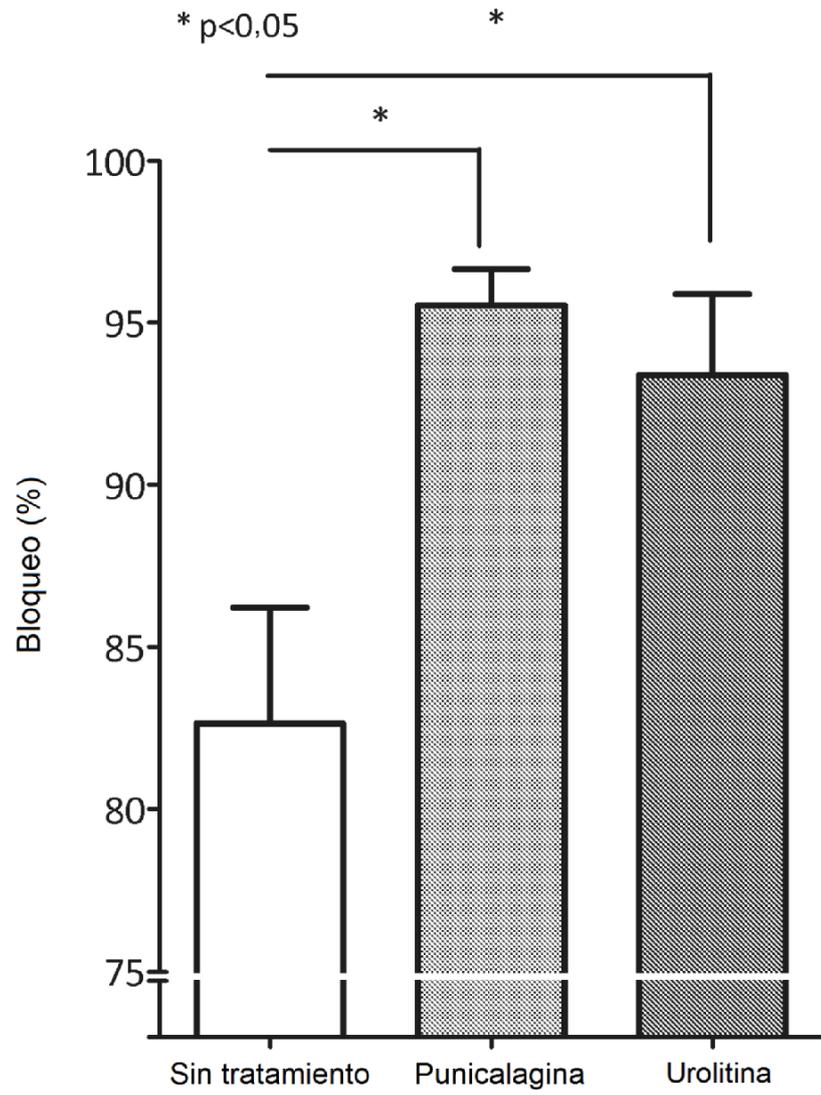


Figura 47

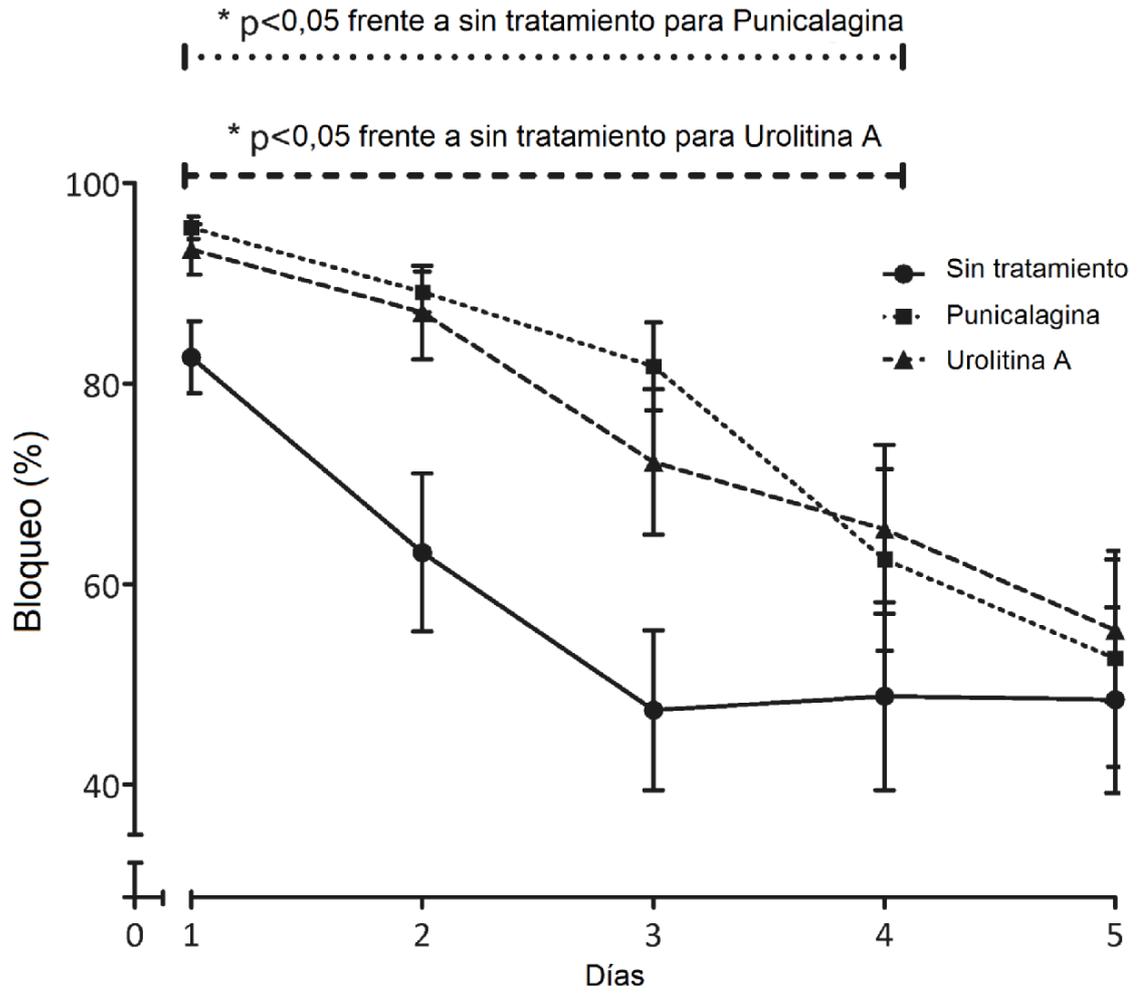


Figura 48

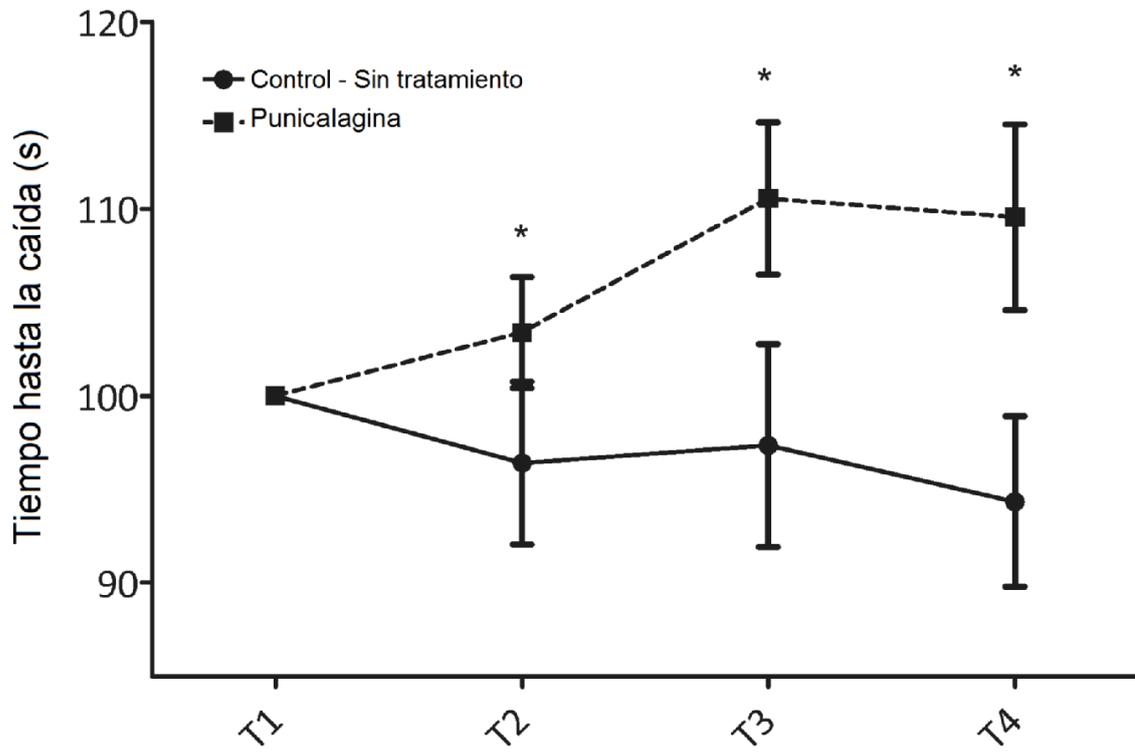


Figura 49

