

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 812**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2011** **E 17186188 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3278800**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la función mitocondrial y tratar condiciones patológicas relacionadas con músculos**

30 Prioridad:

23.12.2010 US 201061426957 P

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

12.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RINSCH, CHRISTOPHER;
SCHNEIDER, BERNARD;
ANDREUX, PÉNÉLOPE;
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 2 734 812 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 mejorar la función mitocondrial y tratar condiciones patológicas relacionadas con músculos

Antecedentes de la invención

Las elagitaninas son polifenoles monoméricos, oligoméricos y poliméricos que son abundantes en algunos frutos, bayas y nueces, tales como las granadas, frambuesas, fresas, moras, nueces y almendras. Los frutos y bayas son ampliamente consumidos en forma fresca y como bebidas, tales como zumos, y se ha informado de que fomentan la salud.

En los métodos de procesamiento de zumos de fruta comerciales, las elagitaninas, que son particularmente abundantes en la piel de algunas frutas, se extraen en grandes cantidades en el zumo. Las elagitaninas pertenecen a la clase química de los taninos hidrolizables, que liberan ácido elágico con la hidrólisis. Estudios *in vitro* han sugerido que las elagitaninas, a concentraciones en el intervalo de 10 a 100 micromolar (μM), presentan potenciales efectos antioxidantes, antiaterogénicos, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiangiogénicos. Los frutos pueden presentar diferentes elagitaninas que son predominantes en, por ejemplo, zumo de fruta preparado a partir de granada; la elagitanina predominante es la punicalagina [2,3-hexahidroxidifenol-4,6-galagilglucosa], que se encuentra en forma de una mezcla de isómeros. Las potentes propiedades antioxidantes informadas del zumo de granada se han atribuido al elevado contenido de isómeros de punicalagina, que puede alcanzar niveles >2 g/l de zumo. Las elagitaninas también se han identificado como los compuestos antiaterogénicos activos en el zumo de granada. Se ha sugerido además que las elagitaninas de granada y los extractos del fruto de la granada inhiben la proliferación de las células de cáncer humanas y modularn las rutas de señalización subcelular inflamatoria y la apoptosis. Ver, por ejemplo, Seeram et al. J. Nutr. Biochem. 16:360-7, 2005; Adams et al., J. Agric. Food Chem. 54:980-85, 2006; Afaq et al., Photochem. Photobiol. 81:38-45, 2005; Afaq et al., Int. J. Cancer. 113:423-33, 2009. También se ha informado de que el extracto del fruto de la granada reduce el crecimiento del tumor prostático y los niveles de antígeno sérico prostático (PSA, por sus siglas en inglés) en ratones desnudos atímicos con implantación de células prostáticas CWR22Rv1. Malik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102:14813-8, 2009.

Desafortunadamente, en su mayor parte las elagitaninas son poco absorbidas en el tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, varios metabolitos derivados de las elagitaninas son absorbidos por el intestino humano, incluyendo determinados metabolitos que finalmente forman en el intestino microorganismos comensales (es decir, microflora intestinal).

Las elagitaninas liberan ácido elágico bajo condiciones fisiológicas *in vivo* y a continuación el ácido elágico resulta gradualmente metabolizado por la microflora intestinal en el intestino, produciendo urolitina D, urolitina C, urolitina A (UA) y urolitina B (UB). Una vez son absorbidos los metabolitos, experimentan glucuronidación y una vez en el hígado, resultan metabolizados adicionalmente para producir glucuronidos, y/o sulfatos, proporcionando una combinación de metabolitos secretados en la bilis.

Las urolitinas son metabolitos del ácido elágico, punicalagina (PA), punicalina (PB), telimagrandina (TL) y otras elagitaninas (Cerdá, Espin et al., 2004; Cerdá, Periago et al., 2005). El ácido elágico (EA) es abundante en el zumo de granada (Gil, Tomás-Barberán et al., 2000). La elagitanina telimagrandina (TL) ha sido aislada y caracterizada anteriormente a partir 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 y TL en la fig. 1.

Se han realizado esfuerzos considerables para entender el mecanismo de trastornos metabólicos, neurodegeneración y deterioro cognitivo, para diseñar mejor modalidades de tratamiento, incluyendo las basadas en productos naturales. Una de las observaciones clave ha sido que el papel de la producción decreciente de energía mitocondrial, correspondiente a un mayor estrés oxidativo y apoptosis, desempeña un papel significativo en enfermedades degenerativas y en el proceso del envejecimiento. Actualmente se ha demostrado que una diversidad de enfermedades degenerativas está causada por mutaciones en genes mitocondriales codificados por el ADN mitocondrial (ADNm) o el ADN nuclear (ADNn). Resulta significativo que las mutaciones somáticas del ADNmt se acumulan con la edad en tejidos postmitóticos asociados al declive asociado a la edad de la función mitocondrial y se cree que son un factor importante en el envejecimiento y la senescencia. Las enfermedades hereditarias pueden resultar de la sustitución de bases en el ADNmt y de mutaciones por reorganización, y pueden afectar al SNC, corazón y músculo esquelético, y a los sistemas renal, endocrino y hematológico.

Las mitocondrias generan la mayor parte de la energía celular mediante fosforilación oxidativa (OXPHOS) y producen la mayor parte de las especies de oxígeno reactivas (ROS) como producto secundario. Los defectos genéticos que inhiben la OXPHOS también provocan el redireccionamiento de los electrones de OXPHOS hacia la producción de ROS, incrementando de esta manera el estrés oxidativo. La caída de la producción de energía mitocondrial y el incremento del estrés oxidativo pueden afectar al poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPmt), iniciando la muerte celular programada (apoptosis). La interacción de estos tres factores se cree que desempeña un papel

importante en la fisiopatología de las enfermedades degenerativas y del proceso de envejecimiento, que afecta a todos los tejidos corporales.

En el cerebro normal, la función cognitiva óptima se base principalmente en la actividad y comunicación entre neuronas, células altamente complejas capaces de transmitir señales eléctricas e inducir neurotransmisión química. La función neuronal depende de largos y complejos procesos celulares que pueden extenderse a lo largo de centímetros o incluso metros, conectando neuronas o células diana, y puede establecer más de 100.000 contactos sinápticos. De esta manera, las neuronas son altamente dependientes del suministro de energía y, por lo tanto, están expuestas a los daños por estrés oxidativo. La función cognitiva depende de un cuidadoso equilibrio de la señalización intracelular que tiene lugar dentro de una compleja red de neuronas. La función cognitiva óptica puede resultar dañada por numerosos factores, tales como el envejecimiento, el estrés celular, el estrés crónico y los trastornos neurodegenerativos. El declive cognitivo puede caracterizarse por una reducción del rendimiento de pensamiento, aprendizaje, memoria, vigilancia y/o deterioro de habilidades psicológicas, así como por depresión y ansiedad.

También se ha demostrado que la función mitocondrial es importante en trastornos metabólicos. La diabetes y la obesidad se han correlacionado con compromisos de la función mitocondrial. Se ha sugerido que la eficiencia de acoplamiento en las mitocondrias, o la proporción de consumo de oxígeno necesaria para producir ATP, se relaciona con los niveles de obesidad, en donde una elevada eficiencia de acoplamiento resulta posiblemente en una deposición más elevada de reservas de grasas (Harper, Green et al., 2008). En la diabetes, estudios recientes han sugerido que la disfunción mitocondrial es una causa de insensibilidad a la insulina en miocitos y adipocitos, como resultado de un suministro de energía insuficiente o defectos en la ruta de señalización de la insulina (Wang, Wang et al., 2010).

Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a una urolitina para la utilización en el tratamiento o prevención de una enfermedad muscular, condición patológica relacionada con los músculos, una miopatía, una distrofia muscular, un trastorno musculoesquelético o una enfermedad neuromuscular y a un método no terapéutico de potenciación o mantenimiento del rendimiento muscular, reducción de la fatiga muscular y/o incremento o mantenimiento de la masa muscular, potenciación del rendimiento deportivo, potenciación de la capacidad de trabajo, inhibición o retraso de la fatiga física o mejora de la función muscular, en un sujeto sano, que comprende administrar una cantidad eficaz de una urolitina o una composición que comprende una urolitina, en el sujeto.

Se da a conocer además un extracto vegetal, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos o metabolitos aislables a partir de los mismos o sintetizados para la utilización en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad iniciado o caracterizado (i) por una actividad mitocondrial inadecuada, (ii) por trastornos metabólicos, tales como diabetes y obesidad, (iii) por un declive de la función cognitiva, o (iv) por alteraciones del humor.

Se da a conocer además un extracto de fruto, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos aislables a partir de la misma, para la utilización como un inductor de la función mitocondrial.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "fracción" se refiere a extractos purificados o parcialmente purificados.

Se da a conocer además un extracto de fruto, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos aislables a partir de la misma, para la utilización en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad iniciado o caracterizado por una función mitocondrial reducida.

En otro aspecto, la invención proporciona la utilización de una o más urolitinas para la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la mejora de la función muscular.

Se da a conocer además un procedimiento para la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la mejora de la función muscular, en donde el procedimiento se caracteriza por la utilización, como ingrediente esencial del medicamento, de una o más urolitinas.

En un aspecto todavía adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una urolitina y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una o más urolitinas para la utilización en el tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto que se beneficiaría de una actividad mitocondrial incrementada, para mejorar: (i) el rendimiento muscular y (ii) para incrementar los niveles tisulares de ATP.

Se dan a conocer además extractos, composiciones y compuestos que son neuroprotectores, neurotróficos y/o que estimulan el crecimiento de las neuritas y, en consecuencia, mejoran la función cognitiva, así como a métodos de utilización de dichos compuestos y composiciones.

Se dan a conocer además compuestos y composiciones que mejoran, protegen y mantienen la función cerebral y la

cognición. Otro objetivo de la presente invención es mejorar, proteger y controlar trastornos del humor. Otro objetivo de la presente invención es proteger frente a trastornos o síntomas inducidos por estrés o asociados a estrés.

Se da a conocer un objetivo de la presente invención, que es proporcionar compuestos neuroprotectores para proteger al cerebro frente a insultos, así como para mejorar el rendimiento cognitivo y la memoria en los adultos normales. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos que estimulan la plasticidad neuronal. Es bien conocido que la plasticidad neuronal es un procedimiento clave necesario para las funciones de la memoria y cognitivas. Dichos compuestos pueden influir sobre el crecimiento de las neuritas, el número de ramas por célula, los procesos medios por célula e incluso el número de sinapsis formado.

Se dan a conocer además compuestos polifenoles y derivados de los mismos, relacionados con elagitaninas, como compuestos naturales bioactivos presentes en las granadas y otros frutos, así como extractos naturales bioactivos que contienen dichos compuestos. Entre estos compuestos se incluyen elagitaninas, punicalagina y ácido elágico, la totalidad de los cuales se encuentra en la granada, aunque también puede aislarse a partir de otros frutos y bayas, así como metabolitos de estos compuestos. Tal como se da a conocer en la presente memoria, dichos compuestos se ha demostrado que presentan efectos beneficiosos sobre: (i) la función mitocondrial, (ii) el metabolismo celular y (iii) la plasticidad neuronal.

Utilizando el modelado *in vitro* del crecimiento de neuritas y la formación de procesos en el cultivo de células neuronales y células primarias, se examinaron diversos compuestos para sus efectos beneficiosos. Tal como se ha indicado anteriormente, el envejecimiento, la neurodegeneración y el estrés crónica presentan impactos negativos sobre el crecimiento de las neuritas. Notablemente, se ha encontrado que los compuestos de la presente invención presentan propiedades neuroprotectoras, muestran una fuerte actividad estimuladora en las células PC-12 y en neuronas mesencefálicas primarias, y mejoran la función cognitiva y la memoria en modelos animales.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición, tal como un fármaco, un alimento médico, un alimento funcional, un aditivo alimentario, o un complemento dietético o una mezcla de los mismos de la invención. La composición puede contener también 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 una etiqueta y/o instrucciones de utilización para mejorar el rendimiento de memoria y cognitivo y/o para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a daños en el cerebro típicos de condiciones observadas durante el envejecimiento del adulto.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de extracto de granada: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una elagitanina: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de punicalagina: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de ácido elágico: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una urolitina: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso.

Un aspecto de la invención es un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una urolitina para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es la obesidad.
- 5 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es una tasa metabólica reducida.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es el síndrome metabólico.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es la diabetes mellitus.
- 10 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es enfermedad cardiovascular.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es la hiperlipemia.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es enfermedad neurodegenerativa.
- 15 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es trastorno cognitivo.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es trastorno del humor.
- 20 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es estrés.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es trastorno de ansiedad.
- 25 En cada uno de los anteriores, en una realización el producto alimentario o complemento nutricional está destinado al control del peso.
- En cada uno de los anteriores, en una realización el producto alimentario o complemento nutricional está destinado a incrementar el rendimiento muscular.
- 30 En cada uno de los anteriores, en una realización el producto alimentario o complemento nutricional está destinado a incrementar el rendimiento mental.
- Se da a conocer además un método para incrementar o mantener la función mitocondrial. El método incluye la etapa de poner en contacto células con una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de incrementar la función de las mitocondrias.
- 35 Se da a conocer además un método para tratar, prevenir o controlar una enfermedad o condición relacionada con las mitocondrias asociada a una función mitocondrial alterada o a una densidad mitocondrial reducida. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad o condición asociada a una función mitocondrial alterada o una densidad mitocondrial reducida.
- 40 Un aspecto de la invención es un método para incrementar la tasa metabólica. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de incrementar la tasa metabólica.
- 45 Se da a conocer además un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de prevenir o tratar el síndrome metabólico.
- 50 Se da a conocer además un método para prevenir o tratar la obesidad. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de prevenir o tratar la obesidad.
- 55 Se da a conocer además un método para prevenir o tratar las enfermedades cardiovasculares. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de prevenir o tratar las enfermedades cardiovasculares.
- 60 Se da a conocer además un método de tratamiento de la hiperlipemia. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de tratar la hiperlipemia. En una realización, la hiperlipemia es hipertrigliceridemia. En una realización, la hiperlipemia es nivel elevado de ácidos grasos libres.
- 65 Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno metabólico. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la

misma, para tratar el trastorno metabólico. En una realización, el trastorno metabólico es la diabetes mellitus. En una realización, el trastorno metabólico es la obesidad.

Se da a conocer además un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad neurodegenerativa. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en complejo de demencia del 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 fatal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, 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 del erizo tambaleante. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

Se da a conocer además un método para mejorar la función cognitiva. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para mejorar la función cognitiva. En una realización, la función cognitiva se selecciona del grupo que consiste en percepción, memoria, atención, comprensión del habla, generación de habla, comprensión lectora, creación de imágenes, aprendizaje y razonamiento. En una realización, la función cognitiva se selecciona del grupo que consiste en percepción, memoria, atención y razonamiento. En una realización, la función cognitiva es la memoria.

Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno cognitivo. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno cognitivo. En una realización, el trastorno cognitivo se selecciona del grupo que consiste en delirio, demencia, trastorno del aprendizaje, trastorno por déficit de atención (TDA) y trastorno de hiperactividad con déficit de atención (TDAH). En una realización, el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje. En una realización, el trastorno cognitivo es el trastorno por déficit de atención (TDA). En una realización, el trastorno cognitivo es el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (TDAH).

Se da a conocer además un método para tratar el déficit cognitivo inducido por estrés o relacionado con el estrés. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el déficit inducido por estrés o relacionado con estrés.

Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno del humor. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del humor. En una realización, el trastorno del humor se selecciona del grupo que consiste en depresión, depresión postparto, distimia y trastorno bipolar. En una realización, el trastorno del humor es la depresión. En una realización, el trastorno del humor es la distimia.

Se da a conocer además un método de tratamiento de trastorno del humor inducido por estrés o relacionado con estrés, p.ej., la distimia. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del humor inducido por estrés o relacionado con estrés.

Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno de ansiedad. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno de ansiedad. En una realización, el trastorno de ansiedad se selecciona del grupo que consiste en trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo y trastorno de estrés post-traumático. En una realización, el trastorno de ansiedad es el trastorno de ansiedad generalizada. En una realización, el trastorno de ansiedad es el trastorno de estrés post-traumático.

Se da a conocer además un método para tratar la ansiedad inducida por estrés o relacionada con el estrés. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la ansiedad inducida por estrés o relacionada con estrés.

Un aspecto de la invención es un método para potenciar el rendimiento muscular. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar el rendimiento muscular. En una realización, el rendimiento muscular se selecciona del grupo que consiste en fuerza, velocidad y resistencia.

- Un aspecto de la invención es un método de tratamiento de una enfermedad muscular o neuromuscular. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad muscular o neuromuscular. En una realización, la enfermedad muscular o neuromuscular es una miopatía. En una realización, la enfermedad muscular o neuromuscular es una distrofia muscular. En una realización, la enfermedad muscular o neuromuscular es una distrofia muscular de Duchenne.
- Se da a conocer además un método de estimulación del crecimiento de las neuritas. El método incluye la etapa de poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para estimular el crecimiento de las neuritas. En una realización, la puesta en contacto comprende administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de la urolitina o precursor de la misma, para estimular el crecimiento de las neuritas.
- Las realizaciones siguientes pueden referirse a cada aspecto y realización del a invención descrita y, según resulte apropiado, pueden referirse una a otra.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma es una urolitina aislada.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma es un precursor de urolitina aislado.
- En una realización, la urolitina se selecciona del grupo que consiste en urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D, así como sus metabolitos, incluyendo, a título de ejemplo, sus formas glucuronidadas, metiladas y sulfatadas, y combinaciones de dichas urolitinas.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra como un alimento natural seleccionado del grupo que consiste en bayas, uvas, granadas, escaramujos y nueces.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra como producto alimentario, incluyendo a título de ejemplo, un zumo, concentrado, o extracto, basado en un alimento natural seleccionado del grupo que consiste en bayas, uvas, granadas, escaramujos y nueces.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en forma de zumo, concentrado o extracto de granada.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en forma de una elagitánina.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en forma de punicalagina.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en forma de ácido elágico.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en forma de una urolitina.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra por vía oral.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra por vía parenteral.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra por lo menos semanalmente. En diversas realizaciones, la urolitina o precursor de la misma 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.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra por lo menos diariamente. En diversas realizaciones, la urolitina o precursor de la misma se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 veces al día.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 0,1 a 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal. En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 2 a 120 mg de urolitina por kg de peso corporal. En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 4 a 90 mg de urolitina por kg de peso corporal. En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 8 a 30 mg de urolitina por kg de peso corporal.
- En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 0,001 micromolar (μM). En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 0,01 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 0,1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente

para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 10 μM .

En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 0,001 micromolar (μM). En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 0,01 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 0,1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 10 μM .

En una realización, el sujeto no recibe una urolitina o un precursor de la misma, para tratar otra condición que requiere la administración de una urolitina o un precursor o metabolito de la misma, seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección e inflamación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra fórmulas estructurales para urolitina A (UA), ácido elágico (EA), telimagrandina (TL), punicalagina (PA) y punicalina (PB).

La figura 2 ilustra el ácido elágico (AE) y sus metabolitos, la urolitina D (UD), la urolitina C (UC), la urolitina A (UA) y la urolitina B (UB), las cuales son producidas por la microflora intestinal en los animales, incluyendo el ser humano.

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

La figura 4 es un gráfico de columnas que ilustra la actividad de la 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 una combinación de inmunotransferencias (IT) que ilustran los efectos del ácido elágico (EA) y la urolitina A (UA) a las concentraciones indicadas sobre los niveles de proteína quinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés) y AMPK fosforilado (P-AMPK). P-AMPK: AMPK fosforilado. Control: control negativo; RSV: control positivo de resveratrol.

La figura 5B es un gráfico de columnas que ilustra el análisis densitométrico de las bandas en la figura 5A que muestra el nivel relativo de P-AMPK activado tras los tratamientos en comparación con las células tratadas de control.

La figura 6 es un gráfico de columnas que ilustra el número total de células para los cultivos de células PC-12 tras el tratamiento con 0,5 μM de los compuestos indicados. PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 7 es un gráfico de columnas que ilustra el crecimiento medio de las neuritas (μm) en células PC-12 tras el tratamiento con 0,5 μM de los compuestos indicados. El crecimiento se expresa por célula. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 8 es un gráfico de columnas que ilustra el porcentaje de células PC-12 que muestra un crecimiento extensivo de neuritas ($>20 \mu\text{m}$) tras el tratamiento con 0,5 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 9 es un gráfico de columnas que ilustra la formación media de procesos en células PC-12 tras el tratamiento con 0,5 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 10 es un gráfico de columnas que ilustra el crecimiento medio por célula de las neuronas positivas para tirosina hidroxilasa (TH) dopaminérgica primaria tras el tratamiento con 0,1 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 11 es un gráfico de columnas que ilustra el porcentaje de neuronas positivas para TH dopaminérgicas primarias que muestran un crecimiento extensivo de neuritas ($>20 \mu\text{m}$) tras el tratamiento con 0,1 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 12 es un gráfico de columnas que ilustra el número medio de procesos formados en neuronas positivas para TH dopaminérgicas primarias tras el tratamiento con 0,1 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 13 es un gráfico de columnas que ilustra la longitud máxima de proceso en neuronas positivas para TH dopaminérgicas primarias tras el tratamiento con 0,1 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 14 es un gráfico de columnas que ilustra el número medio de ramas por cada neurona positiva para TH dopaminérgica primaria tras el tratamiento con 0,1 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 15 es un gráfico de columnas que ilustra el número medio de dendritas por cada neurona positiva para TH dopaminérgica primaria tras el tratamiento con 0,1 μM de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutilil AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 16 es un gráfico de columnas que ilustra el número medio de dendritas por cada neurona positiva para TH dopaminérgica primaria tras el tratamiento con 0,1 μ M de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril AMP cíclico; UA, urolitina A; AE, ácido elágico; TI, telimagrandina.

La figura 17 son tres series de gráficos de columnas que ilustran los efectos del tratamiento con urolitina A, con punicalagina y con extracto de granada (PE) al inicio de la obesidad en ratones alimentados con una dieta rica en grasas (DRG). Se administró urolitina A como aditivo alimentario; se administró EG y punicalagina mediante sonda gástrica. (A) Seguimiento del peso corporal expresado como incremento en porcentaje respecto al peso corporal inicial. (B) Porcentaje de masa adiposa medido mediante EchoMRI tras 5 semanas de tratamiento. (C) Porcentaje de masa magra medido mediante EchoMRI tras 5 semanas de tratamiento. Composición del grupo: DRG de control (aditivo alimentario): n=10; DRG de control (sonda gástrica): n=10; DRG + urolitina A (aditivo alimentario): n=9; DRG + punicalagina (sonda gástrica): n=8; DRG + EG(sonda gástrica): n=7. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student). Para el panel A, se analizaron los resultados mediante ANOVA bidireccional. Se indican los valores de p.

La figura 18 son dos pares de gráficos de columnas que ilustran los efectos del ácido elágico y de la urolitina A sobre la masa magra y la masa adiposa en ratones alimentados con dieta estándar. (A) Porcentaje de masa magra (músculo) medido mediante EchoMRI tras 2 semanas de tratamiento. (B) Porcentaje de masa adiposa (músculo) medido mediante EchoMRI tras 2 semanas de tratamiento. Composición del grupo: Dieta de control (aditivo alimentario): n=8; Dieta estándar + ácido elágico (aditivo alimentario): n=7; Dieta estándar + urolitina A (aditivo alimentario): n=7. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 19 es un par de gráficos y una pareja correspondiente de gráficos de columnas que ilustran los efectos del ácido elágico y de la urolitina A sobre el consumo de oxígeno en ratones alimentados con dieta estándar. (A) Seguimiento del consumo de oxígeno durante un periodo de 20 h. Las columnas negras corresponden a la etapa de oscuridad (19:00 a 07:00). El resto corresponde a la etapa de luz. (B) Consumo de oxígeno representado como la superficie bajo la curva (AUC). Composición del grupo: Dieta de control (aditivo alimentario): n=8; Dieta estándar + ácido elágico (aditivo alimentario): n=7; Dieta estándar + urolitina A (aditivo alimentario): n=7. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student). Para el panel A, se analizaron los resultados mediante ANOVA bidireccional. Se indica el valor de p (dieta de control vs. dieta estándar + tratamiento).

La figura 20 es una serie de gráficos y una serie correspondiente de gráficos de columnas que ilustran el efecto de la urolitina A, la punicalagina y el extracto de granada (PE) sobre el consumo de oxígeno en ratones alimentados con una dieta rica en grasas (DRG). (A) Seguimiento del consumo de oxígeno durante un periodo de 20 h. Las columnas negras corresponden a la etapa de oscuridad (19:00 a 07:00). El resto corresponde a la etapa de luz. (B) Consumo de oxígeno representado como la superficie bajo la curva (AUC). Composición del grupo: DRG de control (aditivo alimentario): n=10; DRG de control (sonda gástrica): n=10; DRG + urolitina A (aditivo alimentario): n=9; DRG + punicalagina (sonda gástrica): n=8; DRG + EG (sonda gástrica): n=7. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student). Para el panel A, se analizaron los resultados mediante ANOVA bidireccional.

La figura 21 es un par de gráficos y una pareja correspondiente de gráficos de columnas que ilustran los efectos del ácido elágico y de la urolitina A sobre la proporción de intercambio respiratorio (PIR) en ratones alimentados con dieta estándar. (A) Seguimiento del PIR durante un periodo de 20 h. Las columnas negras corresponden a la etapa de oscuridad (19:00 a 07:00). El resto corresponde a la etapa de luz. (B) RER representado como RER media. Composición del grupo: Dieta de control (aditivo alimentario): n=8; Dieta estándar + ácido elágico (aditivo alimentario): n=7; Dieta estándar + urolitina A (aditivo alimentario): n=7. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student). Para el panel A, se analizaron los resultados mediante ANOVA bidireccional. Se indica el valor de p (dieta de control vs. dieta estándar + tratamiento).

La figura 22 es una serie de gráficos y una serie correspondiente de gráficos de columnas que ilustran el efecto de la urolitina A, la punicalagina y el extracto de granada (PE) sobre la proporción de intercambio respiratorio (PIR) en ratones alimentados con una dieta rica en grasas (DRG). (A) Seguimiento del PIR durante un periodo de 20 h. (B) PIR representado como PIR media. Composición del grupo: DRG de control (aditivo alimentario): n=10; DRG + urolitina A (aditivo alimentario): n=9; DRG + punicalagina (aditivo alimentario): n=10; DRG + EG(aditivo alimentario): n=10. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student). Para el panel A, se analizaron los resultados mediante ANOVA bidireccional.

La figura 23 son dos series de gráficos que ilustran el efecto de la urolitina A, la punicalagina y el extracto de granada (PE) sobre los triglicéridos y los ácidos grasos libres en ratones alimentados con dieta rica en grasas (DRG). (A) Niveles plasmáticos de triglicéridos en ratones alimentados con DRG tratados durante 14 semanas. (B) Niveles plasmáticos de ácidos grasos libres en ratones alimentados con DRG tratados durante 14 semanas. Composición del grupo: DRG de control (aditivo alimentario): n=10; DRG de control (sonda gástrica): n=10; DRG + urolitina A (aditivo alimentario): n=9; DRG + punicalagina (sonda gástrica): n=8; DRG + EG(sonda gástrica): n=7. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 24 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de la urolitina A, el ácido elágico y la punicalagina sobre la glucemia en ratones alimentados con una dieta rica en grasas (DRG). (A) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DRG tratados con aditivo alimentario con urolitina A durante 10 semanas. (B) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DRG tratados con aditivo alimentario con ácido elágico durante 10 semanas. (C) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DRG tratados con aditivo alimentario con punicalagina durante 10 semanas. Composición del grupo: DRG de control (aditivo alimentario): n=10; DRG + urolitina A (aditivo alimentario): n=9; DRG + punicalagina (aditivo alimentario): n=10. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 25 es un gráfico de líneas y un gráfico de columnas que ilustran el efecto de la urolitina A (UA) sobre la respiración basal y no acoplada (consumo de oxígeno) en *C. elegans* viejos (10 días de edad). (A) Respiración basal y no acoplada (FCCP) en gusanos de control de 10 días de edad tratados con DMSO al 0,1% y gusanos de 10 días de edad tratados con urolitina A 30 μ M en DMSO al 0,1%. (B) Superficie bajo la curva (AUC) representativa de respiración no acoplada (FCCP) en gusanos de control de 10 días de edad tratados con vehículo (DMSO al 0,1%) o urolitina A 30 μ M en DMSO al 0,1%. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (prueba t de Student). TCO, tasa de consumo de oxígeno.

La figura 26 es un gráfico de columnas que ilustra el efecto de la urolitina A sobre mitocondrias en músculo de *C. elegans*. *C. elegans* cepa SJ4103 transgénico muestra fluorescencia debido a la expresión específica muscular de proteína fluorescente verde (PFV) que presenta como diana la membrana mitocondrial. La presencia de mitocondrias en el músculo de *C. elegans* se muestra mediante un incremento de la fluorescencia. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. * $p < 0,0014$ (prueba t de Student).

La figura 27 es un gráfico de columnas que ilustra la movilidad de ratones sometidos a estrés crónico con o sin tratamiento con extracto de granada.

La figura 28 es un gráfico de columnas que ilustra el grado de respuesta de "paralización" de ratones en un contexto de inducción de ansiedad con o sin tratamiento con extracto de granada.

La figura 29 es un gráfico de columnas que ilustra el efecto sobre ratones de la administración de extracto de granada sobre el grado de inhibición de la cría inducida por ansiedad.

La figura 30 es un gráfico de columnas que ilustra el efecto de la administración de extracto de granada sobre el grado de inhibición del comportamiento de aseo inducido por ansiedad en ratones.

La figura 31 es un gráfico de líneas que ilustra la extinción del recuerdo de un contexto adverso particular tras la exposición repetida al contexto en ausencia del efecto adverso. Se muestran datos para ratones que han sufrido estrés temprano, ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano pero que han sido tratados con la elagitanina punicalagina. La paralización (%) se expresa como porcentaje del tiempo de paralización durante la exposición inicial al contexto.

La figura 32 es un gráfico que ilustra el efecto en ratones del estrés crónico sobre el aprendizaje efectivo en el laberinto acuático de Morris.

La figura 33 es un gráfico de columnas que ilustra el efecto en ratones estresados crónicamente de la administración de extracto de granada sobre el rendimiento de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris.

La figura 34 es un gráfico que ilustra la distancia acumulada desde una plataforma oculta en varias pruebas durante la etapa de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, una medida del aprendizaje cognitivo. Se muestran datos para ratones que han sufrido estrés temprano, ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano pero que han sido tratados con la elagitanina punicalagina. La distancia a la plataforma es la suma de distancias acumuladas entre el ratón y la plataforma oculta para todos los intervalos medidos (25 intervalos/s) durante el periodo de observación (60 s).

La figura 35 es un gráfico de columnas que ilustra la memoria de ratas envejecidas en un ensayo de reconocimiento social al tratarlas con el extracto de granada 1108 o un control (Ctrl).

La figura 36 es un gráfico de columnas que ilustra resultados en el laberinto acuático de Morris para ratas envejecidas tratadas con extracto de granada 1108 o control (Ctrl).

La figura 37 es un gráfico de columnas que ilustra el porcentaje de alteraciones correctas en un laberinto en Y para el modelo de ratón 5XFAD de enfermedad de Alzheimer, tanto tratadas como no tratadas, así como ratones de control normales. Significancia: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional.

La figura 38 es un gráfico de columnas que ilustra los resultados en el laberinto acuático de Morris para ratones transgénico que modeliza la enfermedad de Alzheimer (PPAh-Tg) tratados con extractos derivados de granada 31008, 61109, 71109 o control (vehículo). También se muestran resultados para ratones de tipo salvaje (no Tg) tratados con control (vehículo).

La figura 39 es un gráfico de columnas que ilustra resultados en caja oscura/iluminada para ratones que han sufrido estrés temprano frente a ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano y han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 40 es un gráfico de columnas que ilustra resultados para el laberinto en O elevado para ratones que han sufrido estrés temprano frente a ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano y han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 41 es un gráfico de columnas que ilustra resultados para el laberinto en O elevado para ratones que han sufrido estrés temprano frente a ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano y han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (prueba t de Student).

La figura 42 es un gráfico de columnas que ilustra los resultados para el entrenamiento en el paradigma de acondicionamiento del miedo contextual durante el primer choque leve que tiene lugar a los 4 min. Se muestran los resultados para ratones que han sufrido de estrés temprano frente a ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano y han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM.

La figura 43 es un gráfico de columnas que ilustra la extinción del recuerdo de un contexto adverso particular tras la exposición repetida al contexto en ausencia del efecto adverso. Se muestran datos para ratones que han sufrido estrés temprano, ratones de control no estresados y criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés

temprano y que han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: * $p < 0,05$, # $p=0,05$ (prueba t de Student). Se compararon animales no estresados normales con animales estresados en los primeros años (es decir, separación materna). Se compararon animales estresados en los primeros años y tratados con punicalagina, con animales estresados en los primeros años y no tratados.

La figura 44 es un gráfico de líneas que muestra el nivel de aprendizaje motor medido como la latencia en segundos hasta la caída de un rodillo giratorio. Se muestran datos para ratones que han sufrido estrés temprano, ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano y que han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM.

La figura 45 es un gráfico que ilustra la latencia de escape en segundos del laberinto acuático de Morris durante la etapa de entrenamiento, una medida del aprendizaje cognitivo. Se muestran datos para ratones que han sufrido estrés temprano, ratones de control criados normalmente, y ratones que han sufrido estrés temprano y que han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 46 es un gráfico de columnas que ilustra los efectos de compuestos derivados de la grana sobre el reconocimiento contextual en ratones normales, no tratados o tratados con punicalagina o urolitina A. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: * $p < 0,05$ (prueba t de Student).

La figura 47 es un gráfico de columnas que ilustra los efectos de compuestos derivados de la granada sobre la retención de la memoria de un contexto particular en ratones normales, no tratados o tratados con punicalagina o urolitina A. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Significancia: Se analizaron los datos utilizando un ANOVA unidireccional o ANOVA de medidas repetidas, seguido de un ensayo de comparaciones múltiples de LSD post-hoc de Fisher. * $p < 0,05$.

La figura 48 es un gráfico de líneas que muestra el rendimiento muscular y habilidades motoras medidos como la latencia de caída en segundos de un rodillo giratorio. Se muestran datos para ratones de control no tratados criados normalmente y ratones que han sido tratados con la elagitanina punicalagina. Significancia: * $p < 0,05$ mediante análisis ANOVA.

La figura 49 es un gráfico de líneas que muestra el nivel de rendimiento y resistencia musculares medidos como la capacidad de un ratón de correr en una cinta rodante a velocidades elevadas. Se muestran datos para ratones de control no tratados criados normalmente y ratones que han sido tratados con urolitina A. Significancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (prueba t de Student).

Descripción detallada de la invención

En biología y psicología, el término “estrés” se refiere a la consecuencia de la no respuesta apropiada de un ser humano u otro animal a amenazas fisiológicas, emocionales o físicas, actuales o imaginadas. El término “estrés” fue utilizado por primera vez en un contexto biológico por el endocrinólogo Hans Selye en los años 1930. Más tarde amplió y popularizó el concepto, incluyendo una respuesta fisiológica inapropiada a cualquier demanda. Cubre un amplio abanico de fenómenos, desde una irritación leve a una disfunción drástica que puede provocar un grave deterioro de la salud.

Todas estas características psicobiológicas del estrés podrían representar manifestaciones del estrés oxidativo, un desequilibrio entre la producción y la manifestación de especies de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de rápidamente destoxificar los intermediarios reactivos o de reparar los daños resultantes. Las perturbaciones del estado redox normal de los tejidos pueden causar 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 incluso pueden actuar como mensajeros mediante un fenómeno denominado “señalización redox”.

En el ser humano, en muchas enfermedades está involucrado el estrés oxidativo. Entre los ejemplos se incluyen aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome del X frágil y síndrome de la fatiga crónica.

Una fuente de oxígeno reactivo bajo condiciones normales en el ser humano es la fuga de oxígeno activado de las mitocondrias durante la fosforilación oxidativa.

Otros enzimas capaces de producir superóxido (O_2^-) son la xantina oxidasa, las NADPH oxidasas y los citocromos P450. El peróxido de hidrógeno, otro fuerte agente oxidante, se produce mediante una diversidad de enzimas, incluyendo varias oxidasas. Las especies de oxígeno reactivo desempeñan importantes funciones en la señalización celular, un proceso denominado señalización redox. De esta manera, para mantener la homeostasis celular apropiada, debe alcanzarse un equilibrio entre la producción y el consumo del oxígeno reactivo.

Los antioxidantes celulares mejor estudiados son los enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa. Entre los antioxidantes enzimáticos menos bien estudiados se incluyen las peroxirredoxinas y la recientemente encontrada sulfirredoxina. Entre otros enzimas que presentan propiedades antioxidantes (aunque este papel no es primario) se incluyen paraoxonasa, glutatión-S-transferasas y aldehído deshidrogenasas.

El estrés oxidativo contribuye a la lesión de los tejidos tras la irradiación y la hiperoxia. Se sospecha que resulta

importante en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington. También se cree que el estrés oxidativo está asociado a determinadas enfermedades cardiovasculares, ya que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) en el endotelio vascular es un precursor de la formación de placa. El estrés oxidativo también desempeña un papel en la cascada isquémica debido al daño por reperfusión de oxígeno tras hipoxia. Esta cascada incluye tanto ictus como ataques cardíacos. El estrés oxidativo también se ha implicado en el síndrome de fatiga crónica.

Notablemente, los inventores han encontrado que determinados compuestos derivados de las elagitaninas resultan útiles en el tratamiento y prevención de las manifestaciones fisiológicas y psicológicas del estrés, incluyendo el estrés oxidativo. Sin pretender restringirse a ningún mecanismo particular de acción, se cree que los compuestos ejercen efectos beneficiosos sobre las mitocondrias, estimulando y restaurando funciones mitocondriales cruciales y contrarrestando la disfunción mitocondrial inducida por estrés. Se ha encontrado que estos mismos compuestos, según la presente invención, resultan útiles en el tratamiento y la prevención de cualquiera de una diversidad de condiciones, enfermedades y trastornos relacionados con la disfunción mitocondrial, incluyendo, aunque sin limitación, enfermedades neurodegenerativas y trastornos cognitivos, trastornos metabólicos, incluyendo la resistencia a la insulina, los trastornos del humor y los trastornos de ansiedad.

Las elagitaninas (ET) son polifenoles incluidos dentro de los denominados “taninos hidrolizables”, en los que el ácido hexahidroxidifénico forma diésteres con azúcares (más frecuentemente β -D-glucosa). Las ET pueden observarse como polímeros complejos que alcanzan pesos moleculares de hasta 4.000 y superiores. Estos polímeros pueden hidrolizarse con ácidos o bases, rindiendo ácido elágico (EA), que puede utilizarse indirectamente para cuantificar las ET. El EA, a su vez, es una fuente de productos metabólicos adicionales, incluyendo las urolitinas.

Se han utilizado muchas especies vegetales que contienen elagitaninas para el tratamiento de enfermedades, particularmente en Asia (Okuda et al., 2009). Entre ellas se incluyen *Agrimonia pilosa* (agrimoniina), *Camelia japonica* (cameliatanina A), *Cornus officinalis* (cornusina A), *Geranium thunbergii* (geranina), *Geum japonicum* (gemina-A), *Liquidambar formosana* (casuarictina), *Mallotus japonicus* (ácido malotusínico), *Oenothera erythrosepala* (oenoteína B), *Punica granatum* (granada) (granatina B), *Rosa rugosa* (rugosina) y *Terminalia chebula* (ácido quebulínico), entre otros. Los usos principales de dichas plantas medicinales se han asociado a sus actividades antioxidantes, antidiarreicas, antimicrobianas e inmunomoduladoras.

Las elagitaninas también se encuentran presentes en cantidades significativas en muchas bayas, incluyendo fresas, frambuesas rojas y negras (Zafrilla et al., 2001), arándanos y zarzamoras. Las elagitaninas también se han encontrado en manzanas, cerezas, moras amarillas, arándanos americanos, pasas de Corinto, uvas, lima, mango, piña, granada, ciruela y ruibarbo. Serrano et al. Mol. Nutr. Food Res. 53:S310-29, 2009. La elagitanina rubusuavina C puede aislarse a partir de las hojas del té dulce chino *Rubus suavissimus* S. Lee. Las elagitaninas también se han identificado en cantidades apreciables en frutos de cáscara, incluyendo nueces (Fukuda et al., 2003), pistachos, anacardos, castañas, bellotas de roble (Cantos et al., 2003), nuez pecán (Villarreal-Lozoya et al., 2007) y cacahuetes.

También son abundantes en las granadas (Gil et al., 2000) y en las uvas muscadina (Lee y Talcott, 2003) y son constituyentes importantes de la madera, particularmente de roble (Glabasnia y Hofmann, 2006). Las elagitaninas pueden incorporarse en productos alimentarios, tales como vinos y whisky, mediante la migración desde la madera a la matriz alimentaria durante diferentes procedimientos de envejecimiento. El ácido elágico se ha encontrado en varios tipos de miel y se ha propuesto como un marcador floral para la miel de brezo (Ferrerres et al., 1996). El ácido elágico libre y diferentes derivados glucosídicos también se encuentran presentes en dichos productos alimentarios, incluyendo glucósidos, ramnósidos, arabinósidos y los ésteres de acetilo correspondientes (Zafrilla et al., 2001).

Varios estudios han demostrado que el contenido de elagitanina de varios productos alimentarios puede ser bastante elevado (Tabla 1). Por ejemplo, un vaso de zumo de granada (200 ml) puede proporcionar hasta 1 g de elagitaninas y ácido elágico; una ración de frambuesas (100 g de frambuesas), aproximadamente 300 mg; una ración de fresas, 70 mg, y cuatro nueces, unos 400 mg de elagitaninas.

Entre las elagitaninas en la dieta representativas se incluyen la punicalagina de la granada, la sanguina-H-6 de la fresa y la frambuesa, y la pedunculagina de las nueces. Todas ellas liberan ácido elágico con la hidrólisis, aunque también pueden producirse otros metabolitos y son particulares de elagitaninas individuales (p.ej., ácidos galágico y terc-galágico).

Tabla 1. Contenido de elagitaninas (ET) y ácido elágico (EA) en diversos productos alimentarios.

Alimento	Contenido
<i>Fruta fresca</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 amarilla	315 mg/100 g p.f.
Mora amarilla	56-360 mg/100 g p.f.
Zarzamora	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 muscadina	36-91 mg/100 g p.f.
<i>Frutos de cáscara</i>	
Nuez	802 mg/50 g (8 nueces)
Pecán	20,96-86,2 mg/g (EA)
Castaña	1,61-24,9 mg/kg p.f. (EA)

<i>Frutos procesados</i>	
Zumo de granada	1500-1900 mg/l (punicalagina)
Zumo de granada	2020-2660 mg/l (ET y EA)
Zumo de granada	5700 mg/l (ET y EA)
Confitura de frambuesa	76 mg/100 g p.f.
Confitura de fresa	24 mg/100 g p.f.
Zumo de uva muscadina	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 muscadina	2-65 mg/l

<i>Bebidas espirituosas</i>	
Whisky	1-2 mg/l
Cognac	31-55 mg/l
p.f., peso fresco	
p.s., peso seco	

- 5 Las elagitaninas presentan una enorme variabilidad estructural, formando derivados diméricos y oligoméricos. También presentan una distribución más amplia que los galotaninos. En la Tabla 2 se muestran elagitaninas adicionales y fuentes informadas de las mismas.

Tabla 2. Otras elagitaninas.

	Peso molecular	Proveedor	Referencia
		Duramen de roble europeo	(Puech, Mertz et al. 1999)
2-O-galoil-punicalina			
Casaurictina		Árbol Rhu, planta <i>Stachyrys</i>	Wikipedia
Castalagina y Vecalagina	934,63	Corteza de granada	(Tanaka, Nonaka et al. 1986)
Castalina			
Casuarictina		<i>T. japonica</i>	
Casuarina		Hojas de árbol Banaba	(Bai, He et al. 2008)
Casuarinina		Hojas de árbol Banaba	(Bai, He et al. 2008)
Casuarinina		Granada	
Ácido quebulágico		<i>T. chebula</i>	
Ácido quebulínico		<i>T. chebula</i>	
Corilagina		Granada	
Cornusina E			
Epipunicacorteína A		Hojas de árbol Banaba	(Bai, He et al. 2008)
Flosina B		Hojas de árbol Banaba	(Bai, He et al. 2008)
Gemina D		<i>T. japonica</i>	
Granatina A		Granada	
Granatina B		Granada	
Grandinina			
Lagerstroemina		Hojas de árbol Banaba	(Bai, He et al. 2008)

Lambertianina C		Frambuesas	(Gasperotti, Masuero et al.)
Pedunculagina	784,52	Corteza y pericarpio de granada	(Tanaka, Nonaka et al. 1986)
Punicacorteína A		Granada	
Punicacorteína B		Granada	
Punicacorteína C		Granada	
Punicacorteína D		Granada	
Punicafolina		Granada	
Punicalagina		Granada	
Punicalina		Granada	
Punigluconina		Granada	
Roburina A			
Roburina B			
Roburina C			
Roburina D			
Roburina E			
Rubusuavina C		Hojas de té	
Sanguina H-4		Uvas muscadina	(Lee, Johnson et al. 2005)
Sanguina H-5		Uvas muscadina	(Lee, Johnson et al. 2005)
Sanguina H-6		Frambuesas, Sanguisorba	(Vrhovsek, Palchetti et al. 2006)
Sanguina H-10			
Estaquiurina		Hojas de árbol Banaba	(Bai, He et al. 2008)
Estrictinina			
Telimagrandina I		Granada	
Telimigrandina II		Granada	
Terquebulina			
Terflavina A			
Terflavina B			
Tergalagina		<i>T. catappa</i>	
Terminalina/Galagildilacton		Granada	

Pueden aislarse muchas elagitaninas potencialmente activas a partir de diversas especies de plantas *Terminalia*. En particular, se ha identificado tanto punicalagina como punicalina en varias especies de *Terminalia*, incluyendo, p.ej., *T. catappa*, *T. chebula* Retz, *T. myriocarpa*, y *T. citrine*. La punicalagina también ha sido aislada de *Cistus salvifolius* (un arbusto mediterráneo) y de *Combretum molle* (un arbusto africano).

El ácido elágico normalmente se encuentra en cantidades relativamente bajas en los tejidos vegetales. Se cree que el ácido elágico se deriva de elagitaninas, que, al degradarse, forman ácido hexahidroxidifénico, que espontáneamente se convierte en ácido elágico. Se muestran algunas fuentes adicionales de ácido elágico en la Tabla 3.

Tabla 3. Fuentes de ácido elágico

Fruto	Cantidad	Referencia
Acai	55,4 ± 1,39 mg/l de pulpa fresca	(Del Pozo-Insfran, Brenes et al. 2004)
Umbu	314 mg/100 g peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo et al.)
Camu-camu	490 mg/100 g peso seco	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo et al.)
Cagaita	289 mg/100 g peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo et al.)
Araçá	262 mg/100 g peso seco 218 mg/100 g peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo et al.)
Cambuci	240 mg/100 g peso seco 512 mg/100 g peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo et al.)
Uvas muscadina	219 mg/100 g peso seco	(Lee, Johnson et al. 2005)

Los frutos de la granada (*Punica granatum*) son alimentos medicinales antiguos que han sido utilizados durante siglos en la medicina popular. Se consumen frescos y como zumo, que es una fuente excelente de elagitaninas y ácido elágico. Entre las elagitaninas en la cáscara y zumo del fruto de la granada se incluyen punicalina, punicalagina, corilagina, casuarina, terminalina/galadildilacton, pedunculagina, telimagrandina, granatina A y granatina B. Otras partes de la planta de la granada contienen elagitaninas adicionales, incluyendo punicafolina, punicacorteína A, punicacorteína B, punicacorteína C, punicacorteína D y punigluconina. Los zumos comerciales contienen elagitaninas de tipo galagilo, incluyendo isómeros de punicalagina (1.500 a 1.900 mg/l), taninos hidrolizables no definidos (400 a

500 mg/l) y ácido elágico y sus glucósidos (120 a 260 mg/l) (Gil et al., 2000). Las punicalaginas, elagitaninas en las que los ácidos galálgico y elágico se encuentran unidos mediante una molécula de glucosa, son abundantes en la piel de la granada. Los isómeros de punicalagina y derivados del ácido elágico no se encuentran presentes en el zumo de arilo, aunque durante el procesamiento industrial del zumo son extraídos de la cáscara y membrana circundante a los arilos y se liberan en grandes cantidades en el zumo.

Los extractos pueden prepararse en primer lugar exprimiendo un fruto, por ejemplo, la granada puede exprimirse utilizando métodos industriales de exprimir conocidos de la técnica, que pueden incluir exprimir el fruto completo mediante aplicación de presión en todo el fruto o desgranando la granada y después aplicando presión al material remanente, que consiste en los arilos, los materiales membranosos que atrapan los arilos y el material de la cáscara producido durante el procedimiento de desgranado. Alternativamente, la cáscara, que es una fuente rica en elagitaninas, en particular punicalagina, puede someterse a un procedimiento de exprimido que incluye una extracción de agua. Alternativamente, métodos de extracción no de agua pueden utilizar otros solventes, tales como etanol, acetona o metanol, a título de ejemplo.

El extracto es típicamente un extracto acuoso, que puede consistir esencialmente del zumo del fruto, opcionalmente con la adición de agua adicional. Tales extractos acuosos pueden concentrarse, enriquecerse o condensarse mediante, por ejemplo, técnicas estándares, p.ej., evaporación bajo presión reducida y métodos de filtración. Son ejemplos de concentrados aquellos que se encuentran concentrados por lo menos 2 veces, más habitualmente por lo menos 4 veces, por ejemplo por lo menos 8 veces, por lo menos 40 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 200 veces o por lo menos 1000 veces.

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

Los estudios de simulación de la digestión *in vitro* han demostrado que, en general, las elagitaninas son bastante estables bajo las condiciones fisiológicas del estómago. Las condiciones ácidas (HCl, pH 1,8 a 2,0) y los enzimas estomacales no hidrolizan las elagitaninas originales para liberar ácido elágico (AE) libre y no se ha observado degradación de las elagitaninas (Tomas-Barberan et al., 2009). Aunque el estómago aparentemente es el primer lugar importante para la absorción de AE libre, las elagitaninas no resultan absorbidas. Bajo las condiciones fisiológicas del intestino delgado, sin embargo, se produce una liberación de AE libre a partir de las elagitaninas. Esta hidrólisis aparentemente se debe a las condiciones de pH (neutras a levemente alcalinas, pH 7,0 a 7,3) y no al efecto de los enzimas pancreáticos y sales biliares (Larrosa et al., 2006).

También se han utilizado estudios animales para evaluar la biodisponibilidad y metabolismo del AE y las elagitaninas. Doyle y Griffiths (1980) han informado de una rápida absorción y metabolismo del AE en ratas. Estos autores han detectado urolitina A (UA) y otro metabolito (con toda probabilidad urolitina B (UB)) en heces y orina. Se ha demostrado que tanto UA como UB se originan en la microflora, ya que no se ha encontrado ninguno de ellos en animales libres de gérmenes. No se detectó AE no modificado en orina o heces. Estas urolitinas resultan mayoritariamente absorbidas y glucuronidadas en las células intestinales. En este caso, no se producen éteres de metilo, ya que UA y UB no presentan grupos orto-dihidroxilo 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 citocromo P450, y ello incrementa las posibilidades de glucuronidación y potencia la excreción del metabolito. Teel y Martin (1988) han observado que se detecta tanto AE libre como algunos conjugados (conjugados de éster de sulfato, glucurónido y glutatión) en orina, bilis y sangre de los ratones. La absorción de AE-³H se produce en su mayor parte dentro de las dos horas siguientes a la administración oral. Los niveles en sangre, bilis y tejidos eran bajos, y los compuestos absorbidos se excretaron en la orina. Más de la mitad del AE-³H administrado permanecía en el tracto gastrointestinal tras 24 h.

El metabolismo de los diversos ET y derivados de AE en la dieta ha sido evaluado en el ser humano. En un estudio que implicaba cuarenta voluntarios sanos, divididos en cuatro grupos, se administraron diferentes alimentos 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 contenían la ET sanguínea H-6; las nueces contenían la ET pedunculagina, y el vino envejecido en roble contenía la ET vesicalagina. Tras la ingestión, se recogieron cinco fracciones de orina a las 8, 16, 32, 40 y 56 h. No se detectaron ET ni AE en orina utilizando análisis de CL-EM/EM. Sin embargo, el metabolito microbiano 3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[b,d]pirán-6-ona (urolitina B) conjugado con ácido glucurónico se detectó entre las fracciones a partir de las 32 h y hasta 56 h en todos los sujetos, con independencia del alimento consumido. Según los resultados obtenidos, los derivados de urolitina B se excretaron independientemente de la ET consumida. Una fracción monomérica común en las ET consumidas era el AE (m/z- en 301), que podría indicar que esta subunidad perteneciente a las moléculas de ET era la molécula crítica para producir derivados de urolitina B. Se observó una transformación metabólica similar en ácido elágico y urolitina para las elagitaninas en seres humanos que consumían zumo de granada (Cerde, Espin et al., 2004; Cerde, Periago et al., 2005).

Uno de los factores principales en el metabolismo y biodisponibilidad de las elagitaninas es su transformación microbiana, produciendo una serie de derivados de urolitina (fig. 2). Entre ellas, las mejor caracterizadas y conocidas

son las urolitinas A y B, aunque también se producen intermediarios con tres y cuatro hidroxilos en el intestino delgado, se absorben y se excretan en la bilis tras la conjugación con éteres de metilo y glucurónidos (Espín et al., 2007). Los experimentos animales muestran que estos metabolitos empiezan a formarse en el intestino delgado, indicando que bacterias anaerobias podrían ser responsables de ello. El metabolismo continúa a lo largo del tracto GI, partiendo de las urolitinas D y C, finalizando con la producción de urolitinas A y B. Las diferencias en la producción de estos metabolitos por voluntarios humanos muestran que pueden producirse mediante la actividad de microorganismos específicos presentes en el intestino.

En el tracto gastrointestinal y en otros tejidos (principalmente en el hígado), el AE y metabolitos microbianos elagitaninas se metabolizan adicionalmente mediante enzimas de fase I (hidroxilación) y de fase II (metilación, glucuronidación y sulfatación), produciendo metabolitos más solubles que pueden distribuirse entre tejidos y después excretarse en la orina.

De esta manera, la UB pueden hidroxilarse para producir UA y ésta puede hidroxilarse adicionalmente para producir derivados trihidroxi.

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

En resumen, las elagitaninas generalmente no son absorbidas en el tracto gastrointestinal. Por el contrario, liberan AE en el tracto gastrointestinal, que es poco absorbido en el estómago e intestino delgado. El AE es metabolizado en gran parte por bacterias no identificadas en la luz intestinal, produciendo urolitinas. El metabolismo microbiano se inicia en el intestino delgado y los primeros metabolitos producidos conservan cuatro hidroxilos fenólicos (urolitina D, cuatro grupos hidroxilo), y estos son metabolizados adicionalmente a lo largo del tracto intestinal para eliminar las unidades hidroxilo que conducen a urolitina C (tres hidroxilos), urolitina A (dos hidroxilos) y B (un hidroxilo) en las partes distales del colon (fig. 2). Los metabolitos absorbidos son conjugados con ácido glucurónico (una o dos unidades) y/o éteres de metilo (en caso de hallarse presentes grupos orto-dihidroxilo). Los conjugados de urolitina A y B son los metabolitos principales detectados en plasma y orina, aunque también se han detectado algunos derivados trihidroxi (hidroxil-UA) o AE-dimetil éter glucurónido en cantidades más pequeñas. Las tetrahidroxi-urolitinas, trihidroxi-urolitinas y derivados de AE generalmente no se detectan en plasma periférica, sino que resultan absorbidos en el intestino delgado y son transportados al hígado, donde se metabolizan y excretan adicionalmente con la bilis al intestino delgado, estableciendo una circulación enterohepática que es responsable de la vida relativamente prolongada de las urolitinas en el plasma y orina.

Además de las fuentes alimentarias naturales, han aparecido muchos artículos científicos sobre la biosíntesis, aislamiento y actividad biológica de los taninos, especialmente las elagitaninas, durante los últimos veinte años (p.ej., 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 elagitaninas puras mediante aislamiento a partir de fuentes naturales puede ser dificultoso y rendir únicamente cantidades relativamente pequeñas de productos naturales puros. Ver, por ejemplo, Okuda et al., Chem. Pharm. Bull. 30:4230-4233, 1982; Okuda et al., Chem. Pharm. Bull. 30:234-4236, 2009. Por lo tanto, resulta notable que se conozcan métodos para la síntesis total de muchas elagitaninas. Ver, por ejemplo, Khanbabaee, K., Strategies for the synthesis of ellagitannins, en: Chemistry and Biology of Ellagitannins, Ed. S. Quideau, World Scientific Publishing, Singapore, 2009, páginas 152-202, incluyendo las referencias citadas en ella.

Se han determinado las actividades antioxidantes de extractos alimentarios ricos en elagitaninas mediante la utilización de diversos ensayos *in vitro*, y se ha informado ampliamente de actividades elevadas de fresas (Meyers et al., 2003, Aaby et al., 2005, 2007), frambuesas (Liu et al., 2002, Beekwilder et al., 2005), moras amarillas (Kähkönen et al., 2001) y otras bayas Rubus (Wada and Ou, 2002), granadas (Gil et al., 2000) y nueces (Anderson et al., 2001) y sus elagitaninas. Estos alimentos también destacan en comparación con otros alimentos de origen vegetal.

Se conoce menos sobre los efectos del consumo de alimentos ricos en elagitanina sobre el estado antioxidante *in vivo*. En mujeres de edad avanzada, la capacidad antioxidante total del suero se incrementó en aproximadamente 10% durante el periodo de 4 h después de consumir 240 g de fresas (Cao et al., 1998). Una sola dosis de extracto de granada estandarizado (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 presentó ningún efecto sobre el estado antioxidante de sujetos con síndrome metabólico (Davis et al., 2007).

El crecimiento de las células de cáncer es dependiente del equilibrio entre proliferación y apoptosis. La proliferación

celular desregulada y la supresión de la apoptosis son etapas clave en la aparición y progresión del cáncer. Existe evidencia sustancial de que extractos de alimentos ricos en elagitaninas reducen el crecimiento de las células de cáncer *in vitro* mediante inhibición de la proliferación celular, induciendo la muerte celular apoptótica y modulando la cinética del ciclo celular y las rutas de transducción de señales.

Los estudios *in vitro* realizados con líneas celulares de cáncer han demostrado 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 amarillas (Wu et al., 2007) y escaramujos (Olsson et al., 2004) inhiben la proliferación celular, inducen apoptosis y causan la parada del ciclo celular en células de cáncer de colon, hígado, pulmón, mama o cervical humanas. En estos estudios, no se evaluó la contribución de las elagitaninas a las actividades de los extractos de baya. Sin embargo, un estudio reciente (Ross et al., 2007) sugiere que la actividad antiproliferativa de las frambuesas se asocia predominantemente a las elagitaninas.

El zumo de granada y sus elagitaninas se ha informado que 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). De manera similar, los polifenoles en la piel de las uvas muscadinas inhibe el crecimiento de las células de cáncer de colon e induce apoptosis (Yi et al., 2005). Las fracciones aisladas a partir de uvas muscadinas rojas y ricas en ácido elágico, glucósidos de ácido elágico, y elagitaninas inducen 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 del fruto de la granada resulta eficaz contra las células de cáncer de próstata *in vitro*, pero no contra las células epiteliales prostáticas normales. El tratamiento de células de cáncer de próstata humano altamente agresivas con extracto de fruto de la granada resultó en la inhibición del crecimiento y viabilidad celulares y la inducción de apoptosis (Malik et al., 2005, Malik y Mukhtar, 2006).

Ahora se ha encontrado que las elagitaninas y sus metabolitos, incluyendo el ácido elágico y, especialmente, la urolitinas, inesperadamente muestran efectos protectores y restauradores de las mitocondrias. Sin pretender limitarse a ningún mecanismo en particular, se cree que diversos tipos de estrés resultan en lesiones por estrés de las mitocondrias, reduciendo de esta manera su capacidad de realizar numerosas funciones esenciales para la función celular global. Se dan a conocer además métodos útiles para tratar condiciones que implican daños por estrés en las mitocondrias, daños que pueden manifestarse de varias maneras, entre ellas, aunque sin limitación, la enfermedad mitocondrial.

Las mitocondrias son los "centros energéticos" de las células. Estos orgánulos de doble membrana desempeñan una función crítica en la generación de gran parte de la energía celular (ATP) mediante fosforilación oxidativa. Las mitocondrias también resultan esenciales para otras funciones metabólicas clave, tales como la β -oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, la cetogénesis y la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS), con importantes funciones de señalización y control de la homeostasis del calcio.

La matriz mitocondrial contiene la maquinaria enzimática para la β -oxidación de los ácidos grasos, que genera acetil-CoA a partir de cadenas de acilo y equivalentes reductores en forma de nicotinamida-adenín-dinucleótido reducida (NADH) y flavín-adenín-dinucleótido reducido (FADH₂) durante el proceso. El acetil-CoA alimenta el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC), también conocido como ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, que además produce NADH y FADH₂. Estos productos donan electrones a la cadena de transporte electrónico (CTE), conduciendo 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 grandes complejos multisubunidad (complejos I a IV), que transportan los electrones generados por el ciclo de los ATC hasta un aceptor final, el oxígeno molecular (O₂), formando H₂O en el complejo IV. El transporte de electrones se ve acompañado por la liberación de grandes cantidades de energía libre, la mayor parte de la cual es aprovechada para la traslocación de protones (H⁺) de la matriz al espacio intermembranal (fuerza motriz de protones); el resto se disipa en forma de calor. La energía contenida en el gradiente electroquímico de H⁺ generado por la CTE a continuación se acopla con la producción de ATP a medida que el H⁺ fluyen de vuelta al interior de la matriz a través de la ATP sintasa mitocondrial. De esta manera, la fosforilación oxidativa resulta del transporte electrónico, la generación de un gradiente de protones y el posterior flujo de protones acoplado a la ATP sintasa mitocondrial.

Las ROS también pueden activar proteínas desacoplantes (UCP, por sus siglas en inglés) que disipan el gradiente de protones sin producir ATP. Se considera que las UCP son reguladores naturales de este proceso, respondiendo y controlando la producción de ROS mediante la mitigación de la formación de un gradiente de protones grande. Adicionalmente, las UCP y el desacoplamiento de la respiración participan en numerosos procesos fisiológicos y patológicos importantes, tales como la termogénesis adaptativa, la regulación de la oxidación de ácidos grasos, la participación en la inflamación, la prevención de la formación de ROS, la homeostasis de la glucosa, la regulación del peso corporal y el envejecimiento.

La citrato sintasa es el enzima inicial del ciclo mitocondrial de los ATC. Este enzima cataliza la reacción entre el acetil coenzima A (acetil CoA) y el ácido oxalacético para formar ácido cítrico. La actividad de este enzima refleja tanto la biogénesis mitocondrial como la fosforilación oxidativa mitocondrial, ya que su actividad se incrementa proporcionalmente a la densidad mitocondrial (número de mitocondrias por célula) y a la actividad de la respiración mitocondrial. En consecuencia, la medición de la citrato sintasa permite obtener una evaluación global del estado funcional mitocondrial, en donde una actividad más elevada indica una fosforilación oxidativa incrementada y la síntesis de ATP, y una actividad más baja indica lo contrario.

Con el fin de entender mejor el mecanismo molecular subyacente que conduce a la mejora de la función mitocondrial, puede realizarse un perfil de los genes mitocondriales clave (ADN codificante mitocondrial y genómico) que cubren la fosforilación oxidativa, complejos de cadena mitocondrial, ciclo de los ATC, proteínas desacoplantes, factores transcripcionales, cofactores y proteínas secuestrantes de ROS.

La enseñanza convencional en biología y medicina es que las mitocondrias funcionan sólo como “factorías energéticas” para la célula. Sin embargo, más de 95% (2900 de 3000) de los genes codificantes de proteínas mitocondriales participan en otras funciones ligadas a las obligaciones especializadas de las células diferenciadas en las que residen. Estas obligaciones evolucionan durante el desarrollo de embrión a adulto, y a medida que los tejidos crecen, maduran y se adaptan al medio postnatal. Estas otras funciones no relacionadas con el ATP están íntimamente relacionadas con la mayoría de las rutas metabólicas principales utilizadas por la célula para construir, degradar y reciclar sus bloques constructivos moleculares. Las células no pueden ni producir el ARN y ADN que requieren para crecer y funcionar sin las mitocondrias. Los bloques constructivos de ARN y ADN son las purinas y las pirimidinas. Las mitocondrias contienen los enzimas limitantes de tasa para la biosíntesis de pirimidinas (dihidroorotato deshidrogenasa) y la síntesis de grupo heme (ácido d-aminolevulínico sintetasa) necesarios para producir hemoglobina. En el hígado, las mitocondrias están especializadas en la destoxificación del amonio en el ciclo de la urea. Las mitocondrias también resultan necesarias para el metabolismo del colesterol, para la síntesis de estrógeno y testosterona, para el metabolismo de los neurotransmisores y para la producción y destoxificación de los radicales libres. Las mitocondrias hacen todo lo anterior además de oxidar las grasas, proteínas y carbohidratos ingeridos en la dieta.

Las enfermedades mitocondrias son el resultado de mutaciones hereditarias o espontáneas en el ADN mitocondrial o en el ADN nuclear que conducen a la alteración de funciones de las moléculas de proteína o ARN que normalmente residen en las mitocondrias. Sin embargo, los problemas con la función mitocondrial pueden no sólo afectar a determinados tejidos como resultado de factores que se producen durante el desarrollo y crecimiento que todavía no se entienden por completo. Incluso al considerar isoformas específicas de tejido de las proteínas mitocondriales, resulta difícil explicar los patrones variables de los sistemas orgánicos afectados en los síndromes de enfermedad mitocondrial observados clínicamente.

Las enfermedades mitocondriales resultan de fallos en las mitocondrias, compartimientos especializados presentes en todas las células del cuerpo excepto en los glóbulos rojos. Las mitocondrias son responsables de la producción de más de 90% de la energía que requiere el cuerpo para mantenerse con vida y crecer. Al fallar, se genera cada vez menos energía dentro de la célula. Siguen la lesión celular e incluso la muerte celular. En el caso de que se repita este proceso en todo el cuerpo, empiezan a fallar sistemas completos y la vida de la persona en la que ocurre resulta gravemente comprometida. Las enfermedades mitocondriales afectan principalmente a niños, pero la aparición en la adultez se está identificando cada vez más.

Las enfermedades de las mitocondrias aparentemente causan el máximo daño en las células cerebrales, cardíacas, hepáticas, de músculos esqueléticos, riñones y sistemas endocrino y respiratorio.

Muchos síntomas en los trastornos mitocondriales no son específicos. Los síntomas también muestran un curso episódico, con exacerbaciones periódicas. La condición episódica de la migraña, así como la mialgia, síntomas gastrointestinales, tinnitus, depresión, fatiga crónica y diabetes, se han mencionado como diversas manifestaciones de trastornos mitocondriales en artículos de revisión sobre la medicina mitocondrial (Chinnery y Tumbull, QJM 90:657-67, 1997; Finsterer, Eur. J. Neurol.

11:163-86, 2004). 11:163-86, 2009). En los pacientes con trastornos mitocondriales, la sintomatología clínica típicamente se produce en momentos de demanda energética más elevada asociados a estresores fisiológicos, tales como enfermedad, ayuno, ejercicio excesivo y extremos de temperatura ambiental. Además, los estresores psicológicos con frecuencia también desencadenan la sintomatología, presumiblemente debido a la demanda más elevada de energía cerebral a la que el paciente no puede responder con una producción suficiente de ATP.

Dependiendo de qué células resultan afectadas, los síntomas pueden incluir la pérdida de control motor, debilidad muscular y dolor, trastornos gastrointestinales y dificultades de deglución, crecimiento defectuoso, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, diabetes, complicaciones respiratorias, convulsiones, problemas de visión/audición, acidosis láctica, retrasos del desarrollo y susceptibilidad a la infección.

Entre las enfermedades mitocondriales se incluye, aunque sin limitación, la enfermedad de Alper, el síndrome de Barth, defectos de la beta-oxidación, deficiencia en carnitina, deficiencia en carnitín-acil-carnitina, síndrome de oftalmoplegia externa progresiva crónica, deficiencia en coenzima Q10, deficiencia en complejo I, deficiencia en complejo II, deficiencia en complejo III, deficiencia en complejo IX, deficiencia en complejo V, deficiencia en CPT I, deficiencia en CPT II, síndrome de deficiencia de creatina, deficiencia en citocromo c oxidasa, aciduria glutárica tipo II, síndrome de Kearns-Sayre, acidosis láctica, LCHAD (por sus siglas en inglés, deficiencia en acil-CoA de cadena larga deshidrogenasa), neuropatía óptica hereditaria de Leber, enfermedad de Leigh, cardiomiopatía infantil letal, enfermedad de Luft, MAD (por sus siglas en inglés, deficiencia en acil-CoA de cadena intermedia deshidrogenasa), citopatía mitocondrial, agotamiento del 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 rasgadas, encefalopatía gastrointestinal mioneurogénica, neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa y ptosis, síndrome de Pearson, mutaciones DE POLG, deficiencia en piruvato carboxilasa, deficiencia en piruvato deshidrogenasa, SCHAD (por sus siglas en inglés, deficiencia en acil-CoA de cadena corta deshidrogenasa) y deficiencia en acil-CoA de cadena muy larga deshidrogenasa).

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de extracto de granada: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "producto alimentario" se refiere a un producto preparado a partir de un alimento natural. Entre los ejemplos no limitativos de productos alimentarios se incluyen zumos, vinos, concentrados, confituras, gelatinas, conservas, pastas y extractos. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "complemento nutricional" se refiere a un producto adecuado para el consumo o otra administración principalmente por sus propiedades de fomento de la salud y no por su contenido calórico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "síndrome metabólico" se refiere a una combinación de trastornos médicos que, al producirse juntos, incrementan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes. Afecta a una de cada cinco personas en los Estados Unidos y la prevalencia se incrementa con la edad. Algunos estudios han estimado que la prevalencia en los Estados Unidos es de 25% de la población. Según la definición mundial de consenso de la International Diabetes Foundation (2006), el síndrome metabólico es obesidad central más cualesquiera dos de los siguientes:

- Nivel elevado de triglicéridos: > 150 mg/dl (1,7 mmoles/l), o tratamiento específico para esta anormalidad de los lípidos,
- nivel reducido de colesterol-HDL: < 40 mg/dl (1,03 mmoles/l) en varones, < 50 mg/dl (1,29 mmoles/l) en mujeres, o tratamiento específico para esta anormalidad de los lípidos;
- presión arterial elevada: PA sistólica > 130 o PA diastólica > 85 mm Hg, o tratamiento de hipertensión diagnosticada anteriormente, y
- Nivel elevado de glucosa plasmática en ayuno: (GPA)>100 mg/dl (5,6 mmoles/l), o diabetes tipo 2 diagnosticada anteriormente.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una elagitanina: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

En determinadas realizaciones según lo anterior y otros aspectos de la exposición, la elagitanina se selecciona del grupo que consiste en 2-O-galoi-punicalina, casaurictina, castalagina y vecalagina, castalina, casuarictina, casuarina, casuarinina, ácido quebulálico, ácido quebulínico, corilagina, cornusina E, epipunicacorteína A, flosina B, gemina D, granatina A, granatina B, grandinina, lagerstroemina, lambertianina C, pedunculagina, punicaacorteína A, punicaacorteína B, punicaacorteína C, punicaacorteína C, punicaacorteína D, punicafolina, punicalagina, punicalina, puniglucanina, roburina A, roburina B, roburina C, roburina D, roburina E, rubusuavina C, sanguina H-4, sanguina H-5, sanguina H-6, sanguina H-10, estaquiurina, estrictinina, telimagrandina I, telimigrandina II, terquebulina, terflavina A, terflavina B, tergalagina y terminalina/galagildilacton. Evidentemente también se encuentran contempladas en la invención elagitaninas adicionales.

Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de punicalagina: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia,

enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.

- 5 Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de ácido elálgico: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso o para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.
- 10 Se da a conocer además un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una urolitina: para el tratamiento o la prevención de una condición seleccionada del grupo que consiste en obesidad, tasa metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del humor, estrés y trastorno de ansiedad; para el control del peso.
- 15 Un aspecto de la invención es un producto alimentario o complemento nutricional que comprende una cantidad eficaz de una urolitina para incrementar el rendimiento muscular o el rendimiento mental.
- 20 En determinadas realizaciones según lo anterior y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina A. En determinadas realizaciones según lo anterior y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina B. En determinadas realizaciones según lo anterior y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina C. En determinadas realizaciones según lo anterior y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina D.
- 25 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es la obesidad.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es una tasa metabólica reducida.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es el síndrome metabólico.
- 30 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es la diabetes mellitus.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es enfermedad cardiovascular.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es la hiperlipemia.
- 35 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es enfermedad neurodegenerativa.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es trastorno cognitivo.
- 40 En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es trastorno del humor.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es estrés.
- En cada uno de los anteriores, en una realización la condición es trastorno de ansiedad.
- 45 En cada uno de los anteriores, en una realización el producto alimentario o complemento nutricional está destinado al control del peso.
- En cada uno de los anteriores, en una realización el producto alimentario o complemento nutricional está destinado a incrementar el rendimiento muscular.
- 50 En cada uno de los anteriores, en una realización el producto alimentario o complemento nutricional está destinado a incrementar el rendimiento mental.
- 55 Se da a conocer además un método para incrementar o mantener la función mitocondrial. El método incluye la etapa de poner en contacto células con una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de incrementar la función de las mitocondrias.
- 60 Se da a conocer además un método para tratar, prevenir o controlar una enfermedad o condición relacionada con las mitocondrias asociada a una función mitocondrial alterada o a una densidad mitocondrial reducida. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad o condición asociada a una función mitocondrial alterada o una densidad mitocondrial reducida.
- 65 Un aspecto de la invención es un método para incrementar la tasa metabólica. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de

incrementar la tasa metabólica. Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, entre los precursores de una urolitina pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, una elagitanina, punicalagina y ácido elágico.

Se da a conocer además un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de prevenir o tratar el síndrome metabólico.

Se da a conocer además un método para prevenir o tratar la obesidad. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de prevenir o tratar la obesidad.

Se da a conocer además un método para prevenir o tratar las enfermedades cardiovasculares. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de prevenir o tratar las enfermedades cardiovasculares.

Se da a conocer además un método de tratamiento de la hiperlipemia. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, a fin de tratar la hiperlipemia. En una realización, la hiperlipemia es hipertrigliceridemia. En una realización, la hiperlipemia es nivel elevado de ácidos grasos libres.

Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno metabólico. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno metabólico. En una realización, el trastorno metabólico es la diabetes mellitus. En una realización, el trastorno metabólico es la obesidad.

Envejecimiento

El factor de riesgo más grande de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es claramente el envejecimiento. Se ha considerado que las mitocondrias contribuyen al envejecimiento a través de la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) y la producción neta de especies de oxígeno reactivo (ROS). Aunque la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en 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 codifican 13 componentes polipeptídicos de la cadena respiratoria, así como los ARNr y ARNt necesarios para la síntesis intramitocondrial de proteínas utilizando su propio código genético. Las mutaciones hereditarias en el ADNmt es conocido que provocan una diversidad de enfermedades, la mayoría de las cuales afecta al cerebro y a los músculos: tejidos con elevadas necesidades energéticas. Se ha planteado la hipótesis de que las mutaciones somáticas de ADNmt adquiridas durante el envejecimiento contribuyen al declive fisiológico que se produce con el envejecimiento y la neurodegeneración relacionada con el mismo. Está bien establecido que el ADNmt acumula mutaciones con el envejecimiento, especialmente deleciones a gran escala y mutaciones puntuales. En la región de control de ADNmt, las mutaciones puntuales en sitios específicos pueden acumular niveles elevados en determinados tejidos. T414G en fibroblastos en cultivo, A189G y T408A en músculo y C150T en glóbulos blancos. Sin embargo, estos "puntos calientes" de región de control no se han observado en el cerebro. Las mutaciones puntuales en nucleótidos individuales aparentemente se observan a niveles bajos en el cerebro, aunque el nivel global puede ser elevado. Utilizando una estrategia de clonación-secuenciación mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), se ha encontrado que el nivel medio de mutaciones puntuales en dos regiones codificantes de proteína del ADNmt cerebral de sujetos de edad avanzada era de ~2 mutaciones por cada 10 kb. Las regiones no codificantes, que pueden encontrarse bajo menos presión selectiva, potencialmente acumulan entre dos y cuatro veces más. La acumulación de estas deleciones y mutaciones puntuales con el envejecimiento se correlaciona con el declive de la función mitocondrial. Por ejemplo, se ha encontrado una correlación negativa entre la actividad de citocromo oxidasa cerebral y niveles incrementados de mutación puntual en un gen de citocromo oxidasa (CO1).

La producción neta de ROS es otro importante mecanismo por el que se cree que las mitocondrias contribuyen al envejecimiento. Las mitocondrias contienen múltiples portadores electrónicos capaces de producir ROS, así como una amplia red de defensas antioxidantes. Los insultos mitocondriales, incluyendo el daño oxidativo mismo, pueden provocar un desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS, resultando en la producción neta de ROS. La importancia para el envejecimiento de la producción de ROS mitocondriales se apoya en observaciones de que la potenciación de las defensas antioxidantes mitocondriales puede incrementar la longevidad. En *Drosophila*, la sobreexpresión de los enzimas antioxidantes mitocondriales manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y metionina sulfoxido reductasa prolonga el tiempo de vida. Esta estrategia resulta más exitosa en cepas de vida corta de *Drosophila*, y no presenta ningún efecto sobre cepas que ya son de vida prolongada. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de la catalasa experimentalmente dirigida a mitocondrias incrementa el tiempo de vida en una cepa de ratón que ya es de vida prolongada.

El declive cognitivo durante el envejecimiento se ha observado que se produce en animales en envejecimiento y se cree que se produce como resultado de cambios en la fisiología sináptica de las neuronas en envejecimiento. Estos

cambios se cree que conducen a una pérdida global total de la función integradora de la señalización neuronal en el cerebro (Bishop, Lu et al., 2010) y una mayor susceptibilidad a los efectos a largo plazo del estrés oxidativo y la inflamación (Joseph, Shukitt-Hale et al., 2005). La pérdida celular que tiene lugar durante el envejecimiento normal se cree que se produce principalmente debido al estrés oxidativo como resultado de los radicales libres producidos por una ruta oxidativa ineficiente y parcialmente desacoplada. En efecto, se ha demostrado que la característica común del envejecimiento en diferentes especies (*C. elegans*, *D. melanogaster*, ratones, ratas, chimpancés y seres humanos) es una prueba de función mitocondrial reducida. Esta interpretación ha sido validada adicionalmente por la observación de que un deterioro significativo de la función mitocondrial acorta el tiempo de vida 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, a través de la sobreexpresión de la catalasa en ratones, resulta en tiempos de vida extendidos (Schriner, Linford et al., 2005).

Con el envejecimiento y el declive de la función mitocondrial, las neuronas en el cerebro se vuelven más vulnerables a patologías dependientes de la edad, así como a la muerte celular. Lo anterior resulta en una pérdida de conexiones entre neuronas, así como una función neuronal deteriorada (pérdida de neurotransmisores, ausencia de disparo). También existe evidencia creciente de que las neuronas responden al daño no reparado en el ADN mediante silenciamiento de la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos, conduciendo de esta manera a una supresión adicional de las funciones celulares. Además, las células neuronales en envejecimiento muestran en todas las especies una expresión incrementada de genes implicados en rutas de respuesta al estrés.

Muchas características distintivas de estos cambios se observan en cultivo *in vitro* de células neuronales en envejecimiento, que muestran un crecimiento y formación de procesos de las neuritas reducidos. Esta reducción pudo revertirse con factores de crecimiento neuronal (Rozovsky, Wei et al., 2005).

Trastornos neurodegenerativos

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

Los primeros estadios de neurodegeneración comparten muchas de las mismas características distintivas que el declive observado en el envejecimiento. Resulta interesante destacar que enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer muestran una incidencia incrementada con la edad: más de 50% de adultos de más de 85 años presentan la enfermedad (Hebert, Scherr et al., 2003). Tal como se ha comentado anteriormente, la función mitocondrial decreciente aparentemente es una característica distintiva del envejecimiento. Este declive de la función neuronal es probable que presente un impacto significativo sobre las poblaciones neuronales con grandes demandas bioenergéticas; uno de estos grupos de neuronas son las neuronas piramidales grandes que degeneran en enfermedad de Alzheimer (Bishop, Lu et al., 2010). El declive de estas clases de neuronas en respuesta a una función mitocondrial deteriorada puede ser responsable de la aparición de enfermedad neurodegenerativa. Los efectos de los trastornos neurodegenerativos sobre la supervivencia neuronal pueden modelarse *in vitro*. Al incubar células neuronales N2 con un péptido A-beta ($A\beta$), que se cree que es el agente causativo de la enfermedad de Alzheimer, se produce un impacto significativo sobre el crecimiento de las neuritas, que puede revertirse con antioxidantes. Manczak et al. J. Alzheimers Dis. 20 supl. 2:S609-31, 2010.

La forma más común de muerte celular en la neurodegeneración es mediante la ruta apoptótica mitocondrial intrínseca. Esta ruta controla la activación de la caspasa-9 mediante la regulación de la liberación de citocromo c a través del espacio intermembrana mitocondrial. La concentración de ROS, productos secundarios normales de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, está mediada en parte por antioxidantes mitocondriales, tales como la manganosa superóxido dismutasa (SOD2) y la glutatión peroxidasa. La producción excesiva de ROS (estrés oxidativo) es una característica central de todas las enfermedades neurodegenerativas. Además de la generación de ROS, las mitocondrias también participan en funciones de sostenimiento de la vida, incluyendo la homeostasis del calcio, la fisión y fusión mitocondrial, la concentración lipídica de las membranas mitocondriales y la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM). Es probable, por lo menos a algún nivel, que la enfermedad mitocondrial que conduce a neurodegeneración implique la totalidad de dichas funciones (DiMauro y Schon, 2008).

Existe evidencia de que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo desempeñen un papel causal en la patogénesis de la enfermedad neurodegenerativa, 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 un declive cognitivo progresivo, y patológicamente, por la presencia de placas seniles compuestas principalmente de péptido amiloide β ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares constituidos principalmente de tau hiperfosforilado. Aproximadamente 5% a 10% de los casos son hereditarios, produciéndose de manera autosómico-dominante de aparición temprana. Es conocido que tres proteínas están asociadas a dichos casos hereditarios: la proteína precursora del amiloide (PPA), que es cortada secuencialmente por

β - y γ -secretasas para producir $A\beta$ -- y presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), siendo una u otra un componente de cada complejo de γ -secretasa. Existe una amplia literatura que apoya el papel de la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo en la patogénesis de la EA. El daño oxidativo se produce precozmente en el cerebro de EA, antes de la aparición de una patología de placas significativa. El daño oxidativo también precede a la deposición de $A\beta$ en ratones con PPA transgénico, estando relacionada la regulación positiva de los genes con el metabolismo mitocondrial y produciéndose la apoptosis todavía más precozmente, colocalizada con las neuronas que experimentan daño oxidativo.

Recientemente se han identificado varias rutas que conectan el estrés oxidativo y la patología de la EA. El estrés oxidativo podría activar rutas de señalización que alteran el procesamiento de la PPA o de tau. Por ejemplo, el estrés oxidativo incrementa la expresión de β -secretasa mediante de la quinasa aminoterminal c-Jun y la proteína quinasa p38 activada por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés), e incrementa la fosforilación de tau aberrante mediante activación de la glucógeno sintasa quinasa 3. La inactivación inducida por oxidante de moléculas críticas también podría resultar importante. En un estudio proteómico, se ha encontrado que la prolin isomerasa PIN1 es particularmente sensible al daño oxidativo. PIN1 cataliza cambios conformacionales de la proteína que afectan al procesamiento tanto de PPA como de tau. La inactivación de *Pin1* incrementa el procesamiento de PPA amiloidogénico y los niveles intracelulares de $A\beta$ en ratones. Los ratones con inactivación de *Pin1* también muestran hiperfosforilación de tau, déficits motores y de comportamiento, y degeneración neuronal. De esta manera, el daño inducido por oxidación de PIN1 y proteínas similarmente sensibles podría resultar importante en el fomento de los procesos neurodegenerativos.

Las mitocondrias también desempeñan un papel importante en la enfermedad de Parkinson (EP), que se caracteriza clínicamente por rigidez progresiva, bradiquinesia y temblores, y patológicamente por la pérdida de neuronas pigmentadas en la sustancia negra y la presencia de cuerpos de Lewy (inclusiones citoplasmáticas características en las que la α -sinucleína y la ubiquitina se tiñen inmunológicamente).

Las mitocondrias inicialmente se relacionaron con la EP porque la MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), el metabolito de la cual, MPP+ inhibe el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, causa parkinsonismo en toxicómanos de drogas de diseño. Este modelo se ha refinado desde entonces en animales de laboratorio, en los que la infusión crónica de rotenona (otro inhibidor de complejo I) o MPTP resulta clínicamente en el fenotipo parkinsoniano y patológicamente en degeneración nigral con inclusiones citoplasmáticas inmunorreactivas para α -sinucleína y ubiquitina. El mecanismo de toxicidad en estos modelos de inhibición de complejo I probablemente implica estrés oxidativo. La inhibición del complejo I y el estrés oxidativo se ha demostrado que son relevantes en la EP natural al encontrar deficiencia de 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 a la EP también implican las mitocondrias en la patogénesis de la enfermedad. Hasta el momento, las mutaciones o polimorfismos en el ADNmt y por lo menos nueve genes nucleares nombrados han sido identificados como causantes de EP o que afectan al riesgo de EP: α -sinucleína, parkina, ubiquitin hidrolasa carboxiterminal L1, *DJ-1*, quinasa 1 inducida por fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN, por sus siglas en inglés) (*PINK1*), quinasa 2 rica en repeticiones de leucina (*LRRK2*), el receptor nuclear *NURR1*, *HTRA2*, y tau. De los genes nucleares, α -sinucleína, parkina, *DJ-1*, *PINK1*, *LRRK2*, y *HTRA2* implican directa o indirectamente las mitocondrias. En un pequeño número de casos, las mutaciones del ADNmt heredadas resultan en parkinsonismo, típicamente como una característica de un síndrome mayor. En una familia, se asoció la mutación G11778A de atrofia óptica de Leber con el parkinsonismo respondedor a 1-DOPA, concurrente variablemente con demencia, distonía, oftalmoplejia y ataxia. Notablemente, esta mutación se encuentra en una subunidad del complejo I. Las mutaciones en el gen de la ADNmt polimerasa- γ (*POLG*) codificado en el núcleo interfieren en la replicación del ADNmt y resultan en múltiples delecciones del ADNmt, causando típicamente oftalmoplejia externa progresiva crónica y miopatía. En dichas familias, las mutaciones *POLG* también cosegregan con parkinsonismo.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza clínicamente por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad del tejido muscular, que refleja la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferior en el córtex, tallo encefálico y médula espinal. Aproximadamente 90% de los casos son esporádicos (ELAE) y el 10%, hereditarios (ELAH). Aproximadamente el 20% de los casos hereditarios está causado por mutaciones en la Cu/Zn-superóxido dismutasa (*SOD1*). Tanto en ELAE como en ELAH, muestras postmórtem y de biopsia procedentes de médula espinal, nervios y músculos muestran anomalías en la estructura, número y localización de las mitocondrias. También se han detectado defectos en las actividades de los complejos de la cadena respiratoria 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 el córtex y el cuerpo estriado. La EH se hereda de manera autosómica dominante, y se debe a la expansión de una repetición del trinucleótido CAG en el gen huntingtina (*HTT*), que da lugar a un tramo poliglutamina expandido en la proteína correspondiente. El número normal de repeticiones de CAG (Q) es inferior a 36; los números de repetición superiores a 40 se asocian a enfermedad en el ser humano. Diversas líneas de evidencia demuestran la participación de la disfunción mitocondrial en la EH. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear revela niveles incrementados de lactato en el córtex y los ganglios basales. Los estudios bioquímicos muestran actividades reducidas de los complejos II y III de la cadena de transporte electrónico en el cerebro de EH humano. En células estriatales procedentes de embriones de ratón con introducción

('knock-in') de mutante, la respiración mitocondrial y la producción de ATP se encuentran significativamente deterioradas.

Se da a conocer además un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, muerte o disfunción neuronal relacionada con la edad. Tal como se utiliza en la presente memoria, "enfermedad neurodegenerativa" o, equivalentemente, "trastorno neurodegenerativo", se refiere a cualquier condición que implique la pérdida progresiva de neuronas funcionales en el sistema nervioso central. En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se asocia a muerte celular relacionada con la edad. Entre las enfermedades neurodegenerativas ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como ELA y como enfermedad de Lou Gehrig), así como el complejo de demencia del 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 fatal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, neuroacantocitosis, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, 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 del erizo tambaleante.

En una realización, el método se utiliza para tratar la muerte o disfunción neuronal relacionada con la edad. Dicho método se refiere a la neurodegeneración que no es atribuible a una enfermedad neurodegenerativa específica, p.ej., la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

En una realización, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

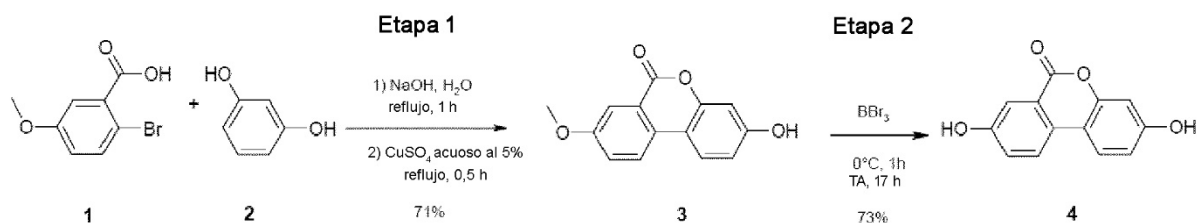
El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad neurodegenerativa.

Según lo anterior y otros métodos de la invención, una "urolitina", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cualquiera o a una combinación de urolitina A, urolitina B, urolitina C y urolitina D (ver, por ejemplo, la fig. 1 y en 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 en forma de una urolitina aislada, p.ej., aislada a partir de una fuente natural o preparada mediante síntesis total. Las urolitinas aisladas pueden sintetizarse *de novo*. Ver, por ejemplo, la solicitud publicada de patente US nº 2008/0031862.

En una realización, se sintetizó urolitina A (3,8-dihidroxi-dibenzo- α -pirona) en una síntesis en dos etapas del modo siguiente. La etapa 1 es una reacción catalizada con cobre que se produce en presencia de una base (reacción de Hurltley) donde los materiales de partida ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico y resorcinol se hacen reaccionar entre sí, generando el andamiaje dihidro-dibenzopirona. En la etapa 2, la desmetilación de la benzopirona con BBr_3 rinde 3,8-dihidroxi-dibenzo- α -pirona (urolitina A).

Una mezcla de ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico 1 (27,6 g), resorcinol 2 (26,3 g) e hidróxido sódico (10,5 g) en agua (120 ml) se calentó bajo reflujo durante 1 hora. A continuación, 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 la temperatura ambiente y el sólido se separó en un filtro de Büchner. El residuo se lavó con agua fría (50 ml), proporcionando un sólido rojo pálido (38,0 g) que se trituró en MeOH caliente (200 ml). La suspensión se dejó durante la noche a 4°C. El precipitado rojo pálido resultante se separó mediante filtración y se lavó con MeOH frío (75 ml), rindiendo el compuesto del título 3 en forma de un sólido marrón pálido. La RMN ^1H concordaba con la estructura 3.

A una suspensión de 3 (10,0 g, 41 mmoles, 1,0 equ.) 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 BBr_3 puro en 110 ml de diclorometano anhidro). La mezcla se dejó a 0°C durante 1 hora y se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente. La solución se agitó a esa temperatura durante 17 horas. Se separó el precipitado amarillo mediante filtración y se lavó con agua fría (50 ml), proporcionando un sólido amarillo que se calentó bajo 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 dietílico (100 ml), rindiendo el compuesto del título 4 en forma de un sólido amarillo. La estructura y la pureza se determinaron mediante RMN ^1H y ^{13}C .



En una realización, una “urolitina” tal como se utiliza en la presente memoria es o puede incluir una urolitina glucuronada, metilada o sulfatada.

De acuerdo con lo anterior y otros métodos de la invención, un “precursor de urolitina”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una elagitanina o un metabolito de elagitanina, incluyendo, aunque sin limitación, el ácido elágico (AE). En una realización, un precursor de urolitina es la punicalagina (PA). En una realización, un precursor de urolitina es la punicalina (PB). Ver, por ejemplo, la fig. 1. En una realización, un precursor de urolitina es el ácido elágico (AE). En una realización, se proporciona un precursor de urolitina en forma de un precursor de urolitina aislado, p.ej. aislado a partir de una fuente alimentaria natural o preparado mediante síntesis total. Los precursores de urolitina aislados habitualmente se purifican a partir de fuentes naturales o se sintetizan *de novo*; algunos precursores de urolitina, incluyendo el AE, se encuentran disponibles comercialmente de proveedores tales como Sigma Aldrich.

También de acuerdo con lo anterior y otros métodos de la invención, entre los precursores de urolitinas también se incluyen alimentos naturales que contienen elagitaninas y ácido elágico, especialmente alimentos naturales que son ricos en elagitaninas, ácido elágico o tanto elagitaninas como ácido elágico. Entre dichos alimentos se incluyen determinadas bayas, uvas, granadas, escaramujos y frutos de cáscara. En una realización, el alimento natural es la granada.

Adicionalmente, entre los precursores de urolitinas se incluyen alimentos procesados y bebidas preparadas a partir de dichos alimentos naturales. El alimento procesado puede presentar cualquier forma, incluyendo, por ejemplo, confituras, gelatinas, conservas, pastas, untables, zumos, vinos, extractos, concentrados y similares. En una realización, el alimento procesado es zumo de granada.

En una realización, se proporciona un precursor de urolitina en forma de un extracto, p.ej., un extracto de fruta.

En una realización, se proporciona un precursor de urolitina en forma de concentrado, p.ej., un concentrado de fruta o concentrado de zumo de fruta.

El método dado a conocer puede utilizarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que se conozca que resulta útil para tratar las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, en una realización, el método de la invención puede combinarse con la utilización de uno cualquiera o más de inhibidores de acetilcolinesterasa, tales como donezepilo (Aricept®), galantamina (Razadyne®) y rivastigmina (Exelon®), y antagonistas de receptor de N-metil D-aspartato (NMDA), tales como memantina (Namenda®).

Se da a conocer además un método para mejorar la función cognitiva. Tal como se utiliza en la presente memoria, “función cognitiva” se refiere a cualquier proceso mental que implique operaciones simbólicas, p.ej., percepción, memoria, atención, comprensión oral, generación de habla, comprensión lectora, creación de imágenes, aprendizaje y razonamiento. En una realización, “función cognitiva” se refiere a una cualquiera o más de percepción, memoria, atención y razonamiento. En una realización, “función cognitiva” se refiere a memoria.

El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita una mejora de la cognición, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, mejorando de esta manera la función cognitiva.

Los métodos para medir la función cognitiva son bien conocidos y entre ellos puede incluirse, por ejemplo, ensayos individuales o una batería de ensayos para cualquier aspecto de la función cognitiva. Uno de tales ensayos es el ensayo de función cognitiva de Prudhoe. Margallo-Lana et al., J. Intellect Disability Res. 47:488-492, 2009. Otro de tales ensayos es el mini-examen de estado mental (MMSE, por sus siglas en inglés), que está diseñado para evaluar la orientación en el tiempo y el espacio, registro, atención y cálculo, recuerdo, uso y comprensión del lenguaje, repetición y órdenes complejas. Folstein et al., J. Psych. Res. 12:189-198, 2009. Entre otros ensayos útiles para medir la función cognitiva se incluyen la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer-Cognitiva (ADAS-Cog, por sus siglas en inglés) (Rosen et al., Am. J. Psychiatry 141(11):1356-64, 1984) y la batería automatizada de ensayo neuropsicológico (CANTAB, por sus siglas en inglés) (Robbins et al., Demencia 5(5):266-81, 1994). Dichos ensayos pueden utilizarse para evaluar la función cognitiva de una manera objetiva, de manera que los cambios en la función cognitiva, por ejemplo en respuesta al tratamiento de acuerdo con métodos de la invención, puede medirse y compararse.

El método dado a conocer puede utilizarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que es conocido

que mejora la función cognitiva. Por ejemplo, en una realización, el método de la invención se combina con la utilización de cafeína o nicotina, o ambas.

5 En una realización, el sujeto no presenta un trastorno cognitivo. Por ejemplo, el método puede utilizarse para potenciar la función cognitiva en un sujeto que presenta una función cognitiva normal.

10 Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno cognitivo. Tal como se utiliza en la presente memoria, un trastorno cognitivo se refiere a cualquier condición que altera la función cognitiva. En una realización, "trastorno cognitivo" se refiere a una cualquiera o más de delirio, demencia, trastorno de aprendizaje, trastorno de déficit de atención (TDA) y trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH). En una realización, el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje. En una realización, el trastorno cognitivo es el trastorno por déficit de atención (TDA). En una realización, el trastorno cognitivo es el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (TDAH).

15 El método dado a conocer incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento de un trastorno cognitivo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno cognitivo.

20 El método dado a conocer puede utilizarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que es conocido que resulta útil para tratar un trastorno cognitivo. Por ejemplo, en una realización, el método de la invención se combina con la utilización de un estimulante, tal como metilfenidato (p.ej., Ritalin®), dextroanfetamina (Dexedrine®), sales mixtas de anfetamina (Adderall®), dextrometanfetamina (Desoxyn®) y lisdexanfetamina (Vyvanase®).

25 Se da a conocer además un método de tratamiento o prevención de una disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés. Tal como se utiliza en la presente memoria, una disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés se refiere a una alteración de la función cognitiva que es inducida o está relacionada con estrés. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento o prevención de una disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar o prevenir la disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés.

30 Trastornos del humor

El tejido cerebral requiere un nivel elevado de energía para su metabolismo, incluyendo el mantenimiento del potencial transmembranal, la transducción de señales y el remodelado sináptico. Un incremento de los síntomas y trastornos psiquiátricos, en particular la depresión, probablemente se encuentra presente en pacientes con trastornos mitocondriales.

40 La estructura y función mitocondrial, medida mediante una diversidad de diferentes técnicas, se ha demostrado que es anormal en pacientes con trastornos del humor, incluyendo depresión mayor, así como en los demás trastornos del espectro afectivo.

Dos estudios han revelado que una probabilidad incrementada en varias veces de desarrollar depresión puede heredarse maternamente con el ADNmt, lo que apoya fuertemente la idea de que las variantes de la secuencia del ADNmt pueden inducir disfunción mitocondrial que puede predisponer a los individuos a desarrollar depresión (Boles et al., 2005; Burnett et al., 2005).

45 La relación entre disfunción mitocondrial y depresión unipolar se ha explorado en varios estudios. En estudios de cerebro postmórtem procedente de sujetos con depresión mayor probable o diagnosticada, la mayoría de los cuales había sido (probablemente) medicada, no pudo detectarse ningún incremento de la delección común de 5 kb del ADNmt (Kato et al., 1997; Sabuncian et al., 2007; Shao et al., 2008; Stine et al., 1993). Las alteraciones de los productos de traducción ligados a la función mitocondrial se encontraron en los córtex visuales frontal, prefrontal y terciario (Karry et al., 2004; Whatley et al., 1996). Se ha informado de alteraciones de cuatro proteínas de localización mitocondrial en el córtex cingulado anterior (Beasley et al., 2006). También se ha informado de una expresión génica reducida en 6 de 13 transcritos codificados en ADNmt en el tejido del córtex frontal (zonas de Brodmann (ZB) 9 y 46) (Shao et al., 2008) y de ARNm mitocondrial y proteínas codificadas en ADNn en el cerebelo, en la depresión mayor (Ben-Shachar y Karry, 2008). Los niveles de una subunidad de complejo I de la cadena de transporte electrónico (NDUFS7) y de actividad del complejo I, en córtex prefrontal postmórtem se encontró que eran inferior o en el rango inferior de los controles normales en la mitad de los casos de trastorno depresivo mayor en un estudio reciente (Andreazza et al., 2010). En los dos últimos estudios, los autores no pudieron detectar ningún efecto de la medicación sobre los resultados.

60 Las reducciones de las proporciones enzimáticas de la cadena respiratoria y de la tasa de producción de ATP, y una prevalencia incrementada de pequeñas delecciones del ADNmt (pero no de la delección común de 5 kb del ADNmt) se encontraron en músculo de pacientes con un diagnóstico de por vida de depresión unipolar mayor con síntomas físicos concomitantes. La medicación aparentemente no influyó sobre los resultados (Gardner et al., 2003b). La relevancia clínica se sugiere en el resultado de que virtualmente todos los sujetos deprimidos con grados muy elevados de molestias somáticas mostraban tasas de producción de ATP bajas en músculo biopsiado (Gardner y Boles, 2008a).

Se da a conocer además un método de tratamiento del trastorno de humor (también conocido como trastorno afectivo). Tal como se utiliza en la presente memoria, "un "trastorno del humor" se refiere a una alteración del estado emocional, tal como se indica en el *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, publicado por la American Psychiatric Association. Entre los trastornos del humor se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la depresión mayor, la depresión postparto, la distimia y el trastorno bipolar. En una realización, el trastorno del humor es la depresión mayor.

El método dado a conocer incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento de un trastorno del humor, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del humor.

El método dado a conocer puede utilizarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que es conocido que resulta útil para tratar un trastorno del humor. Por ejemplo, en una realización, el método de la invención se combina con la utilización de un agente antidepressivo. Los agentes antidepressivos son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS), los inhibidores de la recaptación de la serotonina-norepinefrina (IRSN), antidepressivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos, inhibidores de la recaptación de norepinefrina, inhibidores de la recaptación de norepinefrina-dopamina, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, desinhibidores de norepinefrina-dopamina, antidepressivos tricíclicos e inhibidores de monoamina oxidasa.

Se da a conocer además un método de tratamiento o prevención de un trastorno del humor inducido por estrés o relacionado con estrés. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "trastorno del humor inducido por estrés o relacionado con estrés" se refiere a una alteración del estado emocional que resulta inducido o está relacionado con el estrés. Dichos trastornos del humor en ocasiones se denominan trastornos reactivos del humor y deben distinguirse de otros trastornos del humor, p.ej., los denominados trastornos del humor orgánicos. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento o prevención de un trastorno del humor inducido por estrés o relacionado con estrés, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar o prevenir el trastorno del humor inducido por estrés o relacionado con estrés.

Se da a conocer además un método de tratamiento de un trastorno de ansiedad. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "trastorno de ansiedad" se refiere a un estado disfuncional de miedo y ansiedad, p.ej., miedo y ansiedad desproporcionados respecto a una situación estresante o la expectativa de una situación estresante. En una realización, un trastorno de ansiedad es una cualquiera o una combinación de trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo y trastorno de estrés post-traumático. En una realización, un trastorno de ansiedad es uno cualquier o una combinación de trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico, trastorno de estrés post-traumático y trastorno de ansiedad social. En una realización, un trastorno de ansiedad es el trastorno de estrés generalizado. En una realización, un trastorno de ansiedad es el trastorno de estrés post-traumático. En una realización, un trastorno de ansiedad es el trastorno de ansiedad inducida por estrés.

El método dado a conocer incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento de un trastorno de ansiedad, una cantidad terapéuticamente eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno de ansiedad.

El método dado a conocer puede utilizarse solo o en combinación con cualquier método o compuesto que es conocido que resulta útil para tratar un trastorno de ansiedad. Por ejemplo, en una realización, el método de la invención se combina con la utilización de una cualquiera o una combinación de psicoterapia, benzodiazepinas, buspirona (Buspar®) o beta-bloqueantes. Las benzodiazepinas son bien conocidas de la técnica y entre ellas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, clonazepam (Klonopin®), lorazepam (Ativan®) y alprazolam (Xanax®). Entre los fármacos adicionales que pueden utilizarse en combinación con los métodos de la invención se incluyen imipramina (Tofranil®) y venlafaxina (Effexor®).

Se da a conocer además un método de tratamiento o prevención de un trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con estrés. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "trastorno de ansiedad inducida por estrés o relacionada con estrés" se refiere a un estado disfuncional de miedo y ansiedad que resulta inducido o está relacionado con estrés. Dichos trastornos de ansiedad en ocasiones se denominan trastornos reactivos de ansiedad y deben distinguirse de otros trastornos de ansiedad, p.ej., los denominados trastornos de ansiedad orgánicos. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que necesita tratamiento o prevención de un trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con estrés, una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar o prevenir el trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con estrés.

Se da a conocer además un método de estimulación del crecimiento de las neuritas. En una realización, el método es un método *in vitro*. En una realización, el método es un método *in vivo*. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "neurita" se refiere a cualquier proyección del cuerpo celular de una neurona. En una realización, dicha proyección es un axón. En una realización, dicha proyección es una dendrita. El término se utiliza frecuentemente al referirse a neuronas inmaduras o en desarrollo, especialmente de células en cultivo, debido a que puede resultar difícil distinguir

axones y dendritas antes de completarse la diferenciación. Las neuritas con frecuencia se encuentran empaquetadas con haces de microtúbulos, el crecimiento de los cuales resulta estimulado por el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), así como proteínas tau, proteína 1 asociada a los microtúbulos (MAP1, por sus siglas en inglés) y proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2). La molécula de adhesión a células neurales N-CAM se combina simultáneamente con otra N-CAM y un receptor de factor de crecimiento fibroblástico para estimular la actividad de tirosina quinasa de ese receptor, induciendo el crecimiento de las neuritas.

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, “estimular” se refiere a potenciar o inducir. En una realización, “estimular” significa inducir. Por ejemplo, el crecimiento de las neuritas en una muestra de control negativo puede ser despreciable, mientras que el crecimiento de las neuritas en una muestra experimental o de tratamiento puede no ser despreciable. En una realización, “estimular” significa potenciar. Por ejemplo, el crecimiento de las neuritas en una muestra de control negativo puede no ser despreciable, mientras que el crecimiento de las neuritas en una muestra experimental o de tratamiento puede ser significativamente superior al del control negativo. Evidentemente, “estimular” tal como se utiliza en la presente memoria puede comprender tanto potenciar como inducir.

En una realización, el método incluye la etapa de poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad eficaz de una urolitina o un precursor de la misma, para estimular el crecimiento de las neuritas.

En una realización, el método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la urolitina o precursor de la misma, estimulando el crecimiento de las neuritas.

Los métodos dados a conocer pueden utilizarse solos o en combinación con cualquier método o compuesto que se conozca que resulta útil para estimular el crecimiento de las neuritas. Por ejemplo, en una realización, un método de la invención puede combinarse con la utilización de una cualquiera o más de NGF, proteína tau, MAP1, MAP2, N-CAM o un agente que induce la expresión de una cualquiera o más de NGF, proteína tau, MAP1, MAP2, N-CAM o receptor del factor de crecimiento fibroblástico.

Utilización de células neuronales *in vitro* para cribar compuestos para 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 prestan sostén a la comunicación neuronal. Estas entidades están compuestas esencialmente de cuerpos celulares neuronales, neuritas y contactos sinápticos que las conectan con las células diana. Las neuronas muestran morfologías muy complejas. Los tipos celulares neuronales más complejos, tales como las neuronas motoras con proyecciones axonales que se extienden hasta una longitud de hasta un metro o neuronas dopaminérgicas nigrales que establecen más de 150.000 contactos sinápticos, con frecuencia serán los más vulnerables en el envejecimiento normal o en una enfermedad. Para mantener una arquitectura tan compleja y transmitir eficazmente las señales eléctricas y neuroquímicas, las neuronas se basan fuertemente en el suministro de energía. Por lo tanto, el transporte axonal, la actividad sináptica y el mantenimiento de los gradientes iónicos dependen en gran medida de la función mitocondrial. Para continuar dichas exigentes funciones celulares, las neuronas experimentan con el tiempo dificultades para mantener el delicado equilibrio de actividad mitocondrial y consiguiente estrés oxidativo. Dicho desequilibrio con frecuencia se considera la causa de la disfunción neuronal o la degeneración prematura.

Por lo tanto, cualquier tratamiento que estimule la supervivencia neuronal, o la formación de los procesos neuronales y los contactos sinápticos que construyen la compleja arquitectura neuronal, se espera que presenten un impacto positivo sobre las funciones neuronales. La medición de los efectos del compuesto sobre la función neuronal típicamente se basa en la monitorización tediosa de los resultados de comportamiento animal, los cuales no permiten el cribado de rendimiento intermedio o elevado de actividades biológicas. Los modelos *in vitro* basados en líneas celulares de neuroblastoma o cultivos neuronales primarios representan una aproximación para evaluar los efectos de compuesto sobre parámetros morfológicos cruciales, que reflejarán la capacidad de las neuronas de sostener su función normal en el cerebro de mamífero. Indicadores tales como el número de procesos, su longitud o complejidad revelan efectos de compuesto sobre etapas críticas de la señalización intracelular. Aunque debe considerarse que dichos parámetros sólo reflejan indirectamente el rendimiento de funciones cerebrales superiores, proporcionan una evaluación valiosa de la eficacia del compuesto que puede traducirse en funciones cognitivas o motoras mejoradas bajo condiciones normales o de enfermedad.

Trastornos metabólicos

La función mitocondrial en tejidos metabólicos clave (hígado, músculo, tejido adiposo, páncreas) participa en la patogénesis de las enfermedades metabólicas. En cada uno de dichos tejidos, la actividad oxidativa mitocondrial debe ser apropiada para oxidar totalmente las cargas de nutrientes, en particular los ácidos grasos. El fracaso en la oxidación completa puede conducir a una acumulación de intermediarios lipídicos, productos de oxidación incompleta de los ácidos grasos y ROS. Conjuntamente, estos sucesos celulares contribuyen a la acumulación de grasa,

resistencia a la insulina, secreción alterada de insulina, inflamación de grado bajo y estrés oxidativo, la totalidad de los cuales son componentes de la diabetes mellitus de tipo II y la obesidad.

La importancia de la actividad mitocondrial en la patogénesis de las enfermedades metabólicas se ha establecido en varios estudios en seres humanos. Por ejemplo, la resistencia a la insulina en el músculo esquelético se ha asociado a un defecto en la fosforilación oxidativa mitocondrial, donde se observa una reducción de 30% de la actividad mitocondrial en descendientes resistentes a insulina de pacientes con diabetes de tipo 2 en comparación con sujetos de control. Petersen K.F., et al., *New Engl. J. Med.* 350:664-71, 2009. También se ha observado que los pacientes obesos muestran una reducción de 20% de la actividad mitocondrial junto con una reducción de 35% del tamaño mitocondrial en comparación con sujetos delgados sanos. Petersen K.F., et al., *Science* 300:1140-2, 2003. Finalmente, el declive asociado a la edad de la función mitocondrial contribuye a la resistencia a la insulina en personas de edad avanzada. De acuerdo con lo anterior, se ha informado de una reducción de 40% de la actividad oxidativa y de fosforilación en las mitocondrias en sujetos de edad avanzada en comparación con sujetos jóvenes. Estas observaciones relacionan las alteraciones de la función mitocondrial con trastornos metabólicos, especialmente la "diabesidad" (Kelley D.E. et al., *Diabetes* 51:2944-50, 2002).

La actividad oxidativa mitocondrial, también denominada fosforilación oxidativa, puede considerarse el determinante clave que subyace al riesgo de enfermedades metabólicas. Las reducciones de la actividad mitocondrial pueden estar mediadas por factores genéticos (p.ej., historia familiar, etnicidad), mecanismos epigenéticos, exposiciones durante el desarrollo, comportamiento de alimentación y envejecimiento.

En el caso de que el exceso sostenido de combustible (p.ej., por sobrecalentamiento o un almacenamiento defectuoso de grasas) sobrepase las demandas energéticas y/o la capacidad oxidativa, y/o los mecanismos compensatorios apropiados resulten insuficientes (por ejemplo, debido a inactividad o incapacidad de las mitocondrias de adaptarse a las demandas oxidativas celulares más elevadas), se da un riesgo incrementado de trastornos metabólicos. La acumulación de lípidos y estrés oxidativo resultantes pueden alterar las respuestas transcripcionales y dañar las mitocondrias, reduciendo adicionalmente la capacidad de fosforilación oxidativa, agravando los efectos perjudiciales del exceso de combustible, elevando el riesgo de trastornos metabólicos.

La suficiencia en la oxidación total de los ácidos grasos reside en el equilibrio entre: (i) la actividad oxidativa mitocondrial neta (determinada por la necesidad de generar energía para satisfacer las demandas celulares, p.ej., la contracción y el transporte iónico), y (ii) la disponibilidad de combustible (determinada por la ingesta de alimentos, la adiposidad y la capacidad de almacenamiento adiposo). Se alcanza el equilibrio cuando la actividad oxidativa igual o excede las cargas de combustible.

Bajo condiciones homeostáticas normales, puede alterarse tanto la actividad oxidativa como la disponibilidad de combustible celular para garantizar que la función mitocondrial es apropiada al medio metabólico ambiente. Por ejemplo, puede incrementarse la demanda celular de energía mediante ejercicio, y puede reducirse la disponibilidad de combustible mediante la pérdida de peso y/o la reducción de la ingesta de alimento. En el presente contexto, las variaciones interindividuales de capacidad y/o actividad oxidativa, carga de combustible o capacidad de modular la actividad mitocondrial (respuesta aguda), de incrementar la capacidad mitocondrial (respuesta crónica) o de resolver el estrés oxidativo podrían determinar el punto de ajuste del equilibrio metabólico. Tales diferencias podrían convertirse en prominentes particularmente en un medio obesogénico (uno caracterizado por medios que estimulan una ingestión total de alimentos incrementada, una ingesta de alimentos no saludables y la inactividad física). Por lo tanto, los individuos con una capacidad oxidativa elevada o respuestas adaptativas presentarían una tolerancia elevada a cargas de combustible elevadas. A la inversa, los individuos con capacidad oxidativa reducida y/o respuestas adaptativas subóptimas serían intolerantes a cargas de combustible moderadamente elevadas, conduciendo a la acumulación de lípidos, a oxidación incompleta, a producción de ROS y a resistencia a la insulina.

Con el tiempo, una compensación insuficiente resultará en resistencia crónica a la insulina y trastornos metabólicos. La capacidad oxidativa insuficiente podría resolverse mediante mecanismos compensatorios que incrementen la capacidad oxidativa (p.ej., el ejercicio) o reduzcan la carga de combustible (pérdida de peso). Sin embargo, estos cambios de estilo de vida aparentemente resultan insuficientes habitualmente o no alcanzables por la mayoría de sujetos con sobrepeso/obesos y diabéticos de tipo 2 o prediabéticos.

Las mitocondrias resultan particularmente importantes para la función del músculo esquelético, dadas las elevadas demandas oxidativas impuestas en este tejido por la contracción intermitente. Las mitocondrias desempeñan un papel crucial en la garantía de los niveles adecuados de ATP necesarios para la contracción por los sarcómeros musculares. Esta elevada necesidad de ATP de los sarcómeros probablemente ha contribuido a generar las características poblaciones de mitocondrias asociadas a subsarcolema y sarcómero en el músculo. Además, las células musculares deben mantener la flexibilidad metabólica, la capacidad de modular rápidamente la oxidación de sustratos como función de las condiciones hormonales y energéticas ambientales. Por ejemplo, el tejido muscular sano predominante oxida lípidos en el estado de ayuno, tal como pone de manifiesto el bajo cociente respiratorio (CR), con la consiguiente transición a la oxidación de carbohidratos (CR incrementado) durante el estado alimentado. La disponibilidad de los combustibles, particularmente los lípidos, y la capacidad de oxidarlos dentro de las mitocondrias, también resulta crítica para el ejercicio sostenido. De esta manera, la capacidad funcional mitocondrial probablemente afectará directamente

la función metabólica muscular y, debido a su gran contribución a la masa corporal total, presentará un impacto significativo sobre el metabolismo del cuerpo completo. Esta posibilidad se ve apoyada por los resultados de contenido mitocondrial incrementado en músculo esquelético en un individuo con hipermetabolismo y resistencia a la ganancia de peso (síndrome de Luft).

Resistencia a la insulina y diabetes mellitus

El músculo esquelético es el órgano sensible a la insulina de mayor tamaño en el ser humano, explicando más de 80% de la eliminación de glucosa estimulada por insulina. De esta manera, la resistencia a la insulina en este tejido presenta un impacto importante sobre la homeostasis de la glucosa en cuerpo completo. En efecto, se han observado múltiples defectos metabólicos en el músculo de sujetos que son resistentes a la insulina, aunque normoglucémicos con riesgo elevado de desarrollar diabetes, incluyendo: (i) síntesis reducida de glucógeno estimulada por insulina, (ii) alteraciones en la transducción de señal de insulina, e (iii) acumulación incrementada de lípidos musculares. Aunque actualmente sigue sin conocerse si cualquiera de dichos defectos desempeña un papel causal en la resistencia a la insulina, el exceso de lípidos intramiocelulares se correlaciona fuertemente con la gravedad de la resistencia a la insulina, incluso tras la corrección para el grado de obesidad, y se ha observado en músculos de múltiples tipos de fibra. Además, el exceso de lípidos se ha asociado experimentalmente a la inducción de resistencia a insulina y a alteraciones en la transducción de señal de insulina. De esta manera, un posible mecanismo por el que la función mitocondrial alterada podría contribuir a la resistencia a la insulina es mediante un metabolismo alterado de los ácidos grasos. Una carga tisular incrementada de lípidos, al igual que con la obesidad y/o la inactividad sostenida, puede conducir a la acumulación de acil graso coenzima A (CoA), diacilgliceroles, ceramidas, productos de oxidación incompleta y ROS, la totalidad de los cuales se ha asociado experimentalmente a una señalización y acción reducidas de la insulina. Entre los mecanismos adicionales que relacionan potencialmente la función oxidativa mitocondrial alterada y la resistencia a la insulina se incluyen: (I) una síntesis de ATP reducida para funciones que requieren energía, tal como una captación de glucosa estimulada por insulina, (ii) anomalías en la homeostasis del calcio (necesaria para la captación de glucosa inducida por el ejercicio), e (iii) una producción reducida de ATP durante el ejercicio, que contribuye potencialmente a una capacidad aeróbica reducida, fatiga muscular y reducción de ejercicio voluntario con el tiempo, alimentando adicionalmente un ciclo vicioso de resistencia a la insulina alimentada por la inactividad.

La capacidad mitocondrial es crucial para la función clave de la secreción de insulina regulada por células beta (β) pancreáticas. La secreción de insulina tanto rápida (primera etapa) como más prolongada (segunda etapa) dependen del metabolismo de la glucosa y de la capacidad oxidativa mitocondrial; la oxidación de la glucosa incrementa la proporción ATP/ADP, inhibiendo los canales K-ATP de la membrana plasmática y permitiendo la apertura de los canales del calcio activados por voltaje. El calcio citoplasmático incrementado a continuación desencadena la exocitosis de gránulos de insulina anclados a la membrana plasmática (primera etapa). El posterior transporte de gránulos a la membrana plasmática (segunda etapa) aparentemente depende de metabolitos mitocondriales producidos mediante anaplerosis. El metabolismo mitocondrial también resulta necesario para la producción controlada transitoria de ROS, que resulta necesario para las rutas de señalización mitocondrial que desencadenan la exocitosis de gránulos.

La diabetes mitocondrial sólo se desarrolla con el envejecimiento, con una edad media de aparición de 35 a 40 años para la diabetes de herencia materna y sordera (MIDD, por sus siglas en inglés) y de 48 años para 14577 T/C, una mutación de sentido erróneo ('missense') del ADN mitocondrial en diabetes de tipo 2 de herencia materna. Esto contrasta con la aparición en la infancia temprana de la diabetes en síndromes tales como la diabetes de la edad madura de inicio juvenil 2 (MODY2, por sus siglas en inglés), en la que una mutación en la glucoquinasa, la primera etapa de la glucólisis, resulta en una generación de ATP estimulada por glucosa y secreción de insulina atenuadas. Estos datos sugieren que la diabetes mitocondrial es más probable que resulte de un deterioro gradual del funcionamiento de las células β , y no de un deterioro funcional agudo debido a una producción insuficiente de ATP.

La función mitocondrial en los tejidos que participan en la patogénesis de la diabetes mellitus (hígado, músculo, tejido adiposo y células β pancreáticas) resulta crítica para múltiples aspectos del metabolismo celular. En cada uno de dichos tejidos, la actividad oxidativa mitocondrial debe ser apropiada para oxidar totalmente las cargas de nutrientes, en particular los ácidos grasos. El fracaso en la oxidación completa puede conducir a una acumulación de intermediarios lipídicos, productos de oxidación incompleta de los ácidos grasos y ROS, induciendo tanto resistencia a la insulina (músculo, hígado, tejido adiposo) como una secreción alterada (células β).

Las deficiencias leves de actividad mitocondrial y/o la incapacidad para incrementar la actividad y la capacidad en respuesta a la demanda de energía celular, podrían explicar la capacidad de ejercicio reducida observada en individuos con una historia familiar de diabetes mellitus. Con el tiempo, este fenotipo podría contribuir a una reducción del ejercicio voluntario y a un incremento de la probabilidad de desequilibrio entre la actividad mitocondrial y la carga de ácidos grasos. En segundo lugar, el desequilibrio crónico del metabolismo energético debido a una sobrealimentación, obesidad e inactividad podría contribuir directamente a una producción de ROS celular y mitocondrial incrementada. A su vez, un exceso de ROS puede inducir tanto resistencia a la insulina como disfunción mitocondrial. Por ejemplo, una dieta rica en grasas y en sacarosa en ratones C57BL6 con tendencia a diabetes causa alteraciones mitocondriales en paralelo con una producción potenciada de ROS y una sensibilidad alterada a la insulina. De manera similar, la exposición de las células musculares *in vitro* a ácidos grasos saturados o la alimentación

rica en grasas en ratones resulta en alteraciones de la estructura mitocondrial y resistencia a la insulina, ambos revertidos con antioxidantes. De esta manera, el estrés oxidativo puede inducir disfunción mitocondrial en paralelo con resistencia a la insulina, quizá una respuesta adaptativa destinada a limitar adicionalmente el daño oxidativo. Resulta importante que la resolución del estrés oxidativo puede revertir la resistencia a la insulina.

Rendimiento muscular

En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para potenciar el rendimiento muscular mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto, formulación o compuesto potenciador o activador de las mitocondrias. Por ejemplo, extractos que contienen elagitaninas o ácido elágico, o composiciones que contienen elagitaninas, ácido elágico o urolitinas, se comportan activando las mitocondrias y pueden resultar útiles para mejorar la resistencia física (p.ej., la capacidad de llevar a cabo una tarea física, tal como ejercicio, el trabajo físico, las actividades deportivas), inhibiendo o retrasando la fatiga física, potenciando los niveles sanguíneos de oxígeno, potenciando la energía en individuos sanos, potenciando la capacidad de trabajo y la resistencia, reduciendo la fatiga muscular, reduciendo el estrés, potenciando la función cardíaca y cardiovascular, mejorando la capacidad sexual, incrementando los niveles musculares de ATP y/o reduciendo el ácido láctico en la sangre. En determinadas realizaciones, los métodos implican administrar una cantidad de un extracto natural que contiene elagitanina o ácido elágico, o composiciones que contienen elagitaninas, ácido elágico o urolitina, que incrementa la actividad mitocondrial incrementa la biogénesis mitocondrial y/o incrementa la masa mitocondrial.

El rendimiento deportivo se refiere a la capacidad de los músculos de un atleta de funcionar durante la participación en actividades deportivas. El rendimiento deportivo, fuerza, velocidad y resistencia potenciados se miden mediante un incremento de la fuerza de contracción muscular, un incremento de la amplitud de la contracción muscular, o el acortamiento del tiempo de reacción muscular entre estimulación y contracción. El atleta se refiere a un individuo que participa en deportes a cualquier nivel y que busca alcanzar un nivel mejorado de fuerza, velocidad o resistencia en su rendimiento, tal como, por ejemplo, físico-culturistas, ciclistas, corredores de distancias largas y corredores de distancias cortas. El rendimiento deportivo potenciado se manifiesta en la capacidad de superar la fatiga muscular, la capacidad de mantener actividad durante periodos de tiempo más largos y un entrenamiento más eficaz.

Se contempla que las composiciones y métodos de la presente invención también resultarán eficaces en el tratamiento de condiciones patológicas relacionadas con los músculos, incluyendo miopatías, enfermedades neuromusculares, tales como la distrofia muscular de Duchenne, la sarcopenia aguda, por ejemplo, la atrofia muscular y/o la caquexia asociada a quemaduras, reposo en cama, inmovilización de extremidades, o cirugía torácica, abdominal y/o ortopédica mayor.

Estrés crónico

También se ha informado de que el estrés crónico presenta un efecto significativo sobre el rendimiento cognitivo y, más precisamente, sobre procesos de aprendizaje y memoria (Sandi, 2004; Sandi y Pinelo-Nava, 2007). Varios factores son determinantes del impacto que presentará el estrés crónico sobre la función cognitiva. Los niveles de estrés son importantes para determinar si el estrés servirá para facilitar la función cognitiva o resultará perjudicial. Se cree que, en respuesta a situaciones estresantes, el cuerpo induce hormonas de estrés, que producen un efecto de U invertida sobre el aprendizaje, la memoria y la plasticidad. Baldi et al., *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* 3(1) 9-21, 2005; Joels, *Trends Pharmacol. Sci.* 27(5):244-50, 2006). De esta manera, el nivel de estrés presenta un gran efecto sobre la función cognitiva, con niveles elevados de estrés que resultan en niveles elevados de hormonas de estrés y un rendimiento reducido.

La duración del estrés, crónico vs. agudo, también se ha demostrado que desempeña un papel importante, con diferentes efectos sobre la función cognitiva, así como la estructura y función cerebral (Sandi y Loscertales, 1999; Pinnock y Herbert, 2001). Además, el estrés actúa sobre el proceso de formación de la memoria, resultando en diferentes resultados: el estrés agudo facilita la consolidación (almacenamiento de memoria) e inhibe la recuperación (recuerdo de memoria) (Roozendaal, 2003). Además, la predecibilidad del estrés también desempeña un papel en la gravedad de los efectos observados sobre el rendimiento cognitivo (Maier y Watkins, 2005).

Además, el contexto en el que se produce el estrés crónico, así como las diferencias individuales en la respuesta al estrés inherente a los individuos y géneros, desempeñan un papel importante en la determinación del impacto cognitivo final del estrés crónico (Bowman, Beck et al., 2003; Shorts, 2004; Joels, Pu et al., 2006).

La base biológica de los efectos del estrés crónico todavía no ha sido bien definida. Sin embargo, una característica observada común es el papel clave de los glucocorticoides en la mediación tanto de la facilitación como la dificultación de las acciones del estrés, sobre diferentes procesos y etapas de la memoria. Aunque todavía no se ha aclarado cuál es el mecanismo de acción de los glucocorticoides, se ha demostrado *in vitro* que daña el crecimiento neuronal inducido por el factor de crecimiento nervioso (NGF). Unsicker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3498-502, 2009. Además, la estructura neuronal y el crecimiento de las neuritas inducido por factores tales como NGF, se correlaciona fuertemente con su actividad neuroprotectora, sugiriendo nuevamente que la estructura neuronal resulta importante para la cognición.

Estrés y remodelado estructural

Inicialmente, el hipocampo era la región cerebral que recibía más atención debido a los muchos informes que indicaban los efectos perjudiciales del estrés crónico en las tareas de memoria dependientes del hipocampo. Sin embargo, actualmente trabajos intensivos proporcionan pruebas de un impacto más integral del estrés crónico en todo el cerebro, informándose de cambios importantes en córtex prefrontal y amígdala. Los cambios en la ramificación dendrítica y sinaptogénesis que se producen en la amígdala son candidatos plausibles de participación en las alteraciones del humor inducidas por estrés. Además, se cree que cambios que se producen al nivel del hipocampo y el córtex prefrontal desempeñan un papel clave en las alteraciones del humor inducidas por estrés.

Hipocampo. El hipocampo es bien conocido por su papel crucial en procesos de la memoria. Las tareas dependientes del hipocampo generalmente resultan afectadas por manipulaciones tanto de estrés agudo como de estrés crónico. En el ser humano, estudios de neuroimagen han informado de atrofia hipocampal en asociación con alteraciones cognitivas y neuropsiquiátricas relacionadas con estrés y glucocorticoides, incluyendo la depresión.

En roedores, un efecto prominente y replicado muchas veces es una atrofia dendrítica en dendritas apicales de neuronas piramidales CA3. Esta ramificación dendrítica reducida se ha asociado a: (i) una reducción de la densidad sináptica de las sinápsis glutamatérgicas excitatorias, (ii) una reducción del volumen de espinas dendríticas complejas, denominadas excrescencias dendríticas que están localizadas en la dendrita apical proximal y soma de las células piramidales CA3 y que sirven como dianas postsinápticas para las entradas sinápticas de fibra musgosa, e (iii) una reorganización de las vesículas sinápticas y mitocondrias en las terminaciones de las fibras musgosas aferentes. A su vez, también se ha informado de evidencia de remodelado sináptico, en términos de cambios de las características sinápticas, en la región CA1 hipocampal.

Córtex prefrontal. El córtex prefrontal (CPF), y más particularmente su parte media (CPFm), desempeña papeles clave en procesos cognitivos superiores (incluyendo la función ejecutiva, la memoria de trabajo y la atención), así como en la integración de información cognitiva y emocionalmente relevante. Debe indicarse que el CPFm contiene niveles elevados de receptores de glucocorticoide y participa en la regulación de la actividad hipotalámica-pituitaria-adrenal (HPA) inducida por estrés. Tal como se ha indicado anteriormente, la evidencia clínica subraya el CPFm como una zona que experimenta alteraciones marcadas en una amplia diversidad de trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo la depresión.

Existe evidencia sustancial de estudios en roedores, de contracción dendrítica inducida por estrés en el CPF. En particular, se ha descrito que se produce un remodelado neuronal importante en la capa II/III del CPFm como consecuencia de la exposición repetida a estrés crónico o el tratamiento repetido de glucocorticoides. Los importantes cambios descritos en dicha zona son: (i) atrofia dendrítica, incluyendo tanto la reducción de la longitud total y número de dendritas apicales de neuronas piramidales, e (ii) reducción de la densidad de espinas dendríticas apicales (se pierde aproximadamente un tercio de todas las sinapsis axo-espinosas en dendritas apicales de las neuronas piramidales).

Efectos antidepresivos. El tratamiento con el antidepresivo atípico (tricíclico modificado) tianeptina se ha demostrado que revierte la atrofia dendrítica inducida por estrés crónico en neuronas piramidales CA3 en ratas. Además, también se ha informado de la facilitación por antidepresivos del brote axonal y dendrítico. Estos resultados sugieren que los antidepresivos pueden presentar un impacto importante sobre el remodelado neuronal, proporcionando la base para circuitos relevantes que deben reorganizarse durante el curso de la recuperación de la depresión.

Estrés en los primeros años

Se da a conocer además un método para tratar los efectos sobre el humor del estrés temprano. El método incluye la etapa de administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de urolitina o un precursor de la misma, para tratar los efectos del estrés temprano sobre el humor, la depresión, la ansiedad y el comportamiento de riesgo.

El estrés temprano se ha informado que presenta un efecto perjudicial significativo sobre el rendimiento cognitivo, incluyendo parámetros psicológicos, tales como tasas incrementadas o susceptibilidad a la depresión, ansiedad y comportamiento de riesgo anormal. Heim C., Nemeroff C.B., Biol. Psychiatry 49:1023-1039, 2001. Se ha informado de tasas incrementadas de trastorno de hiperactividad con déficit de atención (TDAH), trastorno de estrés post-traumático (TEPT) y depresión mayor en individuos que han experimentado estrés temprano. Famularo R. et al., J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry 31:863-867, 1992; Pelcovitz D. et al., J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry 33:305-312, 1994. Se cree que el estrés temprano presenta un impacto sobre el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). Ladd C.O. et al., Prog. Brain Res. 122:81-103, 2000. El efector clave que se cree que controla la hiperrespuesta del eje HPLA al estrés es el factor liberador de corticotrofina (CRF, por sus siglas en inglés) central.

El 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 (NPV) hipotalámico, un componente central del eje HPA. Con el

estrés, el CRF se libera de las terminaciones nerviosas de la eminencia mediana a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria y se transporta a la pituitaria anterior, donde se une a los receptores de CRF (CRF1 y CRF2). La unión de CRF al receptor CRF1 produce efectos que recuerdan al estrés, la depresión y la ansiedad. La unión del CRF al receptor CRF2 estimula la producción y liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que a su vez estimula la producción de glucocorticoides que participan en la respuesta de estrés.

En modelos de estrés temprano causado por la separación materna, se observa un nivel consistentemente elevado a largo plazo de ARNm del CRF. Plotsky P.M. et al., *Neuropsychopharmacology* 30:2192-2204, 2005. Dichos incrementos del CRF se ha demostrado que presentan efectos al nivel de la amígdala en el incremento de la respuesta de ansiedad. Se cree que una sensibilización persistente de los neurocircuitos del CRF es responsable de la ansiedad anormalmente elevada, depresión y comportamiento de riesgo observados en ratones expuestos a estrés temprano.

Estrategias actuales de utilización de antidepresivos para mejorar los trastornos psicológicos debidos al estrés temprano

Varios estudios han demostrado que los antidepresivos reducen la actividad de CRF en el eje HPA en roedores y primates, incluyendo seres humanos. Banki C.M. et al., *J. Affect Disord.* 25:39-45, 1992; Brady L.S. et al., *Brain Res.* 572:117-125, 1992; Brady L.S. et al., *J. Clin. Invest.* 87:831-837, 1992; De Bellis M.D. et al., *Am. J. Psychiatry* 150:656-657, 1993; Veith R.C. et al., *Psychiatry Res.* 46:1-8, 1993. Varias clases de fármacos antidepresivos aparentemente producen una reducción de la actividad de uno o más sistemas neurales de CRF. Entre ellos se incluyen inhibidores selectivos de recaptación de 5-HT (SSRI, por sus siglas en inglés), los cuales se ha demostrado que resultan eficaces en el tratamiento de varios trastornos psiquiátricos que se han asociado al estrés temprano (p.ej., depresión y TEPT). Hidalgo R.B. et al., *J. Psychopharmacol* 14:70-76, 2000. Notablemente, en un ensayo aleatorizado y controlado con placebo, los sujetos que habían sufrido estrés temprano y que sufrían de TEPT respondían a fluoxetina, van der Kolk B.A. et al., *J. Clin. Psychiatry* 55:517-522, 1994. Además, los SSRI, incluyendo la fluoxetina y la paroxetina, mostraban una eficacia significativa frente a placebo en el tratamiento de la depresión de aparición temprana en niños y adolescentes. Martin A. et al., *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 9:135-157, 2000. También se ha encontrado que los antidepresivos tricíclicos revierten una reactividad incrementada del eje HPA al estrés en primates adultos expuestos a la privación materna. Suomi S.J., *Ciba Found Symp.* 156:171-183, 1991. Aparentemente varios fármacos disponibles, incluyendo los SSRI, podrían resultar beneficiosos en el tratamiento de niños y adultos expuestos a estrés temprano. Fisher P.A. et al., *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 39:1356-1364, 2000.

Indicaciones adicionales

Se da a conocer además la utilización en el tratamiento de cualquiera de una diversidad de enfermedades y condiciones adicionales en las que una actividad mitocondrial defectuosa o disminuida participa en la fisiopatología de la enfermedad o condición, o en la que una función mitocondrial incrementada rendirá un efecto beneficioso deseado. A título de ejemplo, la invención incluye además métodos y compuestos que pueden utilizarse para tratar la infertilidad masculina asociada a una motilidad espermática disminuida. Nakada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15148-53, 2009. A título de otro ejemplo, la invención incluye además métodos y compuestos que pueden utilizarse para tratar la degeneración macular y otros trastornos oculares relacionados con la edad y hereditarios. Khandhadia et al., *Expert Rev. Mol. Med.* 12:E34, 2010; Jarrett et al., *Ophthalmic Res.* 44:179-90, 2009. Otro ejemplo es un método de tratamiento de la pérdida de audición, incluyendo, aunque sin limitación, la pérdida de audición relacionada con la edad. En cada una de estas indicaciones y otras, el método implica administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento, una cantidad eficaz de una urolitina o precursor de la misma, tal como se da a conocer en la presente memoria, para tratar la indicación.

Formulaciones y utilización clínica

Un "sujeto", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un vertebrado vivo. En una realización, un sujeto es un mamífero. En una realización, un sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratar" tal como se utiliza en relación a una enfermedad, trastorno o condición de un sujeto, se refiere a reducir en una cantidad detectable por lo menos una manifestación clínica u objetiva de la enfermedad, trastorno o condición de un sujeto. En una realización, el término "tratar" utilizado en relación a una enfermedad, trastorno o condición de un sujeto, se refiere a curar la enfermedad, trastorno o condición de un sujeto.

La urolitina o precursor de la misma puede administrarse, sola o junto con otro agente, en un sujeto (p.ej., mamífero) de una diversidad de maneras. Por ejemplo, la urolitina o precursor de la misma puede administrarse por vía oral o parenteral. La vía parenteral incluye, aunque sin limitación, las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intraocular, intratecal, tópica o mediante inhalación. De esta manera, la forma de la dosis de urolitina o precursor de la misma puede ser de una diversidad de formas, incluyendo alimentos naturales, alimentos procesados, zumos naturales, concentrados y extractos, soluciones inyectables, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, apósitos, formas de inhalación, sprays nasales, gotas nasales, gotas oculares, tabletas sublinguales y preparaciones de liberación sostenida.

Los compuestos de la presente invención pueden proporcionarse en forma aislada. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aislado” se refiere a sustancialmente separado de otros compuestos o componentes con los que de otro modo se encuentra el compuesto de interés, por ejemplo tal como se encuentra en la naturaleza. En una realización, un compuesto se aísla en el caso de que se encuentra esencialmente separado de otros compuestos o componentes con los que de otro modo puede encontrarse el compuesto de interés. En una realización, se aísla un componente en el caso de que se encuentre en estado puro.

Los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en una diversidad de formulaciones para la administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas: mediante combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. De esta manera, la administración de los compuestos puede llevarse a cabo de diversas maneras, incluyendo la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica e intratraqueal. El agente activo puede ser sistémico tras la administración o puede localizarse mediante la utilización de administración regional, administración intramural o la utilización de un implante que actúa reteniendo la dosis activa en el sitio de implantación.

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

En formas de administración farmacéutica, los compuestos pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. También pueden utilizarse en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los métodos y excipientes siguientes son meramente ejemplares y no son limitativos en modo alguno.

Para las preparaciones orales, los compuestos pueden utilizarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar tabletas, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con ligantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegrantes, 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 tamponadores, agentes humectantes, conservantes y agentes saborizantes.

Los compuestos pueden formularse en preparaciones para inyecciones mediante disolución, suspensión o emulsionado de los mismos en un solvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol, y si se desea, con aditivos convencionales, tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

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

Además, los compuestos pueden prepararse en supositorios mediante la mezcla con una diversidad de bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilenglicoles, que se funden a la temperatura corporal, pero que se solidifican a temperatura ambiente.

Pueden proporcionarse formas de administración unitaria para la administración oral o rectal, tales como jarabes, elixires y suspensiones, en las que cada dosis unitaria, por ejemplo, cucharada pequeña, cucharada sopera, tableta o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención. De manera similar, las formas de administración unitaria para la administración mediante inyección o intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición en forma de una solución en agua estéril, solución salina normal u otro portador farmacéuticamente aceptable, en el que cada dosis unitaria, por ejemplo, ml o l, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención.

Los implantes para formulaciones de liberación sostenida son bien conocidos de la técnica. Los implantes se formulan como microesferas, losetas, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que resulta bien tolerado por el huésped. El implante que contiene los compuestos inhibidores puede situarse en proximidad a un sitio de interés, de manera que se incrementa la concentración local del agente activo respecto al resto del cuerpo.

La expresión “forma de dosis unitaria”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis 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, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosis unitaria de la presente invención dependen del compuesto particular utilizado y del efecto que debe conseguirse, y la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el huésped.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, se encuentran fácilmente disponibles para el público. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como ajustadores del pH y agentes tamponadores, agentes ajustadores de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, se encuentran fácilmente disponibles para el público.

Para la utilización clínica, la urolitina o precursor de la misma se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que resulta suficiente para producir un efecto biológico deseado. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir, en una única dosis o en múltiples dosis, un efecto terapéutico deseado. El experto en la materia podrá determinar las cantidades terapéuticamente eficaces basándose en estudios *in vitro* preclínicos o clínicos, o cualquier combinación de los mismos.

La administración generalmente será diaria a semanal. En una realización, la administración es por lo 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 administración es por lo menos diaria. Por ejemplo, el sujeto puede recibir una o más dosis diarias.

Para la utilización clínica, generalmente se administrará una urolitina en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,2 y 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto. En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 2 a 120 mg de urolitina por kg del sujeto. En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 4 a 90 mg de urolitina por kg del sujeto. En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 8 a 30 mg de urolitina por kg del sujeto. En el caso en que deba administrarse un precursor de urolitina y no una urolitina, se administra en una cantidad que es equivalente a las cantidades anteriormente indicadas de urolitina.

Puede administrarse cualquier dosis dada en forma de una sola dosis o en forma de dosis divididas.

En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 0,001 micromolar (μM). En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 0,01 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 0,1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 5 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel máximo sérico de por lo menos 10 μM .

En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 0,001 micromolar (μM). En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 0,01 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 0,1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 1 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 5 μM . En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para conseguir un nivel sérico sostenido de por lo menos 10 μM . El nivel sérico sostenido puede medirse utilizando cualquier método adecuado, por ejemplo cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o HPLC-EM.

En una realización, la urolitina o precursor de la misma se administra en forma de zumo de granada en una cantidad de 25 ml a 5 l, o una dosis equivalente de elagitaninas, ácido elágico, urolitinas o cualquier combinación de los mismos. La Tabla 4 muestra el consumo de diferentes compuestos de la granada para diferentes niveles de zumo de granada. El intervalo cubre diferencias de concentración de compuesto en diferentes variedades de granada. Para los cálculos de equivalentes de ácido elágico, se asume que el metabolismo de cada mol de punicalagina resultaba en la liberación de 1 mol de ácido elágico, y que esta conversión se producía con una eficiencia de 100%. Se determinaron los niveles de urolitina asumiendo que todo el ácido elágico presente, incluyendo el derivado de la punicalagina, se convertía en urolitina con una eficiencia de 100%. No se consideraron otras fuentes de ácido elágico aparte de la punicalagina y el ácido elágico.

Tabla 4.

Equivalente de zumo (ml)	Punicalagina (mg/d)	Ácido elágico (mg/d)	Equivalentes de ácido elágico (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

En una realización, el sujeto no recibe una urolitina o precursor de la misma para ningún propósito aparte del tratamiento de una condición de acuerdo con los métodos de la invención. En una realización, el sujeto no recibe una urolitina o precursor de la misma para el tratamiento de aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección o inflamación.

Ejemplos

La invención que ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente en referencia a los ejemplos a continuación que se incluyen meramente con fines ilustrativos de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención y que no pretenden ser limitativos de la misma.

Ejemplo 1

Preparación de extractos funcionales a partir de compuestos de la granada

Los extractos de granada indicados en la presente solicitud que contiene moléculas específicas se prepararon utilizando un procedimiento de extracción basado en la adsorción de polifenoles en una columna estándar basada en la adsorción del polímero, tal como se describe. Para la preparación de los extractos 31008 y 1108 derivados de zumo de granada, se exprimieron granadas utilizando un procedimiento estándar de exprimido y fabricación y se adsorbieron en una resina cromatográfica polimérica en forma de zumo puro. Se empaquetó la resina Amberlite XAD-16 (Rohm & Haas) en columnas semipreparativas y se cargó con el zumo exprimido. La columna se lavó con agua para eliminar los azúcares hasta completar la eliminación (niveles de Brix inferiores a 0,1%). Los polifenoles se eluyeron con etanol al 100%. El etanol remanente se evaporó bajo vacío, produciendo un extracto concentrado que contenía 4,5 g de polifenoles totales por litro según se determinó utilizando el ensayo de Folin para el contenido total de polifenoles. Se preparó extracto 1011 de una manera similar al extracto 31008 y 1108, pero el extracto líquido a continuación se secó mediante pulverización utilizando un secador por pulverización para producir un extracto final de polvos. Mediante HPLC-EM para la identificación de compuestos, se encontró que los extractos 31008, 1108 y 1011 contenían las moléculas punicalagina, punicalina, telimagrandina pedunculagina.

El extracto 71109 derivado de la cáscara de granada se preparó separando manualmente la cáscara de la pulpa de los arilos de la granada, seguido del exprimido con una exprimidora manual de frutas. Para extraer la cantidad máxima de polifenoles, la torta/orujo de partes de granada exprimida se maceraron en agua consecutivamente durante varios periodos de tiempo (5 minutos), a fin de incrementar la eficiencia de extracción. La solución de granada extraída se clarificó mediante centrifugación antes de adsorberla en la resina polimérica cromatográfica Amberlite XAD-16 (Rohm & Haas), empaquetada en columna semipreparativas, y se cargó con el agua extraída de la cáscara de la granada. La columna se lavó con agua para eliminar los azúcares hasta completar la eliminación (niveles de Brix inferiores a 0,1%). Los polifenoles se eluyeron con etanol al 100%. El etanol remanente se evaporó bajo vacío, produciendo un extracto concentrado que contenía 17,1 g de polifenoles totales por litro según se determinó utilizando el ensayo de Folin para el contenido total de polifenoles. Dicha técnica es una modificación de métodos conocidos de la técnica tal como se describe en varios métodos publicados de purificación de polifenoles de diversas plantas y bayas. Tuck, K. L. y P. J. Hayball, "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects", J. Nutr. Biochem. 13(11):636-644, 2002, y Schieber, A., P. Hilt, et al. "A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace", Innovative Food Sci. Emerging Technol. 4:99-107, 2009.

Para la preparación del extracto 61109, se fraccionó un extracto acuoso de la granada utilizando la cromatografía de reparto centrífugo. Las fracciones aisladas se liofilizaron, produciendo el extracto 61109, altamente enriquecido en punicalagina (>90%).

Purificación de punicalaginaPreparación de extracto

- 5 El extracto de granada se disolvió en 16 ml de la mezcla de fases orgánica/acuosa (1:1) y se filtró por un filtro de Teflon (0,45 µm).

Separación de punicalagina a partir de extracto utilizando cromatografía de reparto centrífugo

- 10 La separación de la punicalagina a partir del extracto de granada se llevó a cabo utilizando la cromatografía de reparto centrífugo (CRC). El aparato de CRC era un aparato FCPC® 1000 proporcionado por Kromaton Technologies (Angers, Francia) dotado de un rotor de 1000 ml de capacidad. Los solventes se bombearon con una bomba de gradiente de alta presión binaria de 4 vías. Las muestras se introdujeron en la columna de CRC mediante una válvula de inyección a alta presión (Rheodyne) dotada de un asa para muestras de 20 ml. Se monitorizó el efluente con un detector de matriz de diodos (DMD) dotado de una celda de flujo preparativa. Las fracciones se recogieron mediante un recolector de fracciones. Las etapas de separación se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

- 20 Para llevar a cabo la extracción, la fase estacionaria en primer lugar se introdujo en la columna en el modo ascendente sin rotación y a continuación se bombeó la fase móvil por la fase estacionaria hasta alcanzar un estadio de equilibrio. A continuación, se incrementó la velocidad de rotación de 0 a 1.000 rpm y se bombeó la fase móvil en la columna a un caudal de 20 ml/min. Tras la inyección de 10 g de extracto de granada, se recogieron cada minuto fracciones de 20 ml. Se monitorizó el contenido de la fase orgánica saliente a partir de la medición de la absorbancia de UV en línea a $\lambda = 260$ nm.

- 25 Se utilizó un procedimiento de elución-extrusión para recuperar todos los compuestos de la columna: tras una elución clásica de 100 min, se sustituyó la fase móvil por la fase estacionaria utilizada como líquido móvil, hasta que todo el volumen contenido (1.000 ml) fuese expulsado de la columna. Se obtuvo una fracción que contenía punicalaginas (mezcla de isómeros A y B) con una pureza cromatográfica de 94-97% entre los 51 y 63 minutos de elución, y se obtuvo una segunda fracción con una pureza cromatográfica de 85-88% entre los 64 y 79 min.

- 30 Con el fin de determinar el nivel de purificación, se examinó la muestra purificada mediante HPLC-DMD a una longitud de onda para la detección de 260 nm. La pasó la muestra por una columna Prosontil C18, 5 µm, 250 x 4 mm. Los solventes utilizados fueron H₂O mQ +9,1% TFA/acetonitrilo + TFA al 0,1% a un caudal de 1 ml/min.

Ejemplo 2Ensayos de cribado in vitro para compuestos que estimulan la potenciación de la expresión de genes mitocondriales en una línea celular de músculo esquelético prototípica (miotubos C2C12)

- 40 Los músculos esqueléticos tienen un papel clave en la regulación de la homeostasis metabólica, ya que participan en funciones metabólicas, tales como el gasto energético y el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina. Estas funciones están estrechamente relacionadas con la actividad mitocondrial, y el deterioro de la función mitocondrial presenta un papel causal en la homeostasia metabólica defectuosa y el desarrollo de trastornos metabólicos, tales como la diabetes de tipo 2, la obesidad y la dislipemia. El perfil de expresión génica de los genes participantes en la actividad mitocondrial en células C2C12 diferenciadas (miotubos) es un modelo apropiado para evaluar el impacto de los compuestos sobre la actividad mitocondrial mediante la evaluación de numerosas rutas que reflejan la actividad mitocondrial, p.ej., la biogénesis mitocondrial, la glucólisis, la β -oxidación de los ácidos grasos, la cadena de transporte electrónico (CTE) y la dinámica mitocondrial.

- 50 Para evaluar los efectos de los compuestos sobre la expresión de genes mitocondriales, se diferenciaron mioblastos C2C12 en miotubos mediante privación de suero durante 4 días (Canto et al., Nature 458:1056-60, 2009). Los miotubos se incubaron durante 48 h con ácido elágico o urolitina A a una concentración final de 1, 10 o 50 µM (todos disueltos en DMSO, concentración final: 0,1%). Se utilizó DMSO como control (concentración final: 0,1%). Al final del tratamiento, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y se extrajo inmediatamente ARNm según las instrucciones del fabricante (reactivo Trizol, Invitrogen) mediante la adición de 1 ml de reactivo Trizol. Tras la extracción, se produjeron ADNc mediante transcripción inversa siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 60 La evaluación de los niveles de expresión de genes (PGC-1 α , Tfam, PFKFB3, CPT1b, MCAD, LCAD, Ndufa2, Cyt c y Mfn2) que controlan la función mitocondrial se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Watanabe et al., J. Clin. Invest. 113:1408-18, 2004) mediante la utilización del juego siguiente de cebadores (Fwd: cebador directo; Rev: cebador inverso):

PGC-1 α :	(Fwd)	AAGTGTGGAAGCTCTCTGGAAGCTG (SEC ID nº 1)
	(Rev)	GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG (SEC ID nº 2)

Tfam:	(Fwd)	AAGTGTITTTTCCAGCATGGG (SEC ID nº 3)
	(Rev)	GGCTGCAATTTTCCTAACCA (SEC ID nº 4)
PFKFB3:	(Fwd)	TCATGGAATAGAGCGCC (SEC ID nº 5)
	(Rev)	GTGTGCTCACCGATTCTACA (SEC ID nº 6)
CPT1b:	(Fwd)	CCCATGTGCTCCTACCAGAT (SEC ID nº 7)
	(Rev)	CCTTGAAGAAGCGACCTTTG (SEC ID nº 8)
MCAD:	(Fwd)	GATCGCAATGGGTGCTTTTGATAGAA (SEC ID nº 9)
	(Rev)	AGCTGATTGGCAATGTCTCCAGCAAA (SEC ID nº 10)
LCAD:	(Fwd)	GTAGCTTATGAATGTGTGCAACTC (SEC ID nº 11)
	(Rev)	GTCTTGCGATCAGCTCTTTCATTA (SEC ID nº 12)
Ndufa2:	(Fwd)	GCACACATTTCCTCCACTG (SEC ID nº 13)
	(Rev)	CCCAACCTGCCATTCTGAT (SEC ID nº 14)
Cyt c:	(Fwd)	TCCATCAGGGTATCCTCTCC (SEC ID nº 15)
	(Rev)	GGAGGCAAGCATAAGACTGG (SEC ID nº 16)
Mfn2:	(Fwd)	ACGTCAAAGGGTACCTGTCCA (SEC ID nº 17)
	(Rev)	CAATCCCAGATGGCAGAACTT (SEC ID nº 18)

PGC-1 α (PPAR γ -corregulador 1 α) y Tfam (factor A de transcripción mitocondrial) son reguladores maestros de la función mitocondrial, es decir, biogénesis mitocondrial y oxidación fosforilativa mitocondrial (mOXPHOS). Un incremento de sus niveles de expresión revela una potenciación global de la actividad mitocondrial. La evaluación de otros genes diana implicados en funciones clave de las mitocondrias permite identificar las rutas potenciadas. PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3) es un enzima clave de la glucólisis, es decir, la utilización de glucosa para producir energía. Bajo condiciones aerobias (es decir, en caso de existir un suministro de oxígeno), el piruvato producido a partir de la glucosa mediante glucólisis es utilizado por las mitocondrias para producir energía (ATP) mediante el ciclo de Krebs. CPT1b (carnitín O-palmitoiltransferasa 1b), MCAD (acil-CoA deshidrogenasa de cadena intermedia) y LCAD (acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga) desempeña un papel crucial en la asimilación de ácidos grasos mitocondriales y la β -oxidación, dos etapas críticas para la producción de energía a partir de ácidos grasos. Ndufa2 (subunidad 2 de subcomplejo de NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 α) y Cyt c (citocromo c) son subunidades de los complejos I y IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, respectivamente. Estas proteínas presentan un papel esencial en la cadena respiratoria mitocondrial y en la producción de energía a partir de equivalentes reducidos producidos mediante el ciclo de Krebs. Mfn2 (mitofusina 2) participa en la dinámica mitocondrial y en el proceso de fusión. Su expresión se incrementa en el contexto del remodelado mitocondrial incrementado y/o biogénesis mitocondrial (número incrementado de mitocondrias en cada célula).

Los datos ilustrados en la fig. 3 indican claramente que el ácido elágico y la urolitina A incrementan la actividad mitocondrial de una manera dependiente de la dosis mediante modulación de la expresión de numerosos genes que participan en varias rutas de metabolismo mitocondrial.

Ejemplo 3

Ensayo de cribado in vitro para compuestos que estimulan la potenciación de la actividad mitocondrial en una línea celular de músculo esquelético prototípica (miotubos C2C12)

La citrato sintasa es el enzima inicial del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) y la etapa limitadora de tasa para la entrada en el ciclo de ATC. El ciclo de ATC producirá NADH₂ y FADH₂, que después se utilizan para alimentar la cadena de transporte electrónico que generará un gradiente de protones (energía), que se utilizará en la generación de ATP. De esta manera, la citrato sintasa es un marcador exclusivo del número de mitocondrias y de la actividad mitocondrial. Mediante la medición de los efectos de los compuestos o formulaciones sobre la actividad del enzima citrato sintasa, resulta posible evaluar la capacidad de los compuestos de estimular la actividad mitocondrial (es decir, OXPHOS y producción de ATP).

El enzima citrato sintasa cataliza la reacción entre acetil-coenzima A (acetil-CoA) y ácido oxalacético para formar ácido cítrico. El acetil-CoA contribuye 2 carbonos a los 4 carbonos del oxalacetato, resultando en citrato con 6 carbonos. La hidrólisis del tioéster de acetil-CoA resulta en la formación de CoA con un grupo tiol (CoA-SH). La actividad de la citrato sintasa se mide mediante la reacción entre el tiol de CoA-SH con el DTNB en la mezcla, formando ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB, por sus siglas en inglés). Este producto amarillo (TNB) se observa espectrofotométricamente mediante la medición de la absorbancia a 412 nm (kit de ensayo de citrato sintasa, número de cat. CS0720, Sigma Aldrich).

Los mioblastos C12C12 se diferenciaron en miotubos mediante privación de suero durante 4 días (Canto et al., Nature 458:1056-60, 2009). Se incubaron los miotubos durante 48 h con punicalagina a una concentración final de 1 o 10 μM o con ácido elágico o urolitina a una concentración final de 1, 10 o 50 μM (todos disueltos en DMSO, concentración final: 0,1%). Se utilizó DMSO como control (concentración final: 0,1%). Al final del tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron a ensayo para actividad de citrato sintasa siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de ensayo de citrato sintasa, número de cat. CS0720, Sigma Aldrich).

Tal como se ilustra en la fig. 4, la punicalagina, el ácido elágico y la urolitina incrementa la actividad de citrato sintasa de una manera dependiente de la dosis, ilustrando un incremento global de la actividad mitocondrial y/o de la densidad mitocondrial (número de mitocondrias por célula). Estos resultados confirman los resultados obtenidos mediante perfilado de expresión génica de genes mitocondriales (Ejemplo 1), que muestra una potenciación de la actividad mitocondrial y de la biogénesis mitocondrial en C2C12 diferenciado tratado. Estadísticas: ANOVA unidireccional * $p < 0,05$

Ejemplo 4

Ensayo de cribado in vitro para compuestos que estimulan la actividad de proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en una línea celular de músculo esquelético prototípica (miotubos C2C12)

AMPK actúa como interruptor maestro metabólico que regula varios sistemas intracelulares, incluyendo la asimilación celular de glucosa, la β -oxidación de ácidos grasos y la biogénesis del transportador 4 de glucosa (GLUT4) y de mitocondrias. La capacidad de detección de energía de la AMPK puede atribuirse a su capacidad de detectar y reaccionar a las fluctuaciones en la proporción AMP:ATP que tienen lugar durante el descanso y el ejercicio (estimulación muscular). A título de ejemplo, durante una sesión de ejercicio, se incrementa la actividad de AMPK (fosforilación de AMPK, P-AMPK), mientras que la célula muscular experimenta estrés metabólico producido por una demanda celular extrema de ATP. Con la activación (fosforilación de AMPK, P-AMPK), la AMPK incrementa los niveles de energía celulares mediante la inhibición de las rutas consumidoras de energía anabólicas (síntesis de ácidos grasos, síntesis de proteínas, etc.) y la estimulación de rutas catabólicas, productoras de energía (oxidación de ácidos grasos, transporte de glucosa, etc.). En consecuencia, la activación de AMPK conduce a una potenciación de la función mitocondrial, incluyendo OXPHOS y biogénesis mitocondrial incrementadas.

Los mioblastos C12C12 se diferenciaron en miotubos mediante privación de suero durante 4 días (Canto et al., Nature 458:1056-60, 2009). Se incubaron los miotubos durante 1 h con resveratrol (RSV), que sirvió como control positivo, o ácido elágico (EA) o urolitina A (UL) a una concentración final de 50 μM (todos disueltos en DMSO, concentración final: 0,1%). Se utilizó DMSO como 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 western. Tras el tratamiento con compuesto, se lisaron las células C2C12 en tampón que contenía inhibidores de fosfatasa y se determinó la concentración de proteína utilizando un ensayo de Bradford estándar. Se utilizó el equivalente a 25 μg de proteína para la separación en un gel de SDS-PAGE al 10% y posteriormente se transfirieron mediante procedimientos estándares de transferencia western. Se utilizaron para la detección anticuerpos dirigidos a AMPK (Cell Signaling) y AMPK fosforilado (P-AMPK, Cell Signaling).

Tal como se ilustra en la fig. 5, el análisis de transferencia western para la forma fosforilada, y de esta manera la forma activada, de AMPK, es decir, P-AMPK, indicaba que los niveles de fosforilación de AMPK (P-AMPK) y por lo tanto la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en efecto se encontraba incrementada en las células tratadas con ácido elágico o urolitina respecto a las células tratadas de control. Estos datos indican que el ácido elágico y la urolitina A son ambos activadores de AMPK. Esto apoya adicionalmente las observaciones de que el ácido elágico y las urolitinas inducen un incremento de la función mitocondrial.

Ejemplo 5

Ensayo de cribado para compuestos que estimulan el crecimiento de las neuritas en células PC-12

Se ha demostrado que el crecimiento de las neuritas y el número de procesos medio por célula en cultivo neuronal corresponden a la función neuronal. Se ha demostrado que el estrés crónico resulta en reducciones tanto de la longitud dendrítica como el número de ramificaciones, un efecto que se revierte tras retirar el estrés. Además, se ha demostrado que esta reversibilidad resulta inhibida por el envejecimiento (Bloss, Janssen et al., 2010). También existe evidencia adicional de que el aprendizaje y las nuevas experiencias sensoriales se asocian a incrementos en la formación de espinas y en la eliminación de procesos prolongados. Por lo tanto, la plasticidad estructural de las sinapsis desempeña un papel importante en el aprendizaje y la memoria (Yang, Pan et al., 2009). En efecto, el nivel de crecimiento de las neuritas y el número de procesos inducido por compuestos tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF) se correlaciona fuertemente con sus capacidades neuroprotectoras. Con el envejecimiento, esta plasticidad sináptica queda comprometida y se produce una mayor pérdida de espinas y una densidad disminuida de sinapsis (Dumitriu, Hao et al., 2010). Las enfermedades neurodegenerativas también presentan un efecto sobre el crecimiento de las neuritas. El péptido A-beta ($\text{A}\beta$), que desempeña un papel importante en la enfermedad de Alzheimer, inhibe el

crecimiento de las neuritas en células de neuroblastoma de ratón. Por lo tanto, mediante el ensayo de los efectos sobre el crecimiento de neuritas *in vitro*, pueden identificarse compuestos y formulaciones con efectos neuroprotectores de las neuronas bajo estrés crónico, neuronas que están envejeciendo y neuronas presentes en enfermedades neurodegenerativas.

Los efectos *in vitro* sobre el crecimiento de las neuritas de las diferentes elagitaninas y sus metabolitos punicalagina (PA), punicalina (PB), telimagrandina (TL), ácido elágico (EA) y urolitina (UA) se sometieron a ensayo en células de una línea celular de feocromocitoma de rata noradrenérgica (células PC-12), las cuales se ha demostrado que se diferencian en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Greene y Tischler, 1976). Se ha demostrado que el crecimiento neurítico en dichas células PC-12 diferenciadas resulta fuertemente estimulado por el dibutilil-AMP cíclico (dbAMPc) (Gunning, Landreth et al., 1981) y se utilizó este compuesto como un control positivo. Como control negativo, se utilizó el inhibidor de quinasa Janus N-terminal (JNK, por sus siglas en inglés) específica SP600125, que se ha demostrado que reduce los diferentes parámetros del crecimiento de las neuritas (Xiao, Pradhan et al., 2006). Se sintetizaron las elagitaninas y sus metabolitos sometidos a ensayo en los ensayos o se adquirieron de proveedores, incluyendo Funakoshi, Sigma y Chemos. Se dividieron en alícuotas las soluciones madre y se almacenaron a -20°C.

Se cultivaron células PC-12 (ATCC nº CRL-1721) a 37°C, con 5% de CO₂, en matraces de cultivo recubiertos con poli-L-lisina en medio de cultivo completo (RPMI 1640 + suero de caballo inactivado por calor al 10% + suero de feto bovino al 5%).

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

Todos los compuestos que debían someterse a ensayo se prepararon inmediatamente antes del experimento en forma de una solución madre 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final del DMSO era de 0,1% en el medio de todos los grupos experimentales.

Para las mediciones del crecimiento de las neuritas, se lavaron las células diferenciadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se recogieron después de desprenderlas y se sembraron nuevamente en una placa a una densidad de 5.000 células/pocillo (placa de 96 pocillo de obtención de imágenes Biocoat) en medio completo complementado con 100 ng/ml de NGF, con o sin SP600125 10 µM (control negativo), dbAMPc 1 mM (control positivo) o compuesto sometido a ensayo a una concentración de 5x10⁻⁷ M. En el grupo de control no diferenciado, no se añadió NGF después de la nueva siembra.

Tras 72 h de cultivo, se lavaron las células PC-12 con PBS y se fijaron en solución de paraformaldehído al 1% durante 20 minutos. Tras 3 lavados con PBS, se llevó a cabo el marcaje inmunofluorescente con sonda de rojo Texas-maleimida, que reacciona con grupos tiol de los residuos cisteína de las proteínas, permitiendo la visualización de la morfología celular completa, incluyendo las neuritas.

Se llevó a cabo el análisis de inmunofluorescencia en microscopía confocal automatizada. Las imágenes se capturaron con un sistema BD Pathway 855, bajo un objetivo de x20 con montaje de 8x8 campos. A continuación, se midió el crecimiento de las neuritas a partir de las imágenes captadas con el módulo de neuritas del software Metamorph®. Se analizó el crecimiento total y medio, el número total y medio de procesos en cada célula, y el número total y porcentaje de células con crecimiento extensivo (definido como crecimiento más largo de 20 µm).

Todos los compuestos, excepto PA y PB, incrementaron el número de células PC-12 en los pocillos >30%, tal como se muestra en la fig. 6, indicando un efecto trófico de dichos compuestos a una concentración de 0,5 µM (p<0,001 para UA, AE y TL frente al control (ctrl) diferenciado).

Estimulación del crecimiento de las neuritas

Tal como se muestra en la FIG. 7 y en la fig. 8, todos los compuestos sometidos a ensayo (PA, PB, TL, AE y UA) fueron capaces de inducir un crecimiento robusto de las neuritas a partir de las células PC-12 diferenciadas. El crecimiento medio (fig. 7) mostró un incremento >30% respecto al control diferenciado para todos los compuestos sometidos a ensayo. El porcentaje de células que mostró un crecimiento significativo (fig. 8) era significativamente superior al observado para las células diferenciadas para todos los compuestos sometidos a ensayo (p<0,05 para UA y PB (incremento de 26%), p<0,01 para PA (incremento >26%), p<0,001 para AE y TL (incremento >37%)).

Estimulación de la formación de procesos y ramificaciones

Los compuestos PA, PB, UA, AE y TL, indujeron todos ellos un incremento del número de procesos al aplicarlos en células PC-12 diferenciadas. Los compuestos (UA, p<0,05 (incremento de 15,7%), PA, p<0,01 (incremento de 26,3%); AE y TL, p<0,001 (incremento >31%)) resultaron tan eficaces o más eficaces que el dbAMPc, el control positivo, en la estimulación de la formación de procesos (fig. 9).

La ramificación de las neuritas fue significativamente más elevada que la observada en el control diferenciado, induciendo la mayoría de compuestos un incremento de dos veces de la ramificación.

5 Ejemplo 6

Ensayo de cribado para compuestos que estimulan el crecimiento de las neuritas en neuronas dopaminérgicas primarias positivas para TH

10 Las neuronas primarias, debido a su estado no transformado, sirven como un buen modelo *in vitro* para los efectos de compuestos sobre los marcadores de plasticidad y diferenciación neuronal, tal como el crecimiento neuronal y la formación de dendritas y procesos. Se examinaron los efectos de los diferentes metabolitos de elagitanina, punicalagina (PA), urolitina (UA), ácido elágico (AE) y telimagrandina (TL) sobre este procedimiento. Los compuestos sometidos a ensayo en los ensayos se adquirieron de proveedores, incluyendo Funakoshi y Sigma, o se sintetizaron químicamente. Se dividieron en alícuotas las soluciones madre y se almacenaron a -20°C.

Se prepararon cultivos mesencefálicos primarios a partir de embriones E14 de rata. Se diseccionó y disoció cuidadosamente la zona ventral del mesencéfalo. A continuación, se sembraron células en medio DMEM F12 que contenía suero de caballo inactivado por calor al 10% a una densidad de 100.000 células/pocillo (placa de 96 pocillos), con o sin el inhibidor específico de JNK, SP600125 (10 µM) (que sirvió de control negativo) o dbAMPc (1 mM) (que sirvió de control positivo), o los compuestos sometidos a ensayo, cada uno a una dosis de 0,1 µM.

72 h después de la siembra en placa, se midieron los efectos sobre el crecimiento de las neuritas de neuronas positivas para tirosina hidroxilasa (TH) dopaminérgica, a partir de imágenes captadas mediante microscopía confocal automatizada (objetivo x4, montaje de 4x4) y que cubrían toda la superficie del pocillo, y se cuantificaron utilizando el módulo de crecimiento de neuritas del software Metamorph®. De esta manera, se generaron varios parámetros representativos del crecimiento de las neuritas: crecimiento total y medio, número total y medio de procesos por cada célula, y número total y porcentaje de células con crecimiento extensivo (definido como un crecimiento más largo de 20 µm). Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

Estimulación del crecimiento de las neuritas

Tal como se muestra en las figs. 10 a 16, los compuestos seleccionados en el ensayo de cribado de PC-12 anterior también fueron capaces de inducir el crecimiento de neuritas en neuronas mesencefálicas primarias a una concentración de 0,1 µM. La mayoría de compuestos fue tan eficaz como el dbAMPc en la estimulación del crecimiento por cada célula (incremento >25% del crecimiento) según medición del crecimiento medio por células mostrado en la fig. 10 ($p < 0,001$ para UA, GA, AE, TL vs control). Todos los compuestos sometidos a ensayo funcionaron bien o mejor que el dbAMPc (fig. 11).

Incremento de los procesos neuríticos y ramificaciones

Todos los compuestos sometidos a ensayo mostraron incrementos significativos de los procesos medios por célula (>10%) (fig. 12), así como de la longitud de proceso máxima (>10%) (fig. 13).

45 Las células primarias mostraron un incremento de las ramificaciones en presencia del control positivo (dbAMPc). Sin embargo, el inhibidor de JNK SP600125 no inhibió la ramificación de las células primarias, tal como en las células PC-12, pero fue capaz de estimular la ramificación, aunque no al mismo nivel que dbAMPc (60% vs. 86% de incremento observado para dbAMPc). Los compuestos UA, AE y TL fueron capaces de estimular la ramificación a los mismos niveles que dbAMPc (>111% de incremento de la ramificación, fig. 14).

Incremento de las dendritas por célula y de la longitud de las dendritas

Se incrementó significativamente el número de dendritas para UA, AE y TL a niveles superiores a los del dbAMPc, mostrando todos los compuestos un incremento >18% (fig. 15).

55 El ácido elágico, la urolitina A y la telimagrandina produjeron todos incrementos de longitud dendrítica >26%, superiores a los observados con dbAMPc (fig. 16).

Ejemplo 7

Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A reducen la ganancia de peso y la masa grasa en ratones alimentados con una dieta rica en grasas

65 Se adquirieron ratones C57BL6/J macho de Charles River Laboratory (L'Arbresle, Francia) de 7 semanas de edad y se aclimataron a las instalaciones animales durante 2 semanas antes de iniciar los experimentos. Los ratones se alojaron en grupos de 5 bajo condiciones de alojamiento estándares, con un ciclo de 12 h de luz:12 h de oscuridad y

acceso libre a alimentos y agua. A partir de las 9 semanas de edad, los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas (DRG) (60% de kcal procedentes de grasas, D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) durante catorce semanas. Se monitorizó semanalmente el peso corporal.

Los ratones en los diferentes grupos de tratamiento recibieron la administración de (i) urolitina A mezclada con el alimento (aditivo alimentario) hasta alcanzar una dosis de 55 mg/kg de peso corporal/día (mkd), (ii) ácido elágico mezclado con el alimento (aditivo alimentario) hasta alcanzar una dosis de 75 mkd, (iii) punicalagina (sonda gástrica) hasta alcanzar una dosis de 90 mkd, o (iv) extracto de granada (EG) (sonda gástrica) hasta alcanzar una dosis de 140 mkd de polifenoles totales. Un extracto de granada típico utilizado en estos experimentos presenta la composición siguiente: polifenoles, 140 mkd; punicalagina, 13,1 mkd y ácido elágico, 13,2 mkd. Para animales tratados mediante sonda gástrica, la sonda se colocó diariamente (7 días/semana) entre 8:00 y 10:00 de la mañana; los compuestos se mezclaron con solución salina (NaCl al 0,9%) y se proporcionaron a un volumen final de 5 ml/kg de peso corporal. Los ratones en los grupos de control ricos en grasas se alimentaron con la misma dieta que los animales experimentales. Los ratones en grupos de control diferentes correspondientes recibieron la administración de dieta rica en grasas solo o dieta rica en grasas más sonda gástrica diaria con vehículo (solución salina). Otro grupo de control de ratones fue alimentado con dieta de alimento estándar únicamente.

Se monitorizó la composición corporal mediante EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX, EE.UU.) 5 semanas después del inicio del tratamiento para los ratones alimentados con dieta rica en grasas y 2 semanas después del inicio del tratamiento para ratones alimentados con dieta estándar. Los animales se introdujeron individualmente en un cilindro plástico y después se introdujeron en un sistema EchoMRI durante aproximadamente 2 min para el escaneo de la composición corporal (masa magra y grasa).

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

Los ratones alimentados con una dieta rica en grasas (DRG) desarrollaron obesidad grave en comparación con ratones de control alimentados con una dieta estándar (DE) (fig. 17A). La ganancia de peso corporal en ratones alimentados con dieta rica en grasas no tratados se asoció a un incremento del porcentaje de masa grasa (fig. 17B) y a una reducción del porcentaje de masa muscular (masa magra) (fig. 17C), ambos medidos mediante EchoMRI tras 5 semanas de tratamiento. En ratones alimentados con una dieta rica en grasas, el tratamiento con urolitina A (administrada mediante aditivo alimentario) o con punicalagina o extracto de granada (EG) (ambos administrados mediante sonda gástrica) evitó la aparición de obesidad, con una fuerte reducción de la ganancia de peso corporal en los ratones alimentados con DRG tratados en comparación con los ratones alimentados con DRG de control (fig. 17A). Junto con lo anterior, se redujo significativamente la masa grasa en ratones alimentados con DRG tratados con urolitina A, punicalagina o EG en comparación con ratones alimentados con DRG no tratados (fig. 17B).

Los ratones alimentados con una dieta estándar y tratados con ácido elágico o urolitina A también mostraron una reducción de masa grasa con un incremento concomitante de músculo (masa magra), ilustrando que estos tratamientos favorecen el control del peso y una complexión magra o muscular (fig. 18B).

Ejemplo 8

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

Se agruparon ratones C57BL6/J macho y se trataron tal como se ha indicado en el Ejemplo 7.

En ratones alimentados con dieta estándar y en ratones alimentados con DRG, el tratamiento con EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A resultó en un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de masa magra. Los ratones alimentados con una dieta rica en grasas y tratados con urolitina A, punicalagina o EG mostraron una reducción de la masa grasa con un incremento concomitante de músculo (masa magra) (figs. 17B y 17C). Los ratones alimentados con una dieta estándar y tratados con ácido elágico o urolitina A también mostraron una reducción de masa grasa con un incremento concomitante de músculo (masa magra), ilustrando que estos tratamientos favorecen el control del peso y una complexión magra o muscular (figs. 18A y 18B). Debido a que la masa magra está representada predominantemente por masa muscular, estos resultados ilustran cómo los tratamientos con EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A resulta en un incremento de la proporción de masa muscular en ratones normales y obesos con respecto a la masa corporal total. Se observó este efecto después de tan solo dos semanas de tratamiento.

Ejemplo 9

Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A incrementan el gasto energético en ratones normales y obesos

Se agruparon ratones C57BL6/J macho y se trataron tal como se ha indicado en el Ejemplo 7. Además, sin embargo, se midió el gasto energético basal de los ratones mediante consumo de oxígeno en calorimetría indirecta, producción

de dióxido de carbono y proporción de intercambio respiratorio), 8 semanas después del inicio del tratamiento para los ratones alimentados con DRG y 2 semanas después del inicio del tratamiento para ratones alimentados con dieta estándar, utilizando el Sistema integral de monitorización de animales de laboratorio (CLAMS, por sus siglas en inglés, Columbus Instruments, Columbus, OH, EE.UU.). En primer lugar, los animales se aclimataron durante 22 h a jaulas de CLAMS (temperatura ambiente: $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) empezando entre las 11 y 12 de la mañana. A continuación, se llevó a cabo la medición durante por lo menos 20 h bajo las mismas condiciones. La medición incluyó un ciclo de oscuridad completo. Los parámetros medidos durante CLAMS fueron los siguientes: (i) consumo de oxígeno (VO_2 en ml/kg/h): VO_2 se correlacionó directamente con gasto energético; (ii) producción de dióxido de carbono (VCO_2 , en ml/kg/h) y (iii) proporción de intercambio respiratorio (PIR): $\text{VCO}_2 / \text{VO}_2$; PIR es un indicador de la utilización de sustrato energético. En un estado estable, PIR es equivalente al cociente respiratorio (CR). La utilización de únicamente carbohidratos proporciona un $\text{PIR}=1$, mientras que la quema de únicamente grasa rinde un $\text{PIR}=0,7$. Una dieta mixta proporciona un $\text{PIR}=0,85$.

Se muestran los resultados en las figs. 19 y 20.

El consumo de oxígeno es un marcador fisiológico de la actividad mitocondrial y el gasto energético. Los tratamientos con EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A incrementaron significativamente el consumo de oxígeno en ratones. El ácido elágico y la urolitina A incrementaron el gasto energético en ratones alimentados con dieta estándar (figs. 19A y 19B). Se observó este efecto después de tan solo 2 semanas de tratamiento. El tratamiento con extracto de granada (EG), punicalagina y urolitina A incrementó el gasto energético en ratones alimentados con una DRG (figs. 20A y 20B).

Ejemplo 10

Extracto de granada, punicalagina, ácido elágico y urolitina A incrementan la utilización de ácidos grasos como sustratos energéticos en ratones normales y obesos

Se agruparon ratones C57BL6/J macho y se trataron tal como se ha indicado en el Ejemplo 9.

Tal como se ha indicado anteriormente, además del consumo de oxígeno, la calorimetría indirecta también monitoriza la producción de dióxido de carbono. La proporción entre la producción de dióxido de carbono (VCO_2) y el consumo de oxígeno (VO_2) se denomina proporción de intercambio respiratorio (PIR). PIR es un indicador excelente de la utilización de sustratos energéticos. En un estado estable, PIR es equivalente al cociente respiratorio (CR). Una utilización preferente de carbohidratos como sustrato energético proporciona un PIR más próximo a 1, mientras que la utilización de grasas como sustrato energético (quema de grasas) rinde un PIR más bajo, próximo a 0,7, en el caso de que se utilicen preferentemente ácidos grasos.

Tal como se ilustra en la fig. 21 y en la fig. 22, el tratamiento con EG, punicalagina, ácido elágico y urolitina A redujo significativamente PIR tanto en ratones alimentados con dieta estándar como en ratones alimentados con DRG. Este efecto era drástico en los ratones alimentados con dieta estándar tratados con ácido elágico y urolitina A (fig. 21). Estos resultados apoyan los cambios de composición corporal observados tras el consumo de EG, punicalagina, ácido elágico o urolitina A, los cuales favorecen una complexión más muscular (magra) con una composición reducida en grasas.

Ejemplo 11

Extracto de granada, punicalagina y urolitina A reducen los plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres en ratones obesos

Se agruparon ratones C57BL6/J macho y se trataron tal como se ha indicado en el Ejemplo 7. Además, se estimó la bioquímica plasmática 14 semanas después de iniciar el tratamiento utilizando un analizador de química clínica automática estándar (Dimension Xpand, Siemens). Los animales se sometieron a ayuno durante 12 h (entre las 8 de la tarde y las 8 de la mañana) antes de la recolección de sangre. Se recogieron aproximadamente 500 μl de sangre de la vena cava en animales anestesiados bajo anestesia de isoflurano. Se recolectó la sangre en tubos heparinizados y se colocó inmediatamente sobre hielo húmedo. Se preparó el plasma mediante centrifugación (1.500 x g, 15 min, 4°C). A continuación, se transfirieron muestras de plasma a microtubos limpios de 1,5 ml y se almacenaron a -80°C hasta la realización de mediciones bioquímicas en un analizador de química clínica automático estándar (Dimension Xpand, Siemens) utilizando los kits correspondientes.

Se midieron los niveles circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres mediante bioquímica estándar en la sangre de ratones alimentados con DRG de control y tratados (fig. 23). El tratamiento con EG, punicalagina y urolitina condujo a una mejora estadísticamente significativa de los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres. Estos resultados indican que el EG, la punicalagina y la urolitina A resultan eficaces en el tratamiento de la dislipemia en ratones obesos y en consecuencia pueden actuar mejorando la función cardiovascular y evitar la enfermedad cardiovascular.

Ejemplo 12

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

Se agruparon ratones C57BL6/J macho y se trataron tal como se ha indicado en el Ejemplo 7. Además, se llevó a cabo un ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG) para ratones alimentados con DRG que habían desarrollado intolerancia a la glucosa. El ensayo de tolerancia a la glucosa se monitorizó 10 semanas después de iniciar el tratamiento mediante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGo). Los animales se sometieron a ayuno durante 12 h (entre las 8 de la tarde y las 8 de la mañana) antes de la PTGo. El día de la PTGo, se recogió una pequeña gota de sangre (<2 µl) de la vena de la cola lateral y se monitorizó la glucemia utilizando un glucómetro (AccuCheck Aviva, Roche Diagnosis). A continuación, cada animal recibió, en el tiempo 0, una dosis oral de D-glucosa a una dosis de 2 g/kg de peso corporal. A continuación, se monitorizó la glucemia en los tiempos 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min después de la carga de glucosa oral.

Tal como en seres humanos, la alimentación con una dieta rica en grasas en ratones resultó en la aparición de obesidad y diabetes de tipo 2, que se caracteriza por una intolerancia a la glucosa grave, según se evalúa mediante el seguimiento de la glucemia inmediatamente posterior a una exposición a glucosa (2 g/kg de peso corporal) (prueba de tolerancia a la glucosa) (fig. 24). Tal como se ilustra en la fig. 24, el tratamiento con punicalagina, ácido elágico y urolitina A mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DRG. En consecuencia, estos tratamientos también pueden ser enfoques terapéuticos eficaces para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

Ejemplo 13La urolitina A incrementa la función mitocondrial en *C. elegans* envejecidos

Se cultivaron cepas de *C. elegans* a 20°C en placas de agar con medio de crecimiento de nemátodos (MCN) sembradas con *E. coli* cepa OP50. La cepa utilizada fue Briston N2 de tipo salvaje proporcionada por la Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota). Se disolvió urolitina A en DMSO. Los animales se expusieron a compuestos de huecos sobre placas sembradas con bacterias OP50 vivas. Las placas de control se prepararon con la concentración correspondiente de DMSO (al 0,1%).

La medición del consumo de oxígeno es un indicador directo de la actividad mitocondrial. El efecto de la urolitina A sobre la actividad mitocondrial en *C. elegans* envejecidos (10 días de edad) se evaluó mediante tratamiento de *C. elegans* con urolitina A durante 10 días de adultez, momento en el que se midió el consumo de oxígeno utilizando el equipo Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience Inc., North Billerica, MA). Se utilizaron 250 *C. elegans* de diez días de edad en cada condición. Se recuperó *C. elegans* de las placas con MCN con medio M9, se lavaron tres veces en 2 ml de M9 para eliminar las bacterias residuales y se resuspendieron en 500 µl de medio M9. Se transfirieron los gusanos a placas Seahorse estándares de 24 pocillos (n° 100777-004) (50 gusanos en cada pocillo) y se midió el consumo de oxígeno. El consumo basal de oxígeno 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 réplicas por intervalo. Las tasas de respiración se normalizaron respecto al número exacto de gusanos en cada pocillo determinado tras completar el experimento, utilizando un estereomicroscopio. Tras determinar el consumo basal de oxígeno, se midió el consumo de oxígeno desacoplado mediante la adición al medio de carbonilcianuro-p-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP) en el punto temporal de 30 minutos con el fin de evaluar la capacidad máxima de consumo de oxígeno 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 la medición de la función mitocondrial durante el tiempo. FCCP es un agente desacoplante químico que anula el enlace obligatorio entre la cadena respiratoria y el sistema de fosforilación que se observa en las mitocondrias intactas. Este efecto se debe a las propiedades anfipáticas de la molécula, que se disuelve en las bicapas fosfolípicas de las mitocondrias. Lo anterior incrementa drásticamente la permeabilidad iónica de la membrana mitocondrial y generar una drástica fuga de protones que conduce a un incremento del consumo de oxígeno debido a la compensación con oxígeno de los electrones bombeados a la cadena respiratoria en paralelo a la fuga de protones. Debido a que este consumo de oxígeno está disociado (desacoplado) de la producción de ATP (fosforilación oxidativa), FCCP incrementa el consumo de oxígeno, reduciendo simultáneamente la generación de energía (ATP) por las mitocondrias. Las mitocondrias totalmente desacopladas, tal como se consigue con FCCP, muestran la capacidad máxima de su cadena respiratoria mitocondrial (consumo de oxígeno máximo) sin el "freno" que representa la fosforilación oxidativa y la producción de energía).

Los resultados mostrados en la fig. 25 ilustran que la urolitina A incrementa la capacidad mitocondrial máxima de *C. elegans* envejecidos, tal como se ilustra por un efecto prolongado sobre la respiración desacoplada incrementada en gusanos tratados con urolitina A versus gusanos tratados con el control (DMSO). Los gusanos no tratados, de control, mostraron un breve incremento de la respiración desacoplada que rápidamente volvió a los niveles basales de consumo de oxígeno. Los gusanos tratados con urolitina A mostraron una elevación más prolongada del consumo de oxígeno. El grado de actividad mitocondrial potenciada se muestra mediante comparación de las superficies bajo la curva (AUC) durante el periodo de desacoplamiento, con la respiración acoplada media utilizada como línea base. Se observó que la urolitina A incrementaba significativamente la respiración desacoplada en gusanos envejecidos en comparación con gusanos no tratados de control durante el periodo de 30 minutos evaluado.

Ejemplo 14

La urolitina A incrementa la actividad mitocondrial en *C. elegans*

Se cultivaron cepas de *C. elegans* a 20°C en placas de agar con medio de crecimiento de nemátodos sembradas 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 utilizadas eran la SJ4103 (zcls14[myo-3::GFP(mit)]), que es una línea transgénica estable que expresa una proteína fluorescente verde (GFP) localizada mitocondrialmente con un péptido de señal de importación mitocondrial escindible bajo el control del promotor específico del músculo de la pared corporal *myo-3*. La expresión y cuantificación de GFP se llevaron a cabo según el protocolo descrito anteriormente (Durieux et al., 2011). Los gusanos se trataron con urolitina A 50 µM de huevos y se monitorizó la GFP tras un día de adultez. Se llevaron a cabo ensayos fluorimétricos utilizando un lector de placas multimarcador Victor X4 (Perkin-Elmer Life Science). Se recolectaron ochenta gusanos al azar (20 gusanos por pocillo de una placa de 96 pocillos de paredes negras) y cada pocillo se leyó cuatro veces y se promedió.

Los resultados en la fig. 26 muestran que el tratamiento de los gusanos con urolitina A indujo la expresión del informador GFP mitocondrial controlado por el promotor específico muscular *myo-3* en *C. elegans*. Este marcado incremento de la expresión de GFP proporciona clara evidencia de que la capacidad mitocondrial se incrementó debido a la urolitina A. Para permitir dicho incremento de señal de GFP observada, las mitocondrias en el músculo deben agrandarse o ser más numerosas en estos gusanos.

Ejemplo 15

Efectos de compuestos derivados de granada sobre el humor y la cognición en respuesta al estrés crónico

Se expusieron ratones C57BL/6J de tipo salvaje macho de 7 semanas de edad a estrés impredecible crónico durante un periodo de cuatro semanas. Se llevaron a cabo varios experimentos de comportamiento antes, durante y después del periodo de estrés crónico a fin de determinar el impacto sobre el humor y la cognición. Tal como se ha informado anteriormente, el estrés crónico impacta negativamente sobre el humor y la cognición. Se administraron compuestos naturales derivados de granadas en estos ratones a fin de determinar qué impacto presentarían estos compuestos sobre la mejora de dicho impacto negativo sobre el humor y la cognición.

Los ratones se habituaron a las instalaciones animales de los presentes inventores durante 9 días antes de iniciar los experimentos. Todos los ratones se alojaron en grupos de tres en jaulas de plástico estándares y se mantuvieron bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (7 de la mañana a 7 de la tarde) con acceso *ad libitum* a alimento y agua. Todos los procedimientos realizados se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales nacionales suizas para la experimentación animal y fueron aprobadas por la Oficina veterinaria federal suiza para la experimentación animal.

Caracterización de los animales

Tras la adaptación a las instalaciones animales, todos los ratones se caracterizaron en términos de peso corporal, comportamiento de tipo ansiedad en el laberinto cero elevado (EZM, por sus siglas en inglés) y ensayos de locomoción y exploración en campo abierto y de objetos nuevos. El objetivo de estos experimentos era hacer corresponder los animales según sus tasas de ansiedad y exploración con el fin de establecer grupos experimentales y de control que fuesen equivalentes según dichas características.

Laberinto cero elevado

Se midió la ansiedad en un laberinto cero elevado (EZM). Se observaron los ratones durante 5 min en el EZM (pista anular de 5,5 cm de anchura con un diámetro de 46 cm y elevado 46 cm sobre el suelo) bajo condiciones de luz débil y dispersada. Se protegieron dos sectores de 90° opuestos con paredes internas y externas de 13,5 cm de altura. De esta manera, se definieron tres zonas del modo siguiente: una zona intermedia que comprendía cuatro segmentos de 30° en los extremos de las paredes de protección separados por las dos zonas de exploración de 50° de anchura cerradas/protegidas y las dos zonas de exploración de 70° de anchura abiertas/desprotegidas. Con estos límites, se detectaron únicamente las entradas en los sectores abiertos únicamente al entrar el animal en ellos con las cuatro patas. Las trayectorias de cada ratón se registraron automáticamente mediante supervisión por vídeo (Ethovision 3.0, Noldus, Wageningen, Países Bajos). El número total de entrada en todos los sectores sirvió de indicador de actividad locomotora espontánea, mientras que las diferencias en el número de entradas y el tiempo invertido en los sectores abiertos se consideraron indicadores de ansiedad. Entre sesiones se limpió el laberinto con etanol al 4%/agua.

Campo abierto y objetos nuevos

La locomoción y reactividad en el campo abierto (CA) se evaluó en una caja cuadrada blanca (50 x 50 x 37 cm) bajo condiciones de luz tenue y difusa. Se introdujo el ratón en el centro del campo y se permitió que se moviese libremente durante 10 min. Se analizó la distancia total desplazada, la frecuencia de entradas en el centro, el tiempo y porcentaje de tiempo en el centro del CA. Se interpretó la evitación del interior o zona "desprotegida" del campo como un

comportamiento de tipo ansiedad. Las medidas de la distancia total se utilizaron como índice de actividad. Se evaluó el comportamiento explorador mediante la utilización de la prueba de objetos nuevos (ON). La prueba de ON se llevó a cabo inmediatamente después de la prueba de CA. Se introdujo un pequeño objeto metálico (3 x 1,5 x 5 cm) en el centro del campo abierto mientras se encontraba dentro el ratón. A continuación, se dio 5 min a los ratones para explorar libremente el objeto nuevo. Se analizó el tiempo invertido en el centro y la periferia del compartimiento, el número y latencia de las entradas al centro y la distancia total desplazada en el centro y en todo el compartimiento. El porcentaje del tiempo y la distancia invertidos en el centro, explorando el objeto nuevo, se consideraron indicadores de actividad exploradora "concentrada".

Tratamiento con extracto derivado 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 alimentación estándar (Control), mientras que los tres grupos restantes recibieron dosis variables de extracto 1011, un extracto derivado de zumo de granada. Una dosis baja correspondía a una dosis de extracto de 21 mg/kg/d de equivalentes de ácido gálico de polifenoles (GAE PPE, por sus siglas en inglés), la dosis intermedia correspondía a una dosis de extracto de 43 mg/kg/g de GAE PPE; la dosis elevada correspondía a una dosis de extracto de 86 mg/kg/d de GAE PPE (ver la Tabla 5).

Tabla 5. Extracto de polvos 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 intermedia	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 se inició tres semanas antes de iniciarse el protocolo de estrés crónico y continuó hasta la terminación del experimento.

Tratamiento con urolitina A, un metabolito derivado de la granada

Tres semanas antes de iniciar el protocolo de estrés crónico, los ratones se separaron en dos grupos. Un grupo recibió dieta de alimento estándar para ratón (Control), mientras que el otro grupo recibió una dieta que contenía urolitina A, administrada a una dosis de 25 mg/kg/d.

Estrés impredecible crónico

El protocolo de estrés crónico impredecible implicó la exposición de los animales a una situación estresante diaria en un momento impredecible durante 4 semanas (entre las 8 de la mañana y las 4 de la tarde, y distribuida aleatoriamente durante los 28 días). Los estímulos de estrés utilizados fueron: 6 min de suspensión de la cola; 3x descargas de 0,4 mA inescapables en una pata; 4 h de exposición a serrín húmedo y sucio; 2 h de exposición a una plataforma elevada; 1 h de inmovilización en un tubo de plástico; 30 min de exposición a 16°C; 2 días de ciclo luz/oscuridad invertido; 10 min de exposición a un individuo agresivo de mayor edad de la misma especie; exposición lumínica intensa (600 lux); 2 h de hacinamiento en la jaula (6 ratones) y 8 h con una inclinación de la jaula de 40°. Se pesaron todos los animales y se evaluó el estado de su pelaje de manera periódica (cada 3 a 5 días). Durante este experimento se expuso un grupo de ratones al estrés crónico y el otro grupo de animales no se perturbó y sirvió de control.

Ensayos de comportamiento

Prueba de suspensión de la cola

Se utilizó la prueba de suspensión de la cola (PSC) como modelo para evaluar la actividad de tipo antidepressivo en los ratones. La prueba se basa en el hecho de que los animales sometidos al estrés inescapable a corto plazo (6 min) de ser suspendidos de la cola, adoptan una postura inmóvil. Se colgó el ratón de una barra metálica con una cinta adhesiva situada a 20 mm del extremo de su cola. La distancia entre el suelo y la barra era de aproximadamente 25 cm. Se definió la inmovilidad como la ausencia de movimientos iniciados e incluía el balanceo pasivo. El tiempo de investigación, que incluyó inmovilidad, los movimientos de esfuerzo y de escalar, se puntuaron a partir de la cinta de vídeo.

Tal como se muestra en la fig. 27, el estrés crónico resultó en una inmovilidad incrementada en la PSC, un indicador de depresión incrementada y sentido de indefensión. Sin embargo, los ratones tratados con dosis crecientes de extracto de granada demostraron una reversión de este patrón y una restauración de la movilidad y los movimientos de esfuerzo a niveles observados en los ratones no estresados. De esta manera, el extracto de granada evita la respuesta depresiva observada en ratones no tratados estresados crónicamente.

Reconocimiento contextual

El condicionamiento de miedo contextual es una medida de la capacidad del animal de recordar un contexto particular. En este ensayo, los ratones se introducen en una caja y seguidamente reciben dos descargas leves, separadas por un minuto. En respuesta a las descargas, los ratones se paralizan. La capacidad de los ratones de reconocer el contexto en el que recibieron la descarga se somete a ensayo introduciéndolos nuevamente en la caja en un punto temporal posterior. En el caso de que reconozcan el contexto, los ratones se paralizarán anticipando que van a recibir una descarga.

En ratones normales, la capacidad de reconocer el contexto en ausencia de cualesquiera descargas es una medida de memoria contextual. Los ratones con mejor memoria contextual reconocen el contexto inicial mejor y, de esta manera, presentan un nivel más elevado de parálisis.

El presente ensayo también puede utilizarse para medir la ansiedad en ratones estresados. En ratones estresados, la ansiedad incrementada pudo observarse en un tiempo de reacción de parálisis incrementado en respuesta a las descargas iniciales, así como en un periodo de extinción más prolongado del recuerdo del contexto. La extinción de la memoria contextual se mide introduciendo el ratón en el mismo contexto una vez al día durante varios días en ausencia del estímulo adverso inicial. Con el tiempo, los ratones desaprenden la asociación del contexto con el estímulo adverso, lo que se pone de manifiesto en una reducción gradual del comportamiento de parálisis. En ratones estresados que presentan ansiedad, dicha extinción del recuerdo adverso requiere más tiempo.

El condicionamiento de miedo contextual se utilizó para someter a ensayo el efecto del extracto de granada sobre la inducción de ansiedad (es decir, ansiedad aprendida) en ratones en respuesta al reconocimiento contextual. El entrenamiento y los ensayos tuvieron lugar en una cámara de condicionamiento de roedores (20 x 20 x 28 cm), introducida en una caja de plexiglás e iluminada con una bombilla de 20 W. Las paredes laterales de la cámara de condicionamiento se construyeron de metacrilato blanco y la puerta y la tapa superior se construyeron de plexiglás. El suelo consistía en 20 barras de acero a través de las cuales podía administrarse una descarga aleatoria a partir de un generador de descargas. Unos ventiladores proporcionaban un ruido de fondo de 68 dB (sistema completo: Panlab, S.L., Barcelona, España). El condicionamiento de miedo al contexto se realizó durante la tercera semana del protocolo de estrés crónico en el grupo estresado. El día del condicionamiento de miedo, los ratones se transportaron desde la sala de la colonia al laboratorio de comportamiento contiguo y se introdujeron en la cámara de condicionamiento. El entrenamiento consistía en la exposición de los ratones a un contexto condicionante durante 3 min seguido de tres descargas eléctricas en una pata (2 s, 0,4 mA) administradas después de cada min. Después de la última descarga en la pata, el animal permanecía 30 s en la cámara. La cámara de condicionamiento de miedo se limpió a fondo con ácido acético al 0,5% antes de introducir cada ratón en la caja. Para determinar el efecto del estrés crónico y las diversas dosis de extracto de granada sobre el nivel de ansiedad inducido por este recuerdo contextual, se midió el nivel de comportamiento inducido de ansiedad en respuesta a este contexto. Se examinaron las respuestas de comportamiento siguientes, que es conocido que son sensibles a los niveles de ansiedad: % de comportamiento de parálisis, % de comportamiento vertical y % de comportamiento de aseo. Estas mediciones comportamentales se llevaron a cabo 48 h después de exponer nuevamente los ratones al contexto de condicionamiento durante 8 min. Después de las sesiones de entrenamiento y ensayo, los animales fueron inmediatamente devueltos a sus jaulas hábitat. Se registró el comportamiento de los animales y después se puntuó con el software de observación del comportamiento creado por el propio laboratorio, por un observador ciego al tratamiento de los animales.

Comportamiento de parálisis, definido como una falta de movimiento excepto por el latido cardiaco y la respiración, se puntuó y se utilizó como un índice de ansiedad. El tiempo de comportamiento de parálisis se transformó en niveles en porcentaje de comportamiento de parálisis. El extracto de granada mostró una respuesta dependiente de la dosis, con una reducción significativa del % de comportamiento de parálisis a la dosis más alta (fig. 28), indicando un efecto protector frente a la ansiedad. Se observó una reducción similar del comportamiento de ansiedad en el comportamiento vertical, con un efecto protector significativo y dependiente de la dosis del comportamiento vertical tras la administración de extracto de granada (fig. 29). Completando estas observaciones, se observó una fuerte supresión de la inhibición inducida por ansiedad del comportamiento de aseo a la dosis más alta de extracto de granada (fig. 30). Estos resultados demuestran que el extracto y compuestos de granada reducen la ansiedad inducida experimentalmente en ratones.

Esta reducción de la ansiedad inducida experimentalmente en ratones estresados crónicamente también se observó para la urolitina A, un metabolito de la punicalagina. En el presente estudio, se midieron los niveles de ansiedad a partir de la extinción del recuerdo del contexto adverso proporcionando en el ensayo de miedo contextual descrito anteriormente. En el presente estudio, los ratones que habían sido sometidos a entrenamiento utilizando el paradigma de miedo contextual fueron expuestos a este contexto diariamente durante cuatro días, aunque en ausencia de cualquier estímulo adverso. La capacidad de reconocer el contexto se midió por el comportamiento de parálisis durante un periodo de observación de 3 minutos. Se ha demostrado que los niveles incrementados de ansiedad conducen a un periodo más prolongado para la extinción del recuerdo de un contexto adverso. Tal como se muestra en la fig. 31, los ratones que han sufrido estrés crónico muestran un periodo más lento de extinción que los ratones normales. Sin embargo, tras el tratamiento con urolitina A a una dosis de 25 mg/kg/d, los ratones que habían sufrido estrés crónico mostraron una mejora significativa de la extinción del recuerdo adverso, demostrando que la urolitina A, al igual que la punicalagina, es capaz de reducir la ansiedad en ratones que han sufrido estrés crónico.

Laberinto acuático de Morris

La memoria y aprendizaje especiales resultan afectados por el estrés crónico. El aparato del laberinto acuático de Morris consiste en una piscina circular blanca grande (140 cm de diámetro) llena de agua de color opaco (25°C +/- 1°C) y con una plataforma (10 x 10 cm²) sumergida 1 cm bajo la superficie del agua. El laberinto acuático está circundado por cortinas grises (a 25 cm de la periferia de la piscina) que contienen varias claves visuales prominentes. Antes de los ensayos, se entrena al ratón para aprender la localización de la plataforma. Utilizando las claves visuales prominentes, el ratón aprende a localizar la plataforma. La etapa de aprendizaje se inicia con una etapa de habituación en la que los ratones se introducen en la sala, aparato y agua, proporcionándoles 2 min de prueba de nado libre, en ausencia de plataforma. Los datos se recogen utilizando una videocámara fija al techo, conectada a un sistema de supervisión por vídeo (Ethovision 3.0, Noldus, Wageningen, Países Bajos).

Tras una sesión de habituación (día 0), los ratones se someten a diferentes protocolos para evaluar secuencialmente sus capacidades de aprendizaje espacial (días 1 a 3). Las sesiones de aprendizaje espacial se llevaron a cabo en tres días consecutivos (días 1 a 3), realizando cuatro pruebas cada día con un intervalo entre pruebas (IEP) de 6 min entre cada prueba.

Cada prueba se inició mediante la introducción del ratón en el laberinto con ayuda de una taza, frente a la pared de la piscina, y en una de cuatro posibles posiciones, las cuales se balancearon aleatoriamente entre pruebas y días. La distancia entre el ratón y la plataforma se midió en cada tiempo de muestreo, recogiendo 25 tiempos de muestreo por segundo. A continuación, se sumaron estas distancias durante el periodo de 60 segundos, proporcionando una medición de la distancia a la plataforma (cm) para cada prueba. En el caso de que un ratón no encontrase la plataforma en 60 s, se lo guiaba suavemente hacia ella. Cada ratón debía permanecer sobre la plataforma durante 20 s antes de devolverlo a su jaula de espera.

Los resultados del presente ejemplo demostraron que el estrés crónico presentaba un impacto negativo significativo sobre el aprendizaje y la memoria espacial. Durante la sesión de entrenamiento se produjo un incremento significativo de la distancia recorrida para alcanzar la plataforma en comparación con el control no estresado, demostrando que el estrés crónico perjudica la formación normal de memoria durante el aprendizaje (fig. 32). El tratamiento de los ratones con extracto de granada fue capaz de protegerlos frente a dichos efectos negativos del estrés crónico sobre el aprendizaje y memoria asociada. Se observó un efecto dependiente de la dosis en los ratones que habían recibido extracto de granada, y los ratones estresados crónicamente y tratados fueron capaces de rendir a los mismos niveles que los controles no estresados (fig. 33).

Se observó un efecto similar para los ratones tratados con urolitina A, tal como se muestra en la fig. 34. Los ratones sometidos al protocolo de estrés crónico mostraron un aprendizaje errático, tal como pone de manifiesto la elevada variabilidad entre pruebas secuenciales. El tratamiento de ratones estresados crónicamente, con urolitina A a una dosis de 25 mg/kg/d mostró una estabilización de esta variabilidad. Esto subraya el hecho de que la urolitina A, un metabolito posterior de la punicalagina, también es capaz de ofrecer protección frente a dichos efectos negativos del estrés crónico sobre la cognición, incluyendo el aprendizaje y la memoria.

En resumen, estos resultados conjuntamente demuestran que el extracto de granada y compuestos derivados, tales como la urolitina A, son capaces de actuar reduciendo los impactos negativos del estrés crónico sobre la cognición, incluyendo la memoria y el aprendizaje. Además, el extracto de granada y compuestos derivados presentan actividad antidepresiva, tal como se observa en la prueba de suspensión de la cola, y reducen la ansiedad causada por el estrés crónico. Los resultados también demuestran que el extracto de granada evita el deterioro de la memoria, rendimiento de aprendizaje y reconocimiento espacial normalmente observados tras el estrés crónico.

Ejemplo 16Efecto sobre la memoria y la cognición en el modelo de rata envejecida

Durante el envejecimiento, se producen varios efectos sobre la cognición y la memoria, que pueden recapitularse en el modelo de rata del envejecimiento. Para una revisión, ver Gallagher y Rapp, Annu. Rev. Psychol. 48:339-70, 2009. El modelo de rata envejecida ha sido utilizado ampliamente para caracterizar los efectos del envejecimiento sobre la memoria y la cognición. En los experimentos presentados en la presente memoria, se observó un rendimiento mejorado en presencia de extracto de granada.

Las ratas Sprague-Dawley envejecidas (de edades a partir de 19 meses) recibieron extracto de granada (1108) en su agua de bebida, a una concentración de 0,34 mg/ml de polifenoles (PPE). Se midió el contenido de polifenoles utilizando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, con el contenido fenólico expresado como equivalentes de ácido gálico. El tratamiento de control consistió en sacarosa al 1,36%, D-glucosa al 0,12% y D-fructosa al 0,12% disueltos en agua. Las ratas de promedio consumieron 30 ml/día tanto del tratamiento de control como de 1108 (ver la Tabla 6), con un peso medio de 660 g/rata. Esto resultó en una dosis de 15 mg de PPE/kg/d o 1,1 mg de punicalagina/kg/d para los animales que recibieron el extracto 1108.

Tabla 6. Extracto líquido de granada.

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

Tras 2,5 meses de tratamiento, se evaluó la memoria de trabajo a corto plazo utilizando una tarea de reconocimiento social, una prueba estándar que implica la cognición social. Thor y Halloway, *Animal Learning Behavior* 9:561-5, 2009. En esta tarea, cada rata envejecida se introdujo en su jaula hábitat junto con una rata Sprague-Dawley macho joven (<5 semanas de edad) durante 5 minutos. Treinta minutos después, se repitió exactamente el mismo procedimiento con el mismo individuo joven a fin de determinar una segunda vez el grado de interacción entre los dos animales. Se esperaba menos contacto en la segunda interacción, ya que los dos animales habían tenido una interacción previa. Esta reducción de contacto entre los animales es una medida del rendimiento cognitivo y la retención de memoria. Treinta minutos después, se introdujo una nueva rata joven durante 5 minutos con la rata envejecida, con el fin de medir si el animal puede discriminar entre los dos individuos jóvenes diferentes. Durante cada período de contacto entre los dos animales, se midió el tiempo total de contacto a fin de evaluar la intensidad de la interacción social.

Se muestran los resultados en la fig. 35. Los animales envejecidos tratados con control no mostraron ninguna preferencia para el objeto familiar e invirtieron el mismo tiempo explorando ambos objetos, un efecto que se ha demostrado anteriormente en ratas envejecidas y que se cree refleja un declive en la memoria de orden temporal durante el envejecimiento. Hauser et al., *Behav. Neurosci.* 123:1339-45, 2009. Sin embargo, las ratas tratadas con extracto 1108 mostraron una reducción del tiempo invertido con el mismo joven durante el segundo período de exposición, así como un incremento del tiempo de interacción con una nueva rata joven. Esta diferencia observada ilustra el beneficio protector del extracto 1108 sobre el desarrollo y retención de memoria.

Ejemplo 17

Efecto sobre la memoria espacial en el modelo de rata envejecida

También se ha informado de que la memoria espacial resulta afectada por el envejecimiento, con un declive de rendimiento resultante del envejecimiento. Bergado et al., (publicación electrónica el 29 de octubre, 2010) *Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral analysis*. Neuroscience. Con el fin de examinar los efectos del extracto de granada sobre el declive de la memoria espacial durante el envejecimiento, se trataron ratas Sprague-Dawley envejecidas (edades a partir de 19 meses) con extracto de granada 1108 o control en su agua de bebida, tal como se ha indicado para el Ejemplo 16.

Las ratas envejecidas fueron tratadas con el extracto 1108 o con un control isocalórico durante tres meses, después de los cuales se evaluó su rendimiento de aprendizaje y memoria utilizando la tarea del laberinto acuático de Morris, descrito en el Ejemplo 15.

Se evaluaron las capacidades de aprendizaje de cada animal a partir de su rendimiento en la tarea inversa (tres pruebas). En esta tarea, se enseñó a los animales en primer lugar la localización de la plataforma en el cuadrante (OESTE) mediante tres pruebas de entrenamiento. A continuación, se modificó la localización de la plataforma y se situó en el cuadrante opuesto (ESTE). Los animales fueron sometidos 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, medido como la distancia recorrida antes de localizar la plataforma. Se muestran los resultados en la fig. 36. Los animales tratados con el extracto fueron significativamente más eficientes en la localización de la plataforma en la prueba de inversión (ANOVA unidireccional: $P < 0,02$: control N=11, PJ: N=13; extracto: N=14), demostrando un efecto terapéutico del extracto administrado para este aspecto de la memoria espacial.

Ejemplo 18

Efectos de los compuestos derivados de la granada sobre la memoria espacial y de trabajo en la enfermedad de Alzheimer

Se ha demostrado que la enfermedad de Alzheimer (EA) presenta efectos perjudiciales sobre la memoria espacial, un efecto que también se ha observado en modelos de ratón de la EA. Para determinar los efectos de los compuestos derivados de la granada sobre la mejora de la memoria espacial y de trabajo en la EA, se sometieron a ensayo diversos extractos de granada y punicalagina en dos ensayos de comportamiento de memoria espacial: el laberinto en Y y el laberinto acuático de Morris.

Laberinto en Y

En el presente estudio, se utilizó el modelo de ratón 5XFAD de la EA. El modelo de ratón 5XFAD para la enfermedad de Alzheimer se basa en modificaciones genéticas (introducción de los genes humanos mutados de PPA y PS1) que

conducen a la producción de péptido β amiloide (A β) en el tejido cerebral. Se ha encontrado que estos ratones presentan un declive significativo del rendimiento cognitivo en el laberinto en Y tan pronto como a los 7 meses de edad.

Con el fin de determinar el efecto de los compuestos derivados de la granada, se administró un extracto de granada (EG) derivado de granada entera, mediante sonda gástrica a una dosis de 60 mg/kg/d de polifenoles, que incluía aproximadamente 5,6 mg/kg/d de punicalagina. Los ratones recibieron la sonda gástrica 3 veces a la semana a partir de los 3 meses de edad y hasta el final del tratamiento. Los ratones se sometieron a ensayo a partir de los 7 meses de edad para los efectos del EG sobre la memoria de trabajo en el laberinto en Y. Se introdujeron los ratones en el laberinto en Y durante 15 minutos y se dejó que explorasen dos brazos, cerrando el tercer brazo. Cuatro horas después, el animal se introdujo nuevamente en el laberinto durante cinco minutos, esta vez con el tercer brazo abierto, permitiendo al ratón la posibilidad de explorar libremente los tres brazos. La actividad de exploración en el nuevo brazo evaluó la capacidad del animal de reconocer que esta zona particular no había sido explorada todavía, de acuerdo con claves espaciales. Los ratones fueron puntuados si realizaban una alteración correcta durante la exploración en el caso de que explorasen cada uno de los tres brazos y no sólo los primeros dos presentados.

Tal como se muestra en la fig. 37, se observó una mejora significativa del rendimiento de memoria de trabajo, medida por el número de alteraciones correctas, en los ratones 5XFAD tratados con EG.

Laberinto acuático de Morris

Los extractos de granada 31008, 61109 y 71109 se sometieron a ensayo en un segundo modelo animal transgénico de enfermedad de Alzheimer que expresaba tanto las mutaciones London de amiloide mutante como la mutación humana de la prenilina-1. Los animales en el presente modelo desarrollaron placas a los 4 meses de edad y déficits de memoria a los 6 meses. La densa carga de placas era visible tras 7 meses.

En un conjunto de experimentos, se alimentaron ratones transgénicos PPA-PS1 de cuatro meses de edad con una dosis fija de aproximadamente 97 mg de polifenoles totales/kg/día, que incluía aproximadamente 15 mg/kg/d de punicalagina del extracto 31008, que se derivó de granadas enteras, mediante el agua de bebida. En un conjunto de experimentos, se alimentaron ratones transgénicos PPA-PS1 de 4 meses de edad con una dosis fija de aproximadamente 468 mg totales/kg/día del extracto 61109, que estaba altamente enriquecido en punicalagina (>91%), mediante el agua de bebida. En un conjunto de experimentos, se alimentaron ratones transgénicos PPA-PS1 de 4 meses de edad con una dosis fija de aproximadamente 180 mg de polifenoles totales/kg/día de extracto 71109, que se derivó de cáscara de granada, mediante el agua de bebida. Tras 3 meses de alimentación, los ratones (ya de 7 meses de edad) fueron sometidos a ensayo en la prueba espacial en el laberinto acuático de Morris.

El laberinto acuático de Morris se llevó a cabo durante los días 84 a 87 del tratamiento. La piscina (recinto blanco circular de 1 m de diámetro) contenía agua a 20°C con dióxido de titanio como aditivo no tóxico inodoro para ocultar la plataforma de escape (1 cm bajo el nivel del agua). Se grabó en vídeo el nado de cada ratón y se analizó (Ethovision, Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos). Antes del entrenamiento, se colocó cada ratón sobre la plataforma durante 15 segundos. Para las pruebas de navegación de sitio, los ratones fueron entrenados para localizar la plataforma oculta en cinco bloques de tres pruebas durante tres días consecutivos. Cada prueba consistía en una prueba de nado forzado de máximo 120 segundos, seguida de 60 segundos de descanso. Se midió el tiempo que necesitaba cada ratón para localizar la plataforma durante los cinco bloques consecutivos de entrenamiento, a fin de determinar una curva de aprendizaje para cada ratón.

Veinticuatro horas después del entrenamiento final, cada animal fue sometido a una prueba de sondeo en la que se había retirado la plataforma. Se dejó que los ratones buscasen la plataforma ausente durante 60 segundos y se midió el tiempo de búsqueda invertido en cada cuadrante de la piscina, así como el número de cruces a la posición original de la plataforma. Tal como se muestra en la fig. 38, los ratones alimentados con extracto 31008 mostraron un rendimiento incrementado en la prueba de sondeo, tal como demuestra la frecuencia incrementada de cruces de la zona en donde se localizaba originalmente la plataforma. Los ratones alimentados con los extractos 61109 y 71109 presentaron un rendimiento incluso mejor.

Las composiciones de los extractos 61109 utilizados en el presente experimento se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7.

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

Ejemplo 19

Efectos de los compuestos derivados de la granada sobre la depresión, la ansiedad y la cognición en respuesta al estrés temprano

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

- 5 El estrés temprano presentó un impacto significativo sobre el rendimiento cognitivo en la vida adulta posterior, incluyendo: (i) incremento de la toma de decisiones anormal y asunción excesiva de riesgos, (ii) susceptibilidad a tasas incrementadas de depresión y ansiedad, y (iii) aprendizaje y memoria deficientes.

- 10 Todos los procedimientos realizados se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales nacionales suizas para la experimentación animal y fueron aprobadas por la Oficina veterinaria federal suiza para la experimentación animal.

Estrés en los primeros años de vida producido por separación materna

- 15 El día postnatal 1, se sacrificaron crías para que cada madre tuviese 6 crías. Entre los días postnatales 1 y 14, se llevó a cabo separación materna (SM) impredecible de un periodo de 3 horas diarias. La separación materna se llevó a cabo en tiempos aleatorios (entre las 8 de la mañana y las 2 de la tarde) para evitar la habituación de la madre al procedimiento. El protocolo consistía en retirar crías de su madre y trasladarlas a otra jaula a temperatura ambiente durante un periodo de 3 horas, después de las cuales se devolvían las crías su nido original. En las figuras se señalan estos grupos como de estrés temprano. Un grupo de control de madre/crías se dejó sin perturbar y se señala en las figuras como normal.

Tratamiento con punicalagina aislada a partir de granada

- 25 Una semana después de la separación materna, los ratones fueron separados en dos grupos. Un grupo de control recibió la dieta de alimento estándar para ratones (no tratados), mientras que el otro grupo recibió la elagitanina punicalagina mezclada en el alimento de tal manera que administrase una dosis de 90 mg/kg/día en los ratones. El tratamiento con la dieta se inició 1 semana después de la terminación del tratamiento de separación materna.

Ensayos de comportamiento

- Se examinaron los efectos del estrés temprano sobre la depresión, ansiedad y cognición utilizando los ensayos de comportamiento siguientes, que se llevaron a cabo 166 días después de completar el protocolo de separación materna. Se compararon ratones criados normalmente con ratones separados de la madre (estrés temprano) y con ratones separados de la madre y tratados con punicalagina.

Prueba de caja oscura/iluminada

- 40 En el presente ensayo, se introdujeron ratones en una caja de PVC que estaba separada en dos compartimientos: un compartimiento oscuro (15 x 20 x 25 cm, PVC negro y tapada en la parte superior) y un compartimiento iluminado (30 x 20 x 25 cm, PVC blanco e iluminado con 200 lux), ambos conectados a través de una puerta (5 x 5 cm) (Ligna, Paris, Francia). El experimento se inició introduciendo el animal en el compartimiento oscuro; a continuación, una cámara grababa durante un periodo de 5 minutos el tiempo que el ratón invertía en la zona iluminada, el número de transiciones de zona oscura a zona iluminada y la latencia de escape de zona oscura a zona iluminada.

- 45 Normalmente, los ratones evitarán la zona iluminada en la caja. Los ratones separados de la madre invierten un tiempo anormalmente largo en el compartimiento iluminado en comparación con sus hermanos de camada no separados de la madre como consecuencia del estrés temprano (fig. 39). Este incremento del tiempo invertido en explorar la zona iluminada refleja un comportamiento de toma de decisiones alterado que se caracteriza por una asunción de riesgos anormal y excesiva.

El tratamiento con punicalagina de los ratones separados de la madre revertió y normalizó el comportamiento de riesgo excesivo y restauró el proceso de toma de decisiones a la normalidad (fig. 39).

Laberinto en O elevado (LOE)

- Otro ensayo comportamental que mide la toma de riesgos anormal es el laberinto en O elevado (LOE). 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, enfrentadas, están encerradas por paredes de 5 cm de altura. Las dos partes restantes del anillo no presentan paredes. El laberinto está elevado 1 m sobre el suelo. La tendencia natural de los ratones es evitar las superficies abiertas e invierten más tiempo en las regiones cerradas del anillo que presentan las paredes de 5 cm, y no en las regiones abiertas del anillo.

- 65 Con el fin de examinar el efecto de estrés temprano, los ratones se situaron en la entrada de una de las zonas del laberinto con las paredes de 5 cm, con el hocico hacia el brazo cerrado, y se dejó que explorasen el LOE durante 5 min. Durante este periodo, se grabó en vídeo el comportamiento animal. Se calculó el tiempo invertido en cada brazo

(cerrado versus abierto), considerando una entrada en un brazo únicamente en el caso de que el animal introdujese sus cuatro patas en el brazo.

Normalmente, los ratones introducidos en el laberinto en O elevado evitarán las regiones abiertas del anillo e invertirán un tiempo limitado a explorar estas zonas. Los ratones estresados por separación materna invierten un tiempo anormalmente prolongado en las secciones abiertas del laberinto en O en comparación con sus hermanos de camada no estresados (fig. 40). Tal como también se observa en la prueba de caja oscura/iluminada, lo anterior refleja un comportamiento de toma de decisiones alterado en los ratones con estrés temprano, que se caracteriza por una asunción de riesgos anormal y excesiva.

El tratamiento con punicalagina de ratones separados de la madre reversionaron y normalizaron su comportamiento anormal de asunción de riesgos excesiva debido a estrés temprano (fig. 40).

Prueba de natación forzada

La prueba de Porsolt o de natación forzada se utiliza comúnmente para someter a ensayo tratamientos antidepresivos (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b). Para este ensayo del comportamiento, se introduce un ratón en un cilindro de 5 l (11 cm de diámetro y 25 cm de altura) lleno en sus dos tercios con agua a 23°C. Se consideró que los animales se encontraban nadando y eran móviles si se producía un claro desplazamiento del cuerpo. Los animales que flotaban con movimiento mínimo durante el periodo de análisis se consideró que estaban inmóviles. Se registró el comportamiento animal durante un periodo de ensayo de 6 minutos utilizando una cámara y un espejo detrás del cilindro. Los primeros 2 minutos y los últimos 4 minutos de la natación se analizaron separadamente para la actividad de natación de los ratones. El nivel creciente de depresión se correlacionó con un incremento de la inmovilidad de los ratones, particularmente durante los últimos 4 minutos. Los animales que habían sufrido estrés temprano mostraron un incremento significativo de la inmovilidad en comparación con sus hermanos de camada no estresados, indicando un nivel elevado de depresión (fig. 41). El tratamiento con punicalagina de ratones con estrés temprano reversionaron este comportamiento anormal (inmovilidad incrementada) e incrementaron la actividad de natación a niveles observados en ratones no estresados. El efecto sobre el comportamiento de la punicalagina demuestra su actividad como antidepresivo (fig. 41).

Condicionamiento de miedo contextual

Se utilizó el condicionamiento de miedo contextual para determinar los efectos de la elagitanina punicalagina sobre la susceptibilidad de los animales adultos, sometidos a estrés temprano, a la ansiedad. Los animales se entrenaron en una cámara de condicionamiento del miedo (contexto A, W x L x H: 30 cm x 24 cm x 26 cm) (PanLab) que contenía un suelo de rejilla con barras de acero inoxidable y que estaba conectado a un generador de descargas desarrollado por Panlab. Durante el entrenamiento, los animales se introdujeron en la cámara uno a uno. Tras cuatro minutos de exploración dentro de la cámara, se administró una descarga en una pata (2 segundos y 0,4 mA), seguido de una segunda descarga en una pata (2 segundos y 0,4 mA) un minuto después. Treinta segundos después de la segunda descarga en una pata, se introdujo nuevamente el ratón en su jaula hábitat. Se monitorizó el comportamiento animal cada 2 segundos durante toda la duración del experimento. El periodo durante el que los ratones estaban inmóviles en la cámara se consideró "parálisis" y se puntuó durante la totalidad de estos periodos. El tiempo durante el que los ratones estaban inmóviles después de la primera descarga se registró durante un periodo de 60 segundos y se expresó como porcentaje.

El comportamiento de los ratones de mantenerse inmóvil y "en parálisis" en respuesta a una descarga en la pata es una medida de su nivel de ansiedad. A mayor duración de la "parálisis" durante este ensayo de comportamiento, mayor nivel de ansiedad del animal.

Las diferencias de parálisis entre los grupos sometidos a ensayo (no estresados normales, estrés temprano y estrés temprano + punicalagina) se observaron después de la primera descarga (fig. 42). El estrés temprano condujo a una ansiedad incrementada en los ratones tal como pone de manifiesto el tiempo de parálisis incrementado tras la descarga en la pata, en comparación con sus hermanos de camada no estresados (fig. 42). El tratamiento con punicalagina redujo y normalizó estos niveles de ansiedad elevados resultantes del estrés temprano, tal como muestra un tiempo de parálisis reducido tras la descarga en la pata (fig. 42). Estas observaciones en el modelo de estrés temprano ilustran los efectos ansiolíticos de la punicalagina.

La ansiedad incrementada experimentada por los animales expuestos a estrés temprano también se observa en la extinción (es decir, la desaparición) de la memoria contextual (es decir, la memoria que asocia el contexto del medio a la descarga) inducida por este ensayo. Para examinar la intensidad de la ansiedad desarrollada durante el condicionamiento de miedo contextual (tal como se ha descrito anteriormente), los animales se introdujeron en la misma cámara y contexto durante 3 min diariamente (mismo momento del día, sin embargo, sin aplicar descarga en esta ocasión) durante los 12 días que siguieron a los ensayos iniciales. El comportamiento de parálisis inducido por el simple reconocimiento por los animales de la cámara, donde recibieron la descarga inicial, se midió durante cada uno de dichos periodos diarios de 3 minutos.

Los grupos de animales (no estresados normales, estrés temprano y estrés temprano + punicalagina) mostraron diferencias en el declive de su recuerdo contextual de la descarga durante los siguientes 12 días (fig. 43). En este gráfico, la duración de la parálisis se presenta como porcentaje de tiempo inmóvil el día 1 (por ejemplo, si el ratón estuviese inmóvil durante 60 segundos el día 1 y 30 segundos el día 8, el porcentaje de inmovilidad sería de 100% el día 1 y de 50% el día 8).

Los ratones no estresados normales mostraron un declive predecible del recuerdo contextual durante el periodo de 12 días (fig. 43). Los ratones con estrés temprano presentaron un recuerdo contextual aumentado, lo que se ilustra por un nivel más elevado de parálisis que sus hermanos de camada no estresados (fig. 43). Lo anterior muestra un nivel elevado prolongado de ansiedad en estos ratones separados de la madre. El tratamiento con punicalagina de los ratones con estrés temprano presentó un claro impacto sobre la reducción de la ansiedad, según se observa por la extinción del recuerdo contextual. Los ratones con estrés temprano tratados mostraron una extinción más rápida que los ratones con estrés temprano no tratados, caracterizado por un periodo de tiempo reducido en parálisis entre los días 8 y 12 (fig. 43).

Rotarod

Para medir los efectos de los compuestos derivados de granada sobre los impactos cognitivos negativos de la separación materna, se sometieron a ensayo los efectos sobre el aprendizaje motor utilizando el ensayo comportamental Rotarod. El aparato Rotarod consiste en una barra de 2 cm de diámetro. Se coloca un ratón sobre un rodillo en rotación que se inicia a una velocidad inicial de 5 rpm. La velocidad del rodillo se acelera gradualmente a una tasa de 8 rpm/min hasta alcanzar una velocidad de 45 rpm. Se midió la latencia hasta la caída con un tiempo de corte de 300 s. Tal como se muestra en la fig. 44, los ratones que habían sufrido estrés temprano sufrieron de un aprendizaje motor disminuido. Los ratones separados de la madre cayeron del Rotarod más rápidamente que los ratones no estresados normales. El tratamiento con punicalagina restauró las habilidades de aprendizaje motor en los animales con estrés temprano hasta niveles de rendimiento observados en hermanos de camada no estresados normales.

Laberinto acuático de Morris

El ensayo comportamental en el laberinto acuático de Morris se utilizó para evaluar el impacto cognitivo de la separación materna. En el presente ensayo, se mide el aprendizaje cognitivo por la capacidad de un ratón de localizar una plataforma oculta en una piscina de agua opaca. El aparato consiste en una piscina (diámetro de 140 cm) llena con agua a 22°C. Los ratones escapan del agua nadando hasta una plataforma circular oculta (15 cm de diámetro) situada 1 cm bajo la superficie del agua. Mediante la utilización de claves visuales situadas fuera del laberinto, los ratones son capaces de localizar la plataforma y recordar su localización durante las pruebas posteriores. Durante la etapa de entrenamiento, se colocaron los ratones en dos posiciones iniciales (alternantes) cada hora. La tarea en el laberinto acuático de Morris se llevó a cabo con 8 pruebas en T1, 6 pruebas en T2 y 4 pruebas en T3 (los días 1, 2 y 3). Los ratones disponían de un máximo de 60 s para alcanzar la plataforma. Se midió la latencia de escape para alcanzar la plataforma mediante un sistema de supervisión por vídeo. Tal como puede observarse en la fig. 45, el estrés temprano presentó un impacto significativo sobre el aprendizaje cognitivo, tardando los ratones un periodo de tiempo más largo en aprender la localización de la plataforma oculta, tal como muestra la latencia de escape incrementada versus los ratones no estresados normales. El tratamiento de estos ratones separados de la madre con punicalagina revertió dicho impacto negativo del estrés temprano, reduciendo el tiempo para aprender la localización de la plataforma oculta hasta los niveles observados en ratones no estresados normales. Estos resultados demuestran la capacidad de la punicalagina de revertir los impactos cognitivos negativos a largo plazo del estrés temprano sobre el aprendizaje y la formación de memoria.

Compuestos derivados de la granada

Conjuntamente, los datos demuestran que los compuestos derivados de la elagitáninas son capaces de revertir el impacto negativo a largo plazo de la separación temprana sobre la depresión, ansiedad y cognición.

Ejemplo 20

Efectos de los compuestos derivados de granada sobre la memoria y la cognición en ratones normales

Tratamiento con compuestos derivados de granada

Desde los 3 meses de edad, los ratones se alimentaron: (i) una dieta de control estándar, tal como AIN-93G, (ii) una dieta que contenía punicalagina a una concentración de 0,87 mg/kg, de manera que administrase una dosis aproximada de 90 mg/kg/día (durante un periodo de 3 meses), o (iii) una dieta que contenía urolitina A a una concentración de 0,57 mg/kg, de manera que administrase una dosis aproximada 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 del peso del ratón. Se midió la evaluación comportamental de la cognición después de este periodo.

Ensayo comportamental para medir los efectos de los compuestos derivados de la granada sobre la cognición

Para examinar el efecto de los compuestos derivados de la granada sobre la memoria y la cognición, se examinaron los ratones para mejorar en la memoria contextual utilizando el ensayo de condicionamiento de miedo contextual. Se entrenaron los ratones en una cámara de condicionamiento del miedo tal como se describe en el Ejemplo 19.

Durante el entrenamiento, los animales se introdujeron en la cámara de uno en uno. Tras cuatro minutos de exploración dentro de la cámara, se administró una descarga en una pata (2 segundos y 0,4 mA), seguido de una segunda descarga en una pata (2 segundos y 0,4 mA) un minuto después. Treinta segundos después de la segunda descarga en una pata, se introdujo nuevamente el ratón en su jaula hábitat.

Un día después, los animales entrenados fueron devueltos a la cámara durante un periodo de tres minutos. Durante este periodo, se monitorizaron los ratones para su movimiento. La cantidad de tiempo inmóvil o "paralizado" se puntuó como porcentaje del tiempo total (3 minutos) de observación. El tiempo inmóvil es una medida de la intensidad de la memoria de los ratones de recordar el contexto en el que han sido entrenados. El tratamiento con la elagitanina punicalagina derivada de la granada y el metabolito del ácido elágico urolitina A condujo a mejoras significativas de la memoria contextual respecto a los ratones de control no tratados según se determina a partir de su memoria contextual 24 horas después del periodo de entrenamiento (fig. 46).

Para determinar el efecto de estos compuestos derivados de la granada sobre la retención de memoria, 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 respecto a su recuerdo de memoria los días 1, 2, 3, 4 y 5 después del entrenamiento inicial de miedo contextual.

Se introdujeron los animales en la misma cámara y contexto durante 3 min diariamente (mismo momento del día, sin embargo, sin descarga en esta ocasión) durante los 5 días siguientes a los ensayos iniciales. El comportamiento de parálisis inducido por el simple reconocimiento contextual por los animales de la cámara, donde habían recibido la descarga inicial, se midió durante cada uno de dichos periodos diarios de 3 minutos. La capacidad de reconocer este entorno en ausencia del estímulo es una medida de la memoria contextual.

Con cada día posterior, los ratones no tratados de control empezaron a extinguir su memoria de dicho estímulo contextual, tal como pone de manifiesto la reducción del grado de parálisis (fig. 47). Los ratones tratados con punicalagina o urolitina A mostraron una retención de memoria mejorada en comparación con los ratones no tratados de control. Lo anterior se ilustra por la capacidad de recordar el contexto inicial durante un periodo más largo, lo que se pone de manifiesto en el periodo significativamente más largo hasta la extinción de la memoria contextual (fig. 47).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con punicalagina o con urolitina A conduce a una cognición mejorada, tal como pone de manifiesto un incremento significativo del reconocimiento del contexto y una retención de memoria mejorada.

Ejemplo 21*Efectos de los compuestos derivados de la granada sobre la mejora del rendimiento muscular en ratones normales*

Se evaluaron los compuestos derivados de elagitanina punicalagina y urolitina A para su capacidad de mejorar el rendimiento muscular. Para examinar los beneficios de la punicalagina y la urolitina en la mejora del rendimiento muscular, se examinaron sus efectos utilizando dos ensayos del comportamiento: (i) el ensayo Rotarod, que mide el rendimiento muscular y las habilidades motoras, incluyendo la coordinación, y (ii) la prueba de resistencia en cinta rodante, que mide el rendimiento y resistencia musculares.

*Ensayos comportamentales para medir los efectos de los compuestos derivados de la granada sobre el rendimiento muscular**Ensayo Rotarod*

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

Para examinar el efecto de los compuestos derivados de la granada sobre el rendimiento muscular y las habilidades motoras, los ratones se sometieron a ensayo en el ensayo de comportamiento Rotarod. El aparato Rotarod consiste en un rodillo con un diámetro de 2 cm con 5 compartimento, de 5 cm de anchura. Se coloca un ratón sobre un rodillo en rotación que se inicia a una velocidad inicial de 5 rpm. La velocidad del rodillo se acelera gradualmente a razón de 8 rpm/min. Se midió la latencia hasta la caída con un tiempo de corte de 300 segundos. Los ratones se sometieron a ensayo en cuatro pruebas. La latencia hasta la caída es una medida del rendimiento muscular y habilidades motoras de los ratones, en donde un mejor rendimiento se refleja en una latencia hasta la caída más larga. Se sometieron a

ensayo tanto ratones de control no tratados como ratones tratados con punicalagina. La elagitanina 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 mantenerse sobre el Rotarod durante un tiempo más prolongado y a velocidades más elevadas que los ratones no tratados durante periodos de prueba secuenciales (fig. 48).

Prueba 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 para roedores estándar (dieta estándar) o una dieta que contenía urolitina A mezclada con el alimento hasta alcanzar una dosis de 55 mg/kg/día administrada en los ratones. Tras 6 semanas de tratamiento, los ratones fueron sometidos a ensayo para su rendimiento muscular mediante una prueba de resistencia.

Se llevó a cabo una prueba de resistencia utilizando una cinta rodante de velocidad variable encerrada en una cámara de plexiglás con un dispositivo de estímulo consistente en una rejilla de descarga unida a la parte posterior de la cinta (Panlab, Barcelona, España). Los ratones se hicieron correr a 10 cm/s y con 0° de pendiente durante 5 min. A continuación, se incrementó la velocidad en 2 cm/s cada 5 min hasta agotar los ratones. Se registró la distancia recorrida y el número de descargas obtenido en intervalos de 5 min. Los ratones se consideraron agotados y se retiraron del experimento una vez habían recibido aproximadamente 20 descargas en un periodo de 1 min. Los ratones de control no tratados y los tratados con urolitina A se sometieron a ensayo y se compararon para su rendimiento.

El rendimiento y resistencia musculares mejorados se reflejan en la capacidad de correr a velocidades más altas en la cinta rodante. Los ratones intentarán evitar la descarga y correrán a pesar de la velocidad creciente. En un punto determinado, los ratones no podrán mantener la velocidad de la cinta y recibirán una descarga. Tras alcanzar los niveles umbral de descarga, los ratones son retirados de la cinta. Los ratones que presentan mejor rendimiento muscular y una resistencia mejorada podrán mantener la velocidad creciente de la cinta rodante y experimentarán menos descargas a una velocidad particular. Los ratones tratados con urolitina A corrieron a velocidades más elevada que los ratones de control no tratados en el presente ensayo comportamental, ilustrando que la urolitina A mejoraba el rendimiento y resistencia musculares en este contexto (fig. 49).

Estos resultados demuestran que la elagitanina 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.
- 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.
- Cerda, B., P. Periago, et al. (2005). "Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon micro flora from ellagic acid and related compounds." *J. Agric. Food Chem.* 53(14): 5571-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. USA* 73(7): 2424-8.
- 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.
- 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.

- 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.
- Joels, M., Z. Pu, et al. (2006). "Learning under stress: how does it work?" *Trends Cogn. Sci.* 10(4): 152-8.
- 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 suppl): 313S-316S.
- 5 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.
- 10 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.
- 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.
- 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.
- 15 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.
- Roozendaal, B. (2003). "Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval." *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27(8): 1213-23.
- 20 Rozovsky, I., M. Wei, et al. (2005). "Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP." *Neurobiol. Aging* 26(5): 705-15.
- 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.
- 25 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.
- 30 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.
- Tanaka, K., G. Nonaka, et al. (1986). "Tannins and Related Compounds. XLI. 1) Isolation and Characterization of Novel Ellagitannins, Punicalcortins A, B, C, and Punigluconin from the bark of *Punica granatum* L." *Chem. Pharm. Bull* 34(2): 656-663.
- 35 Tanaka, K., G. Nonaka, et al. (1986). "Tannins and Related Compounds. XLI. 1) Isolation and Characterization of Novel Ellagitannins, Punicalcortins A, B, C, and Punigluconin from the bark of *Punica granatum* L." *Chem. Pharm. Bull* 34(2): 656-663.
- 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.
- 40 Trifunovic, A., A. Wredenberg, et al. (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature* 429(6990): 417-23.
- 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.
- 45 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.
- Xiao, J., A. Pradhan, et al. (2006). "Functional role of JNK in neurite outgrowth of PC12-N1 cells." *Neurosci. Lett.* 392(3): 231-4.
- 50 Yang, G., F. Pan, et al. (2009). "Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories." *Nature* 462(7275): 920-4.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> Amazentis SA
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y TRATAR LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y TRASTORNOS COGNITIVOS
- <130> AZX-005.25
- <150> US 61/426957
- 60 <151> 2010-12-23

<160> 18
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 1
 10 aagtgtggaa ctctctggaa ctg 23
 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 2
 ggggtatctt ggttgcttt atg 23
 <210> 3
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 3
 aagtgtttt ccagcatggg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 4
 ggctgcaatt ttctaacca 20
 35 <210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 5
 tcatggaata gagcgcc 17

	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 6 gtgtgctcac cgattctaca	20
10	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 7 cccatgtgct cctaccagat	20
20	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8 cctgaagaa gcgaccttg	20
25	<210> 9 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 9 gatcgcaatg ggtgctttg atagaa	26
35	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 10 agctgattgg caatgtctcc agcaaa	26
	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
 gtagcttatg aatgtgtgca actc 24

5 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
 gtcttgcatg cagctctttc attc 24

15 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 13
 gcacacattt cccacactg 20

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

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
 cccaacctgc ccattctgat 20

30 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 15
 tccatcaggg tatcctctcc 20

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

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
 ggaggcaagc ataagactgg 20

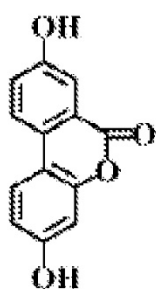
	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
	acgtcaaagg gtacctgtcc a	21
10	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 18	
	caatcccaga tggcagaact t	21

REIVINDICACIONES

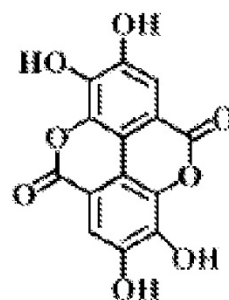
- 5 1. Urolitina para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad muscular, una condición patológica relacionada con los músculos, una miopatía, una distrofia muscular, un trastorno musculoesquelético o una enfermedad neuromuscular.
- 10 2. Urolitina para la utilización según la reivindicación 1, en la que la urolitina está destinada a la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad muscular o condición patológica relacionada con los músculos.
- 15 3. Urolitina para la utilización según la reivindicación 1, en la que la urolitina está destinada a la utilización en el tratamiento o prevención de una miopatía.
- 20 4. Urolitina para la utilización según la reivindicación 1, en la que la urolitina está destinada a la utilización en el tratamiento o prevención de un trastorno musculoesquelético.
- 25 5. Urolitina para la utilización según la reivindicación 1, en la que la urolitina está destinada a la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en distrofia muscular de Duchenne, sarcopenia aguda y atrofia muscular, y/o caquexia asociada a quemaduras, reposo en cama, inmovilización de extremidades o cirugía torácica, abdominal y/o ortopédica mayor.
- 30 6. Urolitina para la utilización según la reivindicación 5, en la que la urolitina está destinada a la utilización en el tratamiento o la prevención de la distrofia muscular de Duchenne.
- 35 7. Utilización de una urolitina para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de una enfermedad muscular, una condición patológica relacionada con los músculos, una miopatía, una distrofia muscular, un trastorno musculoesquelético o una enfermedad neuromuscular.
- 40 8. Composición que comprende una urolitina para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad muscular, una condición patológica relacionada con los músculos, una miopatía, una distrofia muscular, un trastorno musculoesquelético o una enfermedad neuromuscular.
- 45 9. Composición para la utilización según la reivindicación 8, en la que la composición es una composición farmacéutica que comprende una urolitina y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. Urolitina para la utilización, utilización de una urolitina, o una composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la utilización es en el tratamiento de la condición, miopatía, distrofia, trastorno o enfermedad.
- 55 11. Urolitina para la utilización, utilización de una urolitina, o una composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la utilización es el tratamiento de una condición seleccionada de atrofia muscular y caquexia asociada a quemaduras, reposo en cama, inmovilización de extremidades, o cirugía torácica, abdominal y/o ortopédica mayor.
- 60 12. Método no terapéutico de mejora o mantenimiento del rendimiento muscular, reducción de la fatiga muscular y/o incremento o mantenimiento de la masa muscular, potenciación del rendimiento deportivo, potenciación de la capacidad de trabajo, inhibición o retraso de la fatiga física, reducción de la fatiga muscular o mejora de la función muscular, en un sujeto sano, que comprende administrar una cantidad eficaz de una urolitina o una composición que comprende urolitina en un sujeto.
- 65 13. Método según la reivindicación 12, que es un método para mejorar o mantener el rendimiento muscular.
14. Método según la reivindicación 12 o 13, en el que la mejora o mantenimiento del rendimiento muscular comprende incrementos de la actividad mitocondrial, biogénesis mitocondrial y/o incremento de la masa mitocondrial en el músculo.
15. Método según la reivindicación 12 o 13, en el que el rendimiento muscular se selecciona del grupo que consiste en fuerza, velocidad y resistencia.
16. Método según la reivindicación 12, que es un método para reducir la fatiga muscular.
17. Método según la reivindicación 12, que es un método para incrementar o mantener la masa muscular.
18. Método según la reivindicación 12, que es un método para potenciar el rendimiento muscular.
19. Método según la reivindicación 12, que es un método para potenciar la capacidad de trabajo.

20. Método según la reivindicación 12, que es un método para inhibir o retrasar la fatiga muscular.
- 5 21. Método según la reivindicación 12, que es un método para mejorar la función muscular.
22. Composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 21, en la que la composición es un producto alimentario, aditivo alimentario, ingrediente alimentario, alimento funcional, alimento médico, complemento dietético, nutracéutico, complemento nutricional o preparación oral.
- 10 23. Urolitina para la utilización, utilización de una urolitina, una composición para la utilización o un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la que la urolitina es la urolitina A.
24. Urolitina para la utilización, utilización de una urolitina, una composición para la utilización o un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la que la urolitina es la urolitina B, la urolitina C o la urolitina D.
- 15 25. Urolitina para la utilización, utilización de una urolitina, una composición para la utilización o un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la que la urolitina o composición que comprende la urolitina se administra por vía oral.
- 20

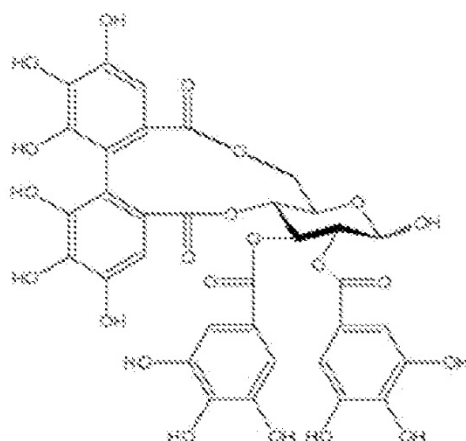
Figura 1



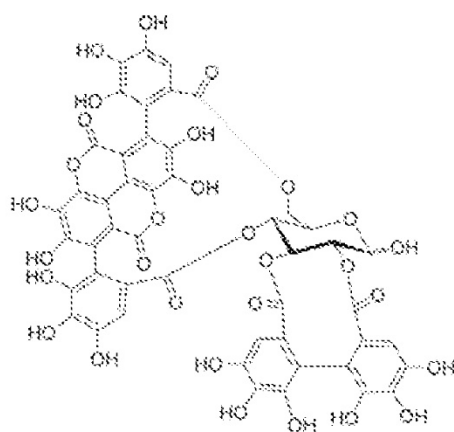
Urolitina A (UA)



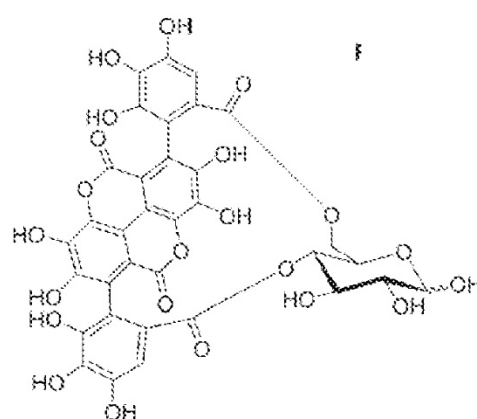
Ácido elágico (AE)



Telimagrandina (TL)



Punicalagina (PA)



Punicalina (PB)

Figura 2

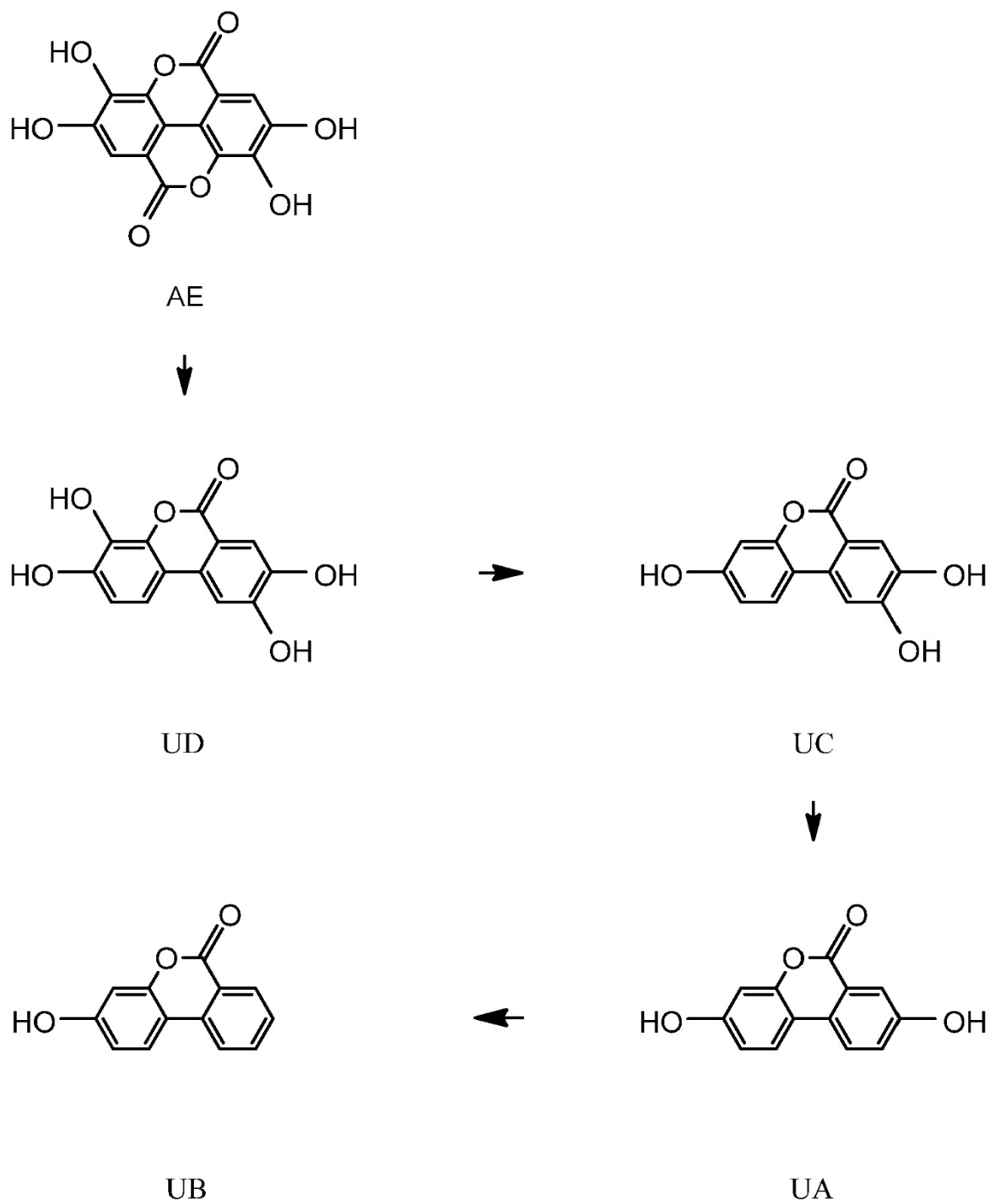


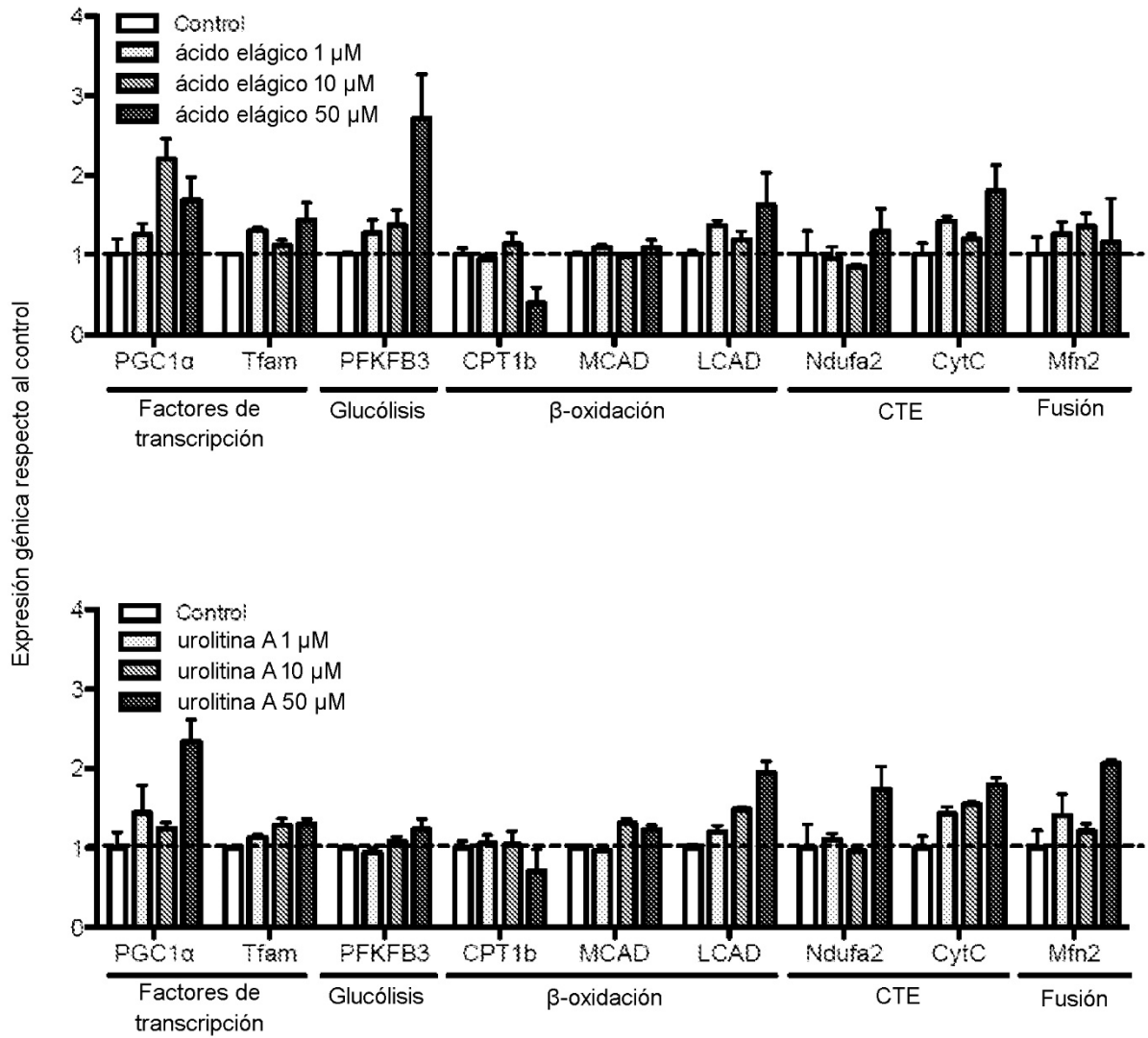
Figura 3

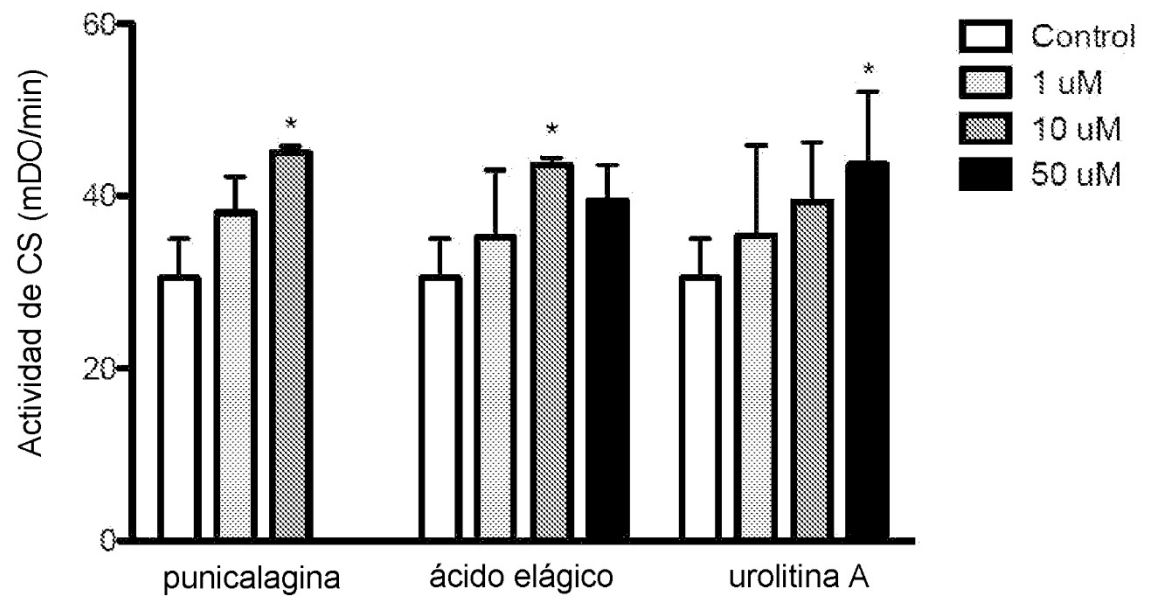
Figura 4

Figura 5**A**

IB : P-AMPK

**B**

IB : AMPK



Control

RSV

AE 50 μ M

IB : P-AMPK



IB : AMPK



Control

RSV

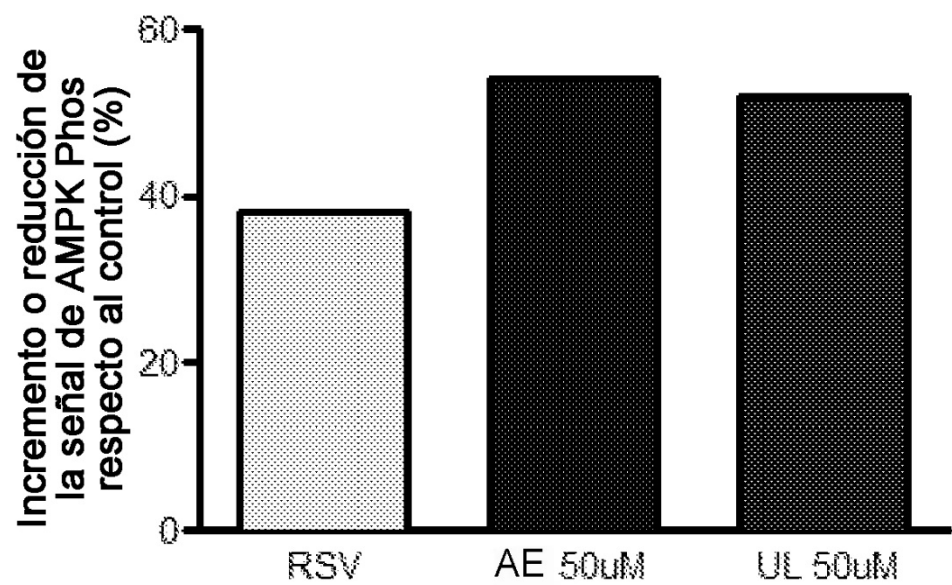
UA 50 μ M

Figura 6

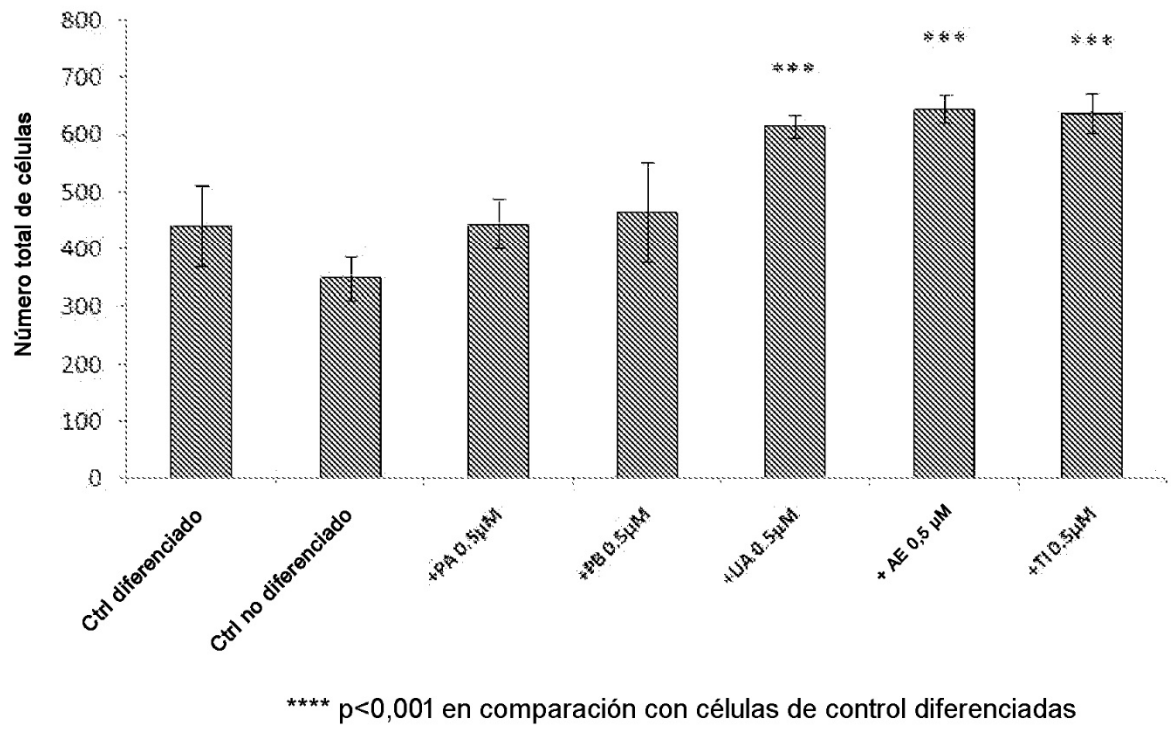
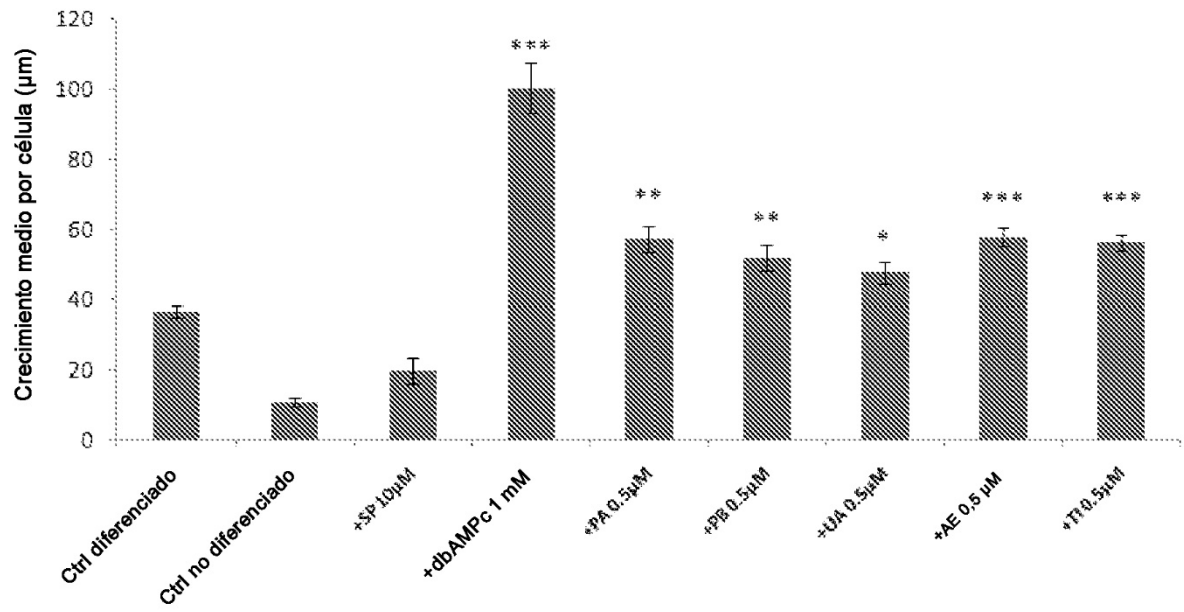
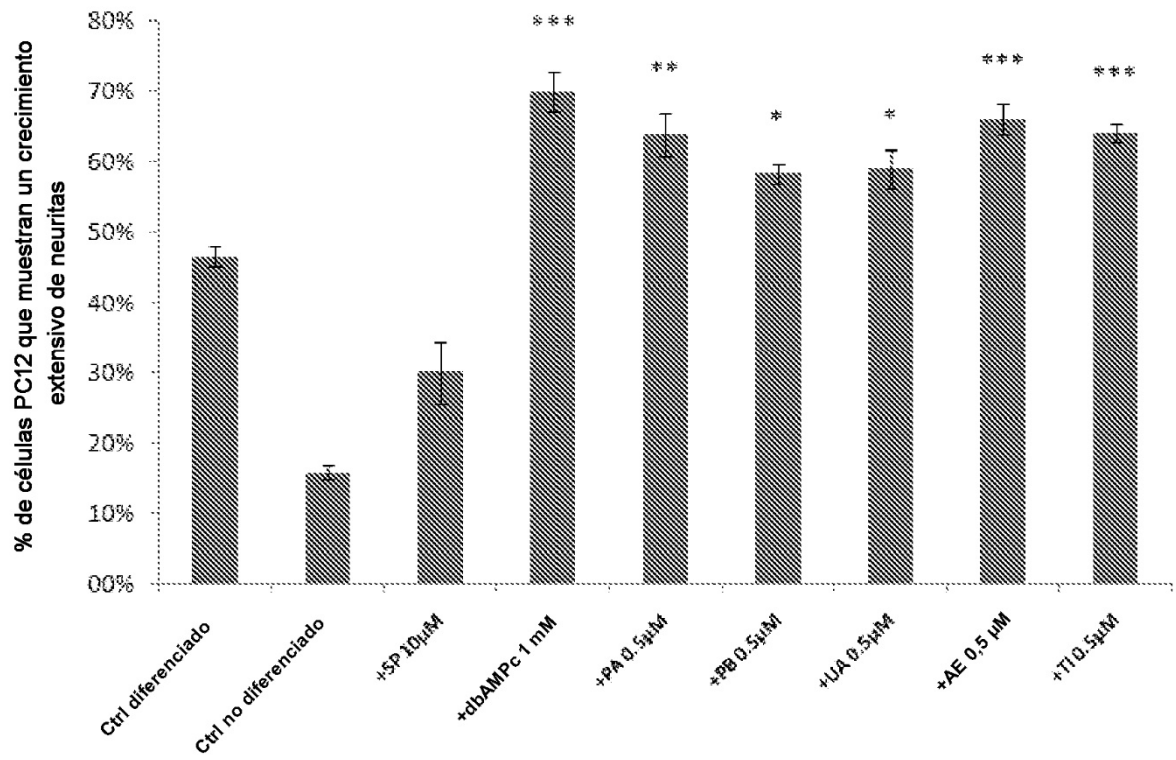


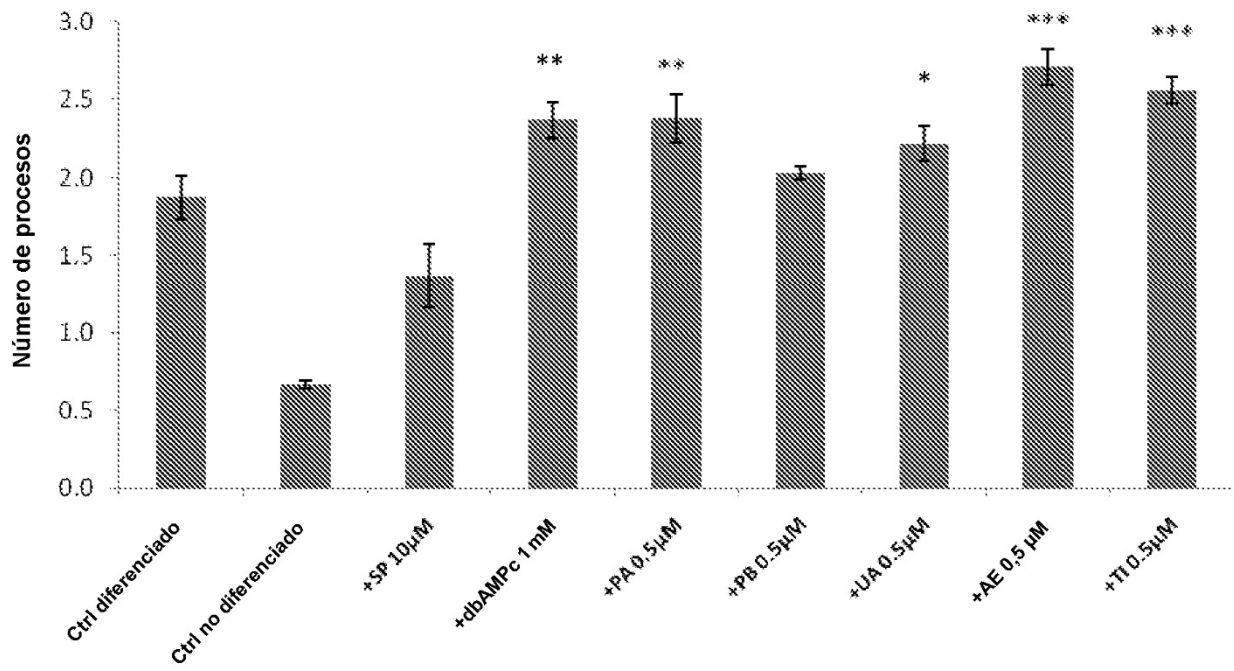
Figura 7



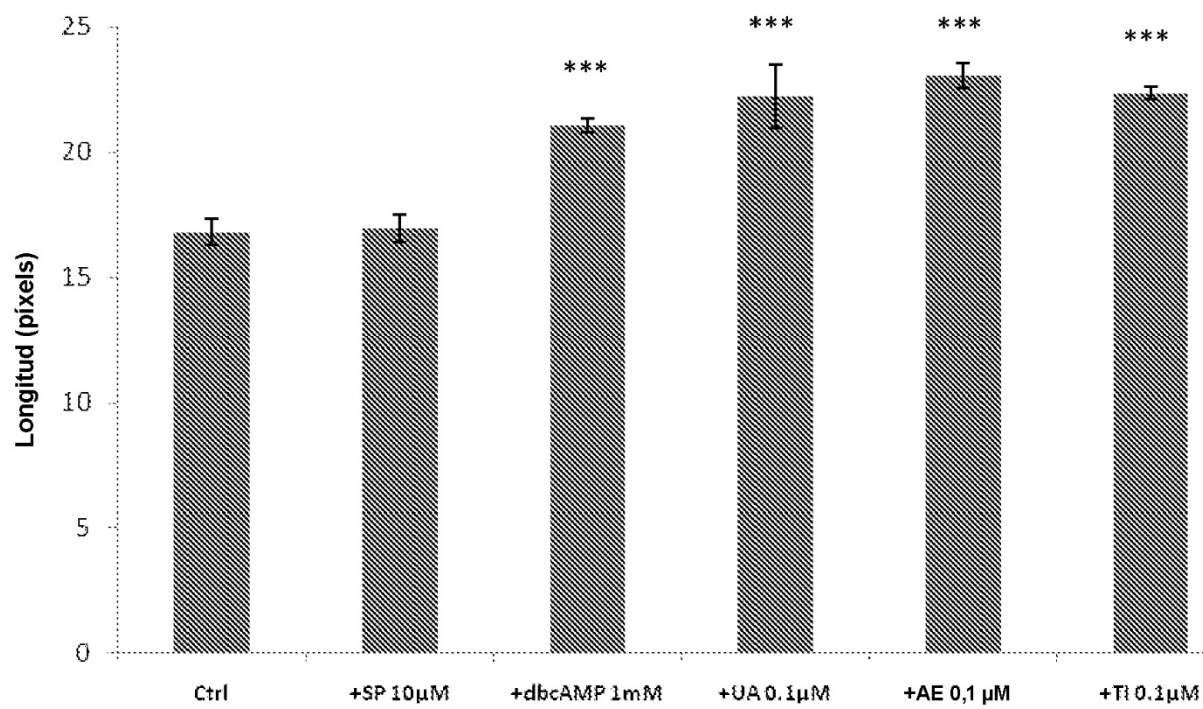
* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 en comparación con células de control diferenciadas

Figura 8

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

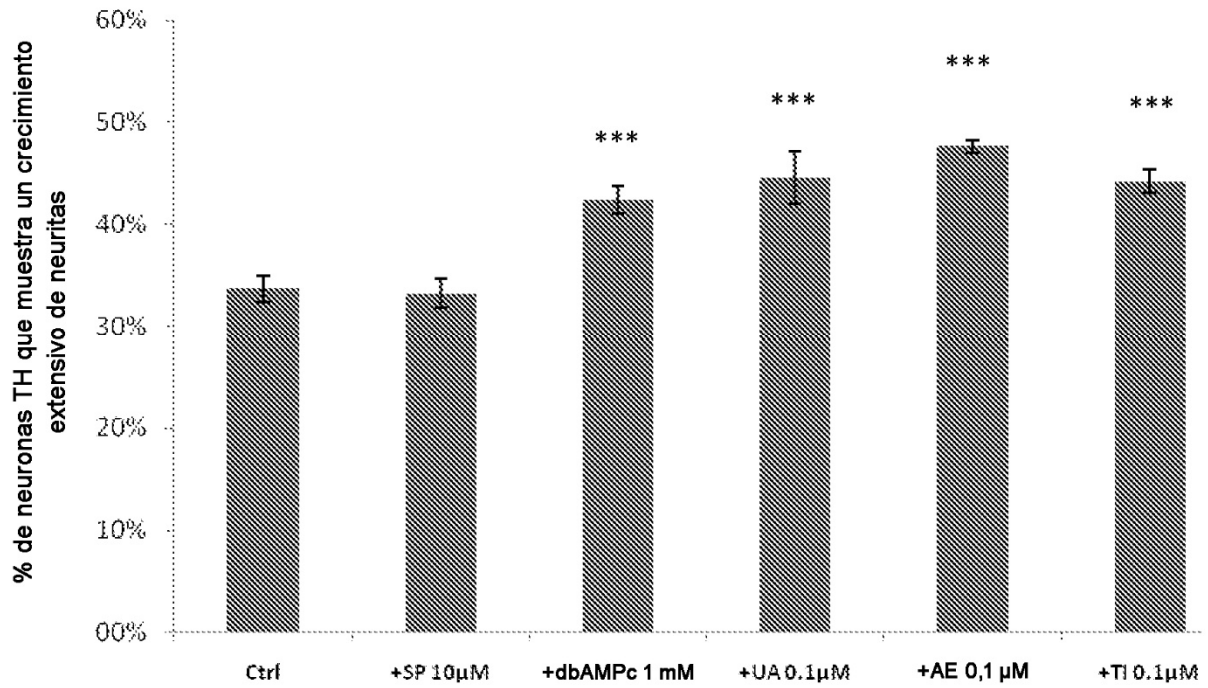
Figura 9

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con células de control no diferenciadas

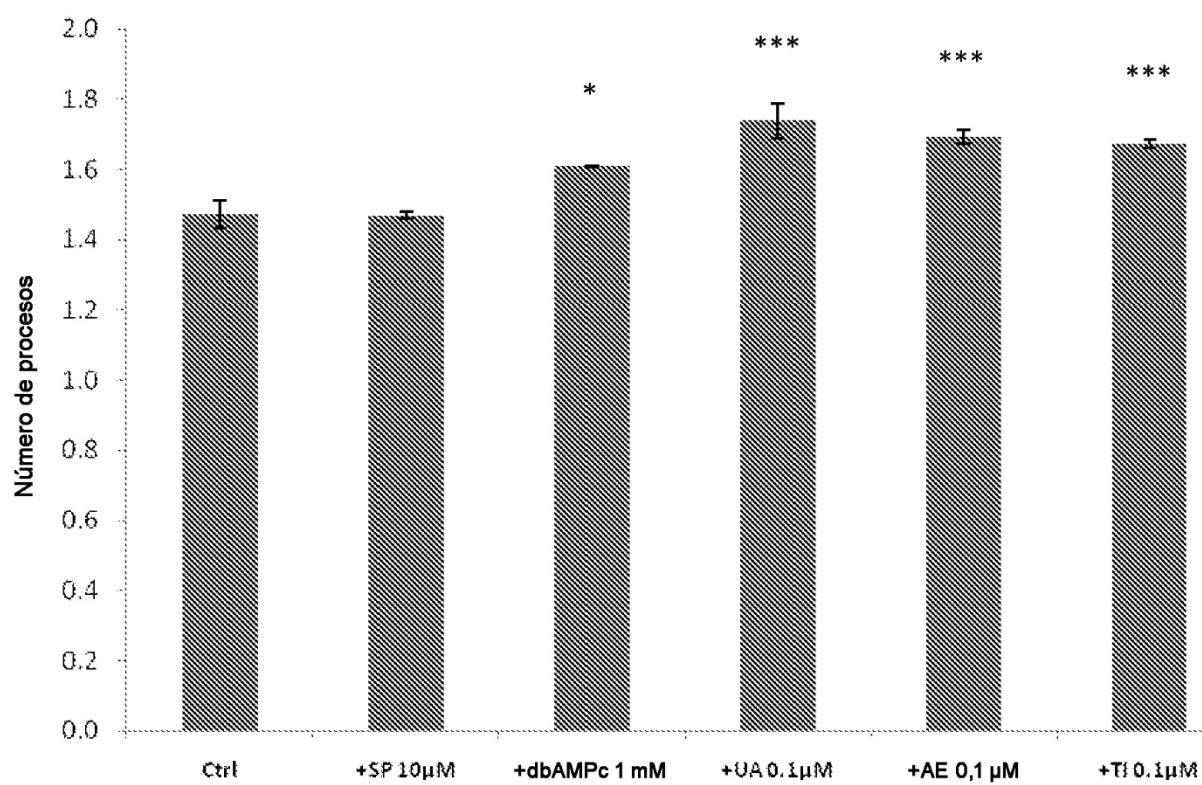
Figura 10

*** $p < 0,001$ en comparación con células de control diferenciadas

Figura 11



*** $p < 0,001$ en comparación con células de control diferenciadas

Figura 12

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

Figura 13

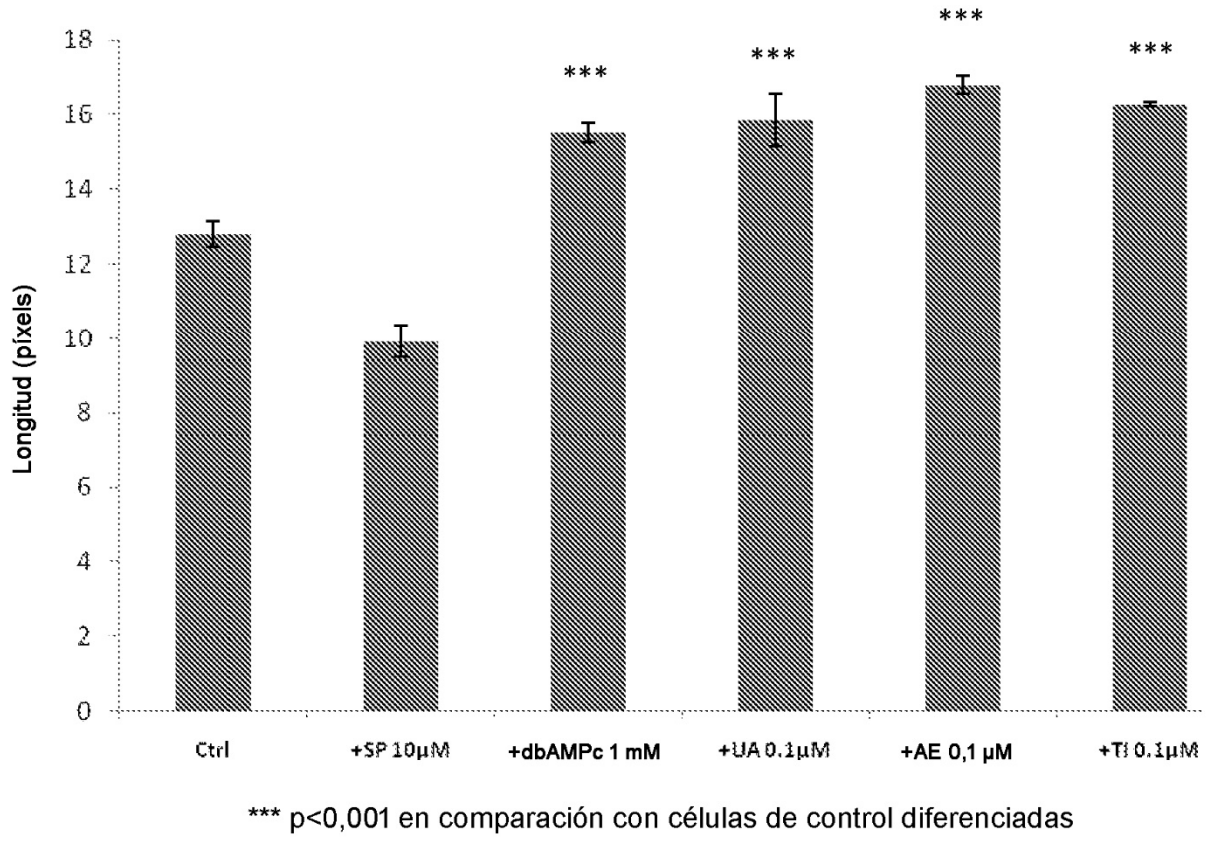
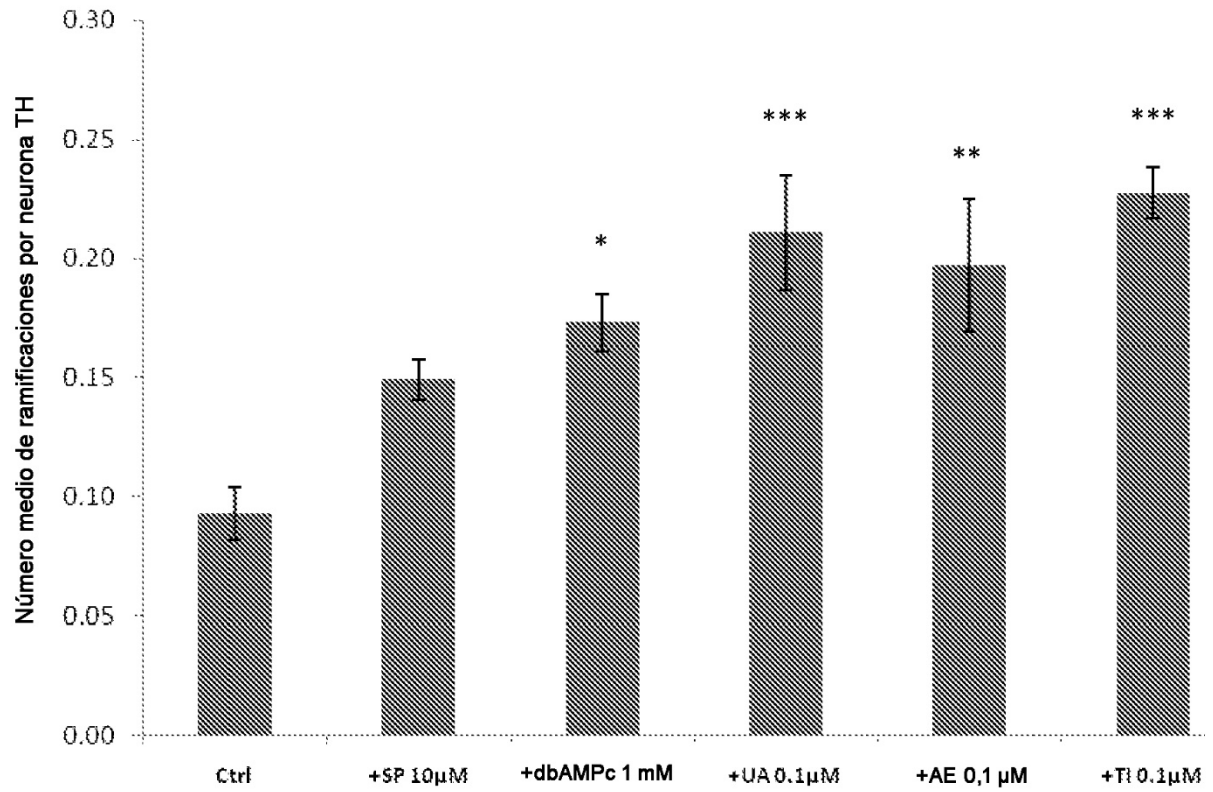


Figura 14

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

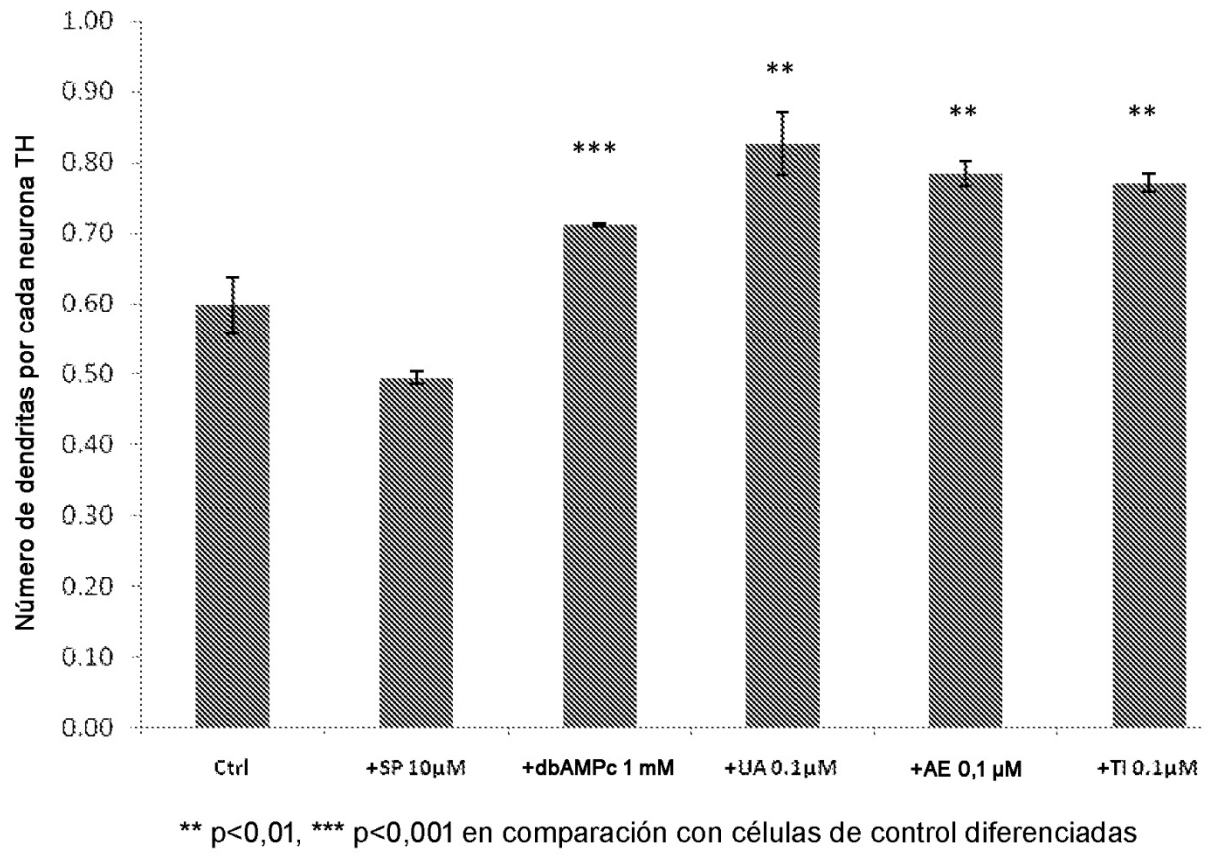
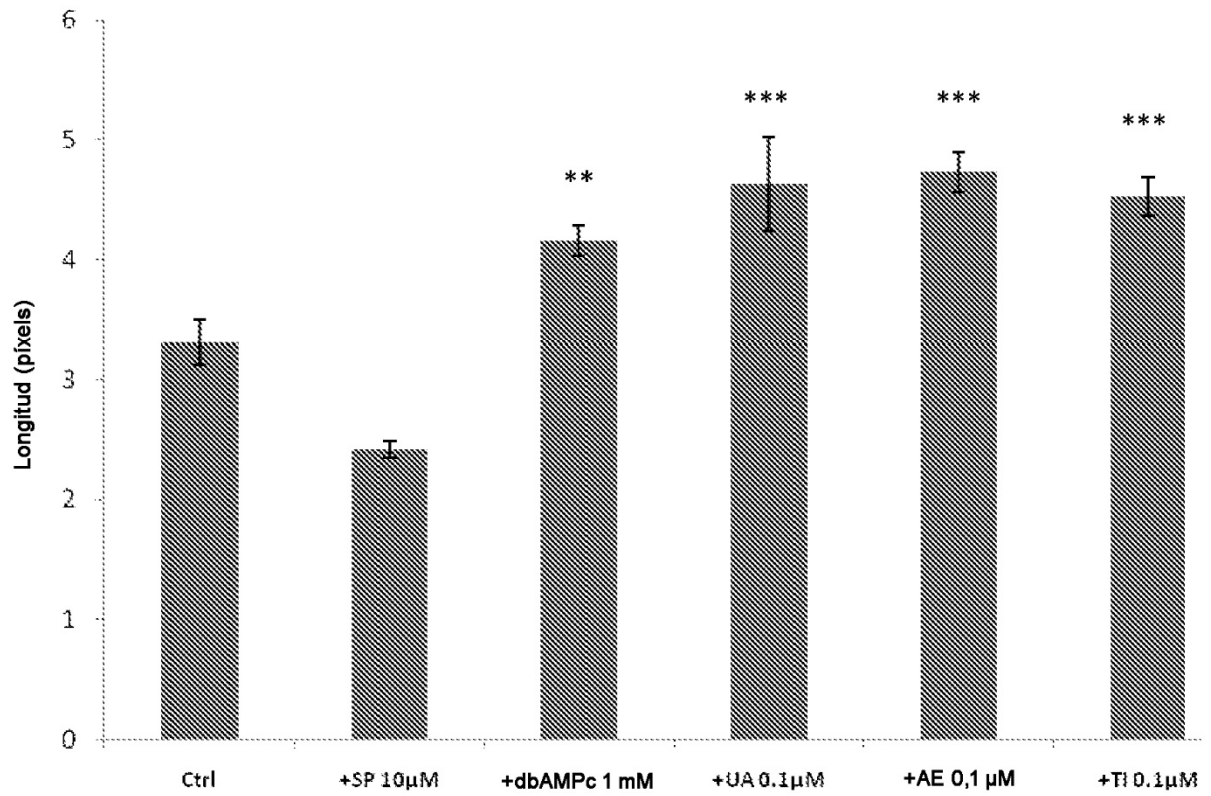
Figura 15

Figura 16

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con células de control diferenciadas

Figura 17A

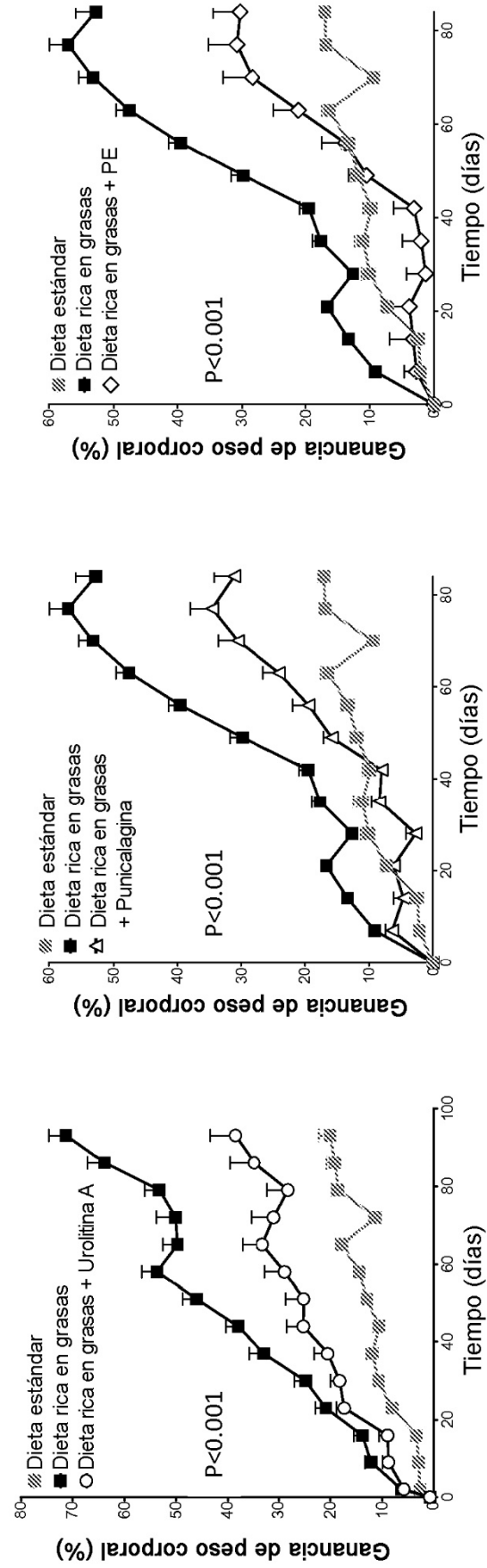


Figura 17B

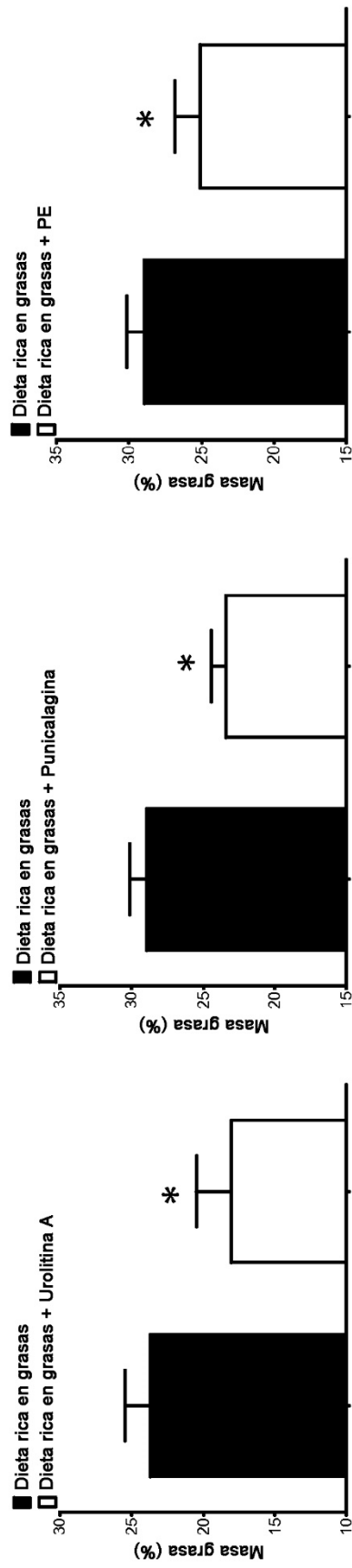


Figura 17C

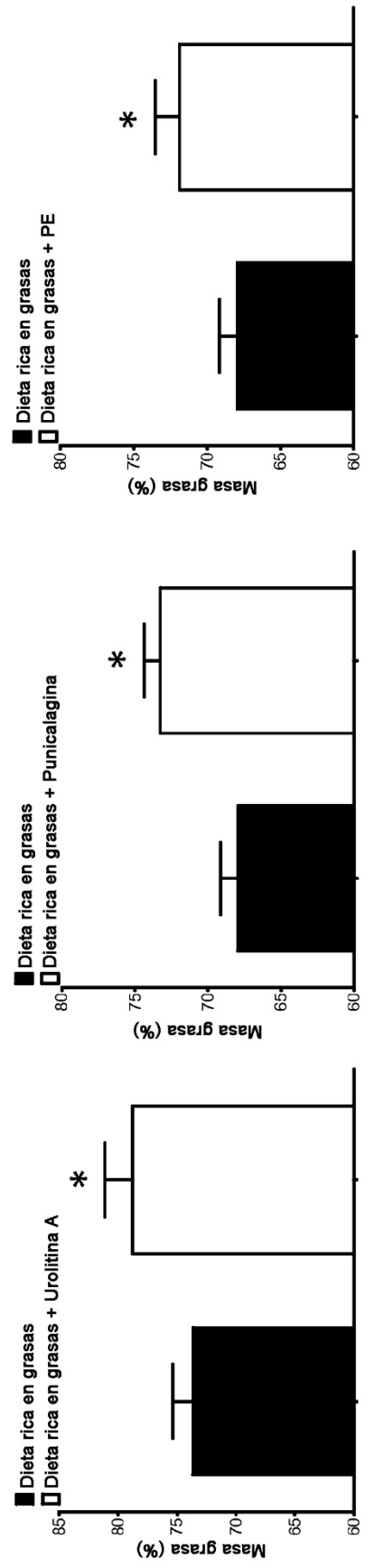
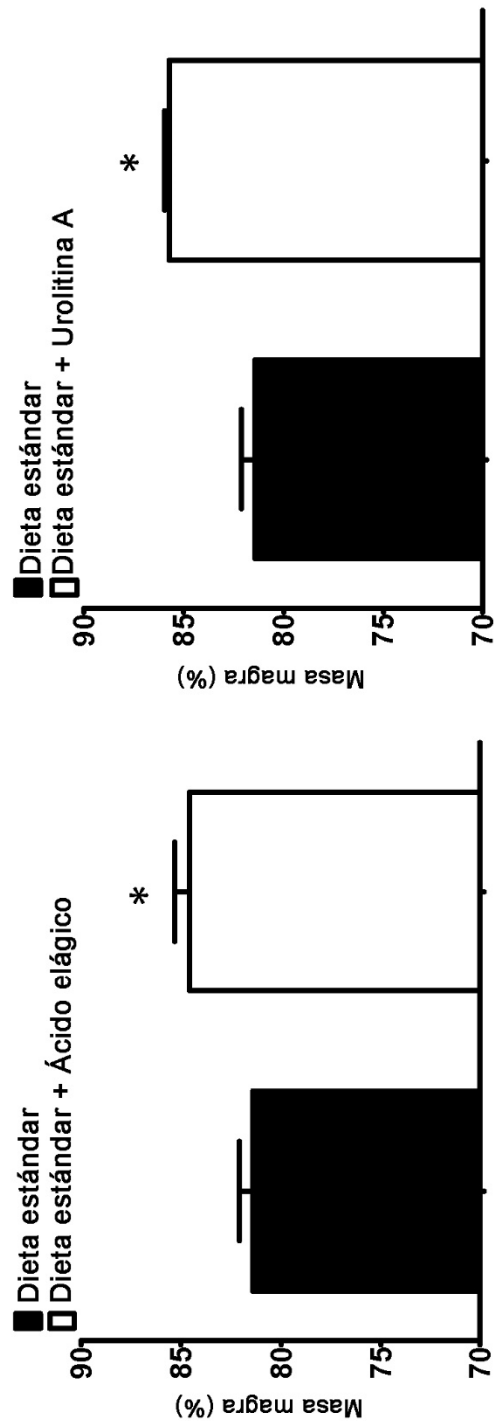


Figura 18

A



B

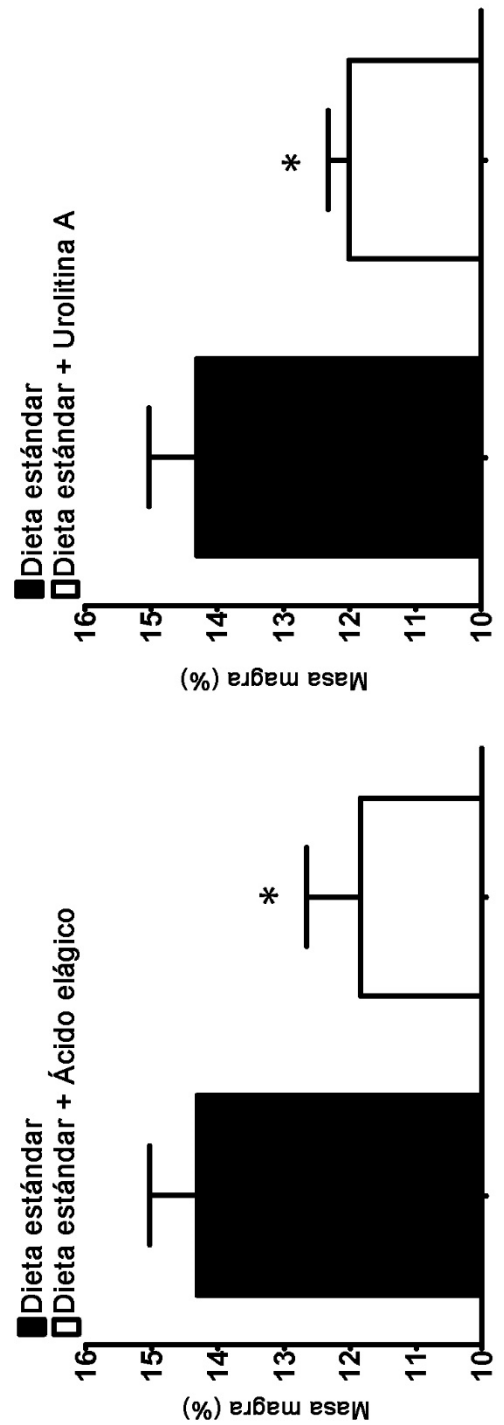
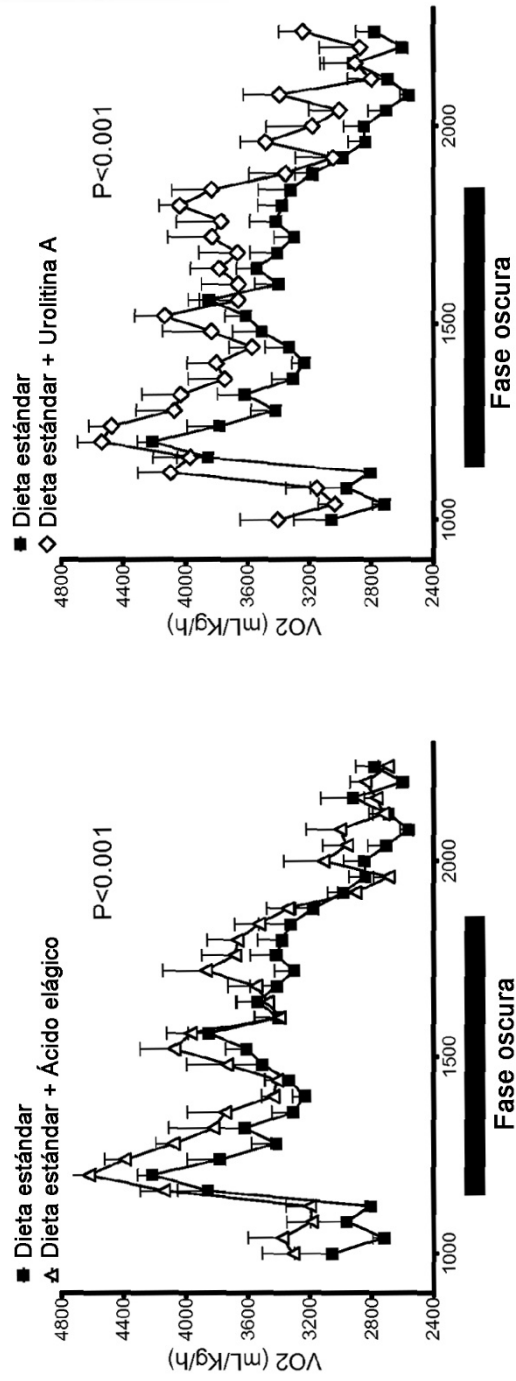


Figura 19

A



B

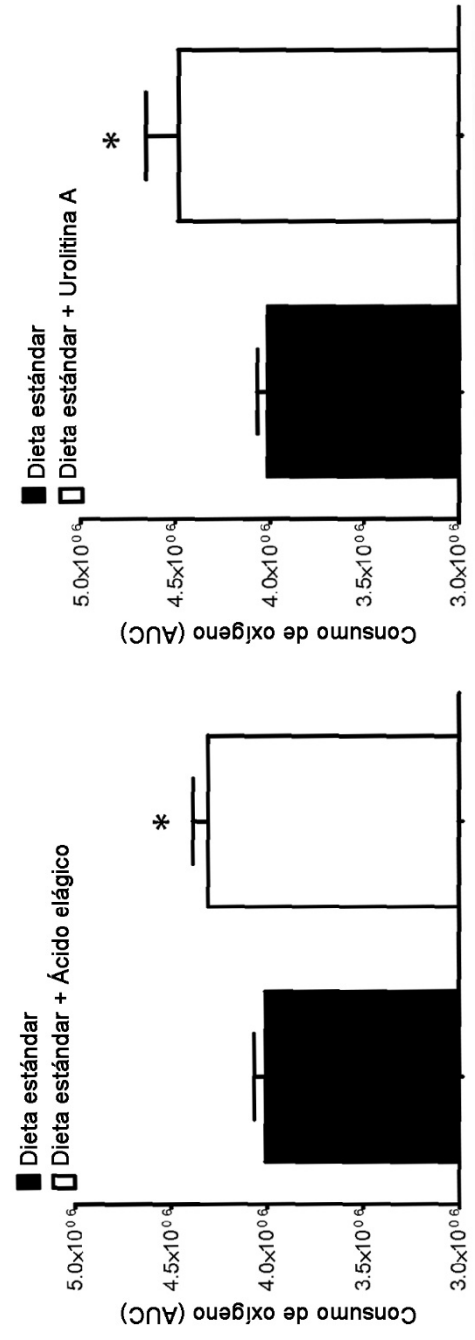


Figura 20

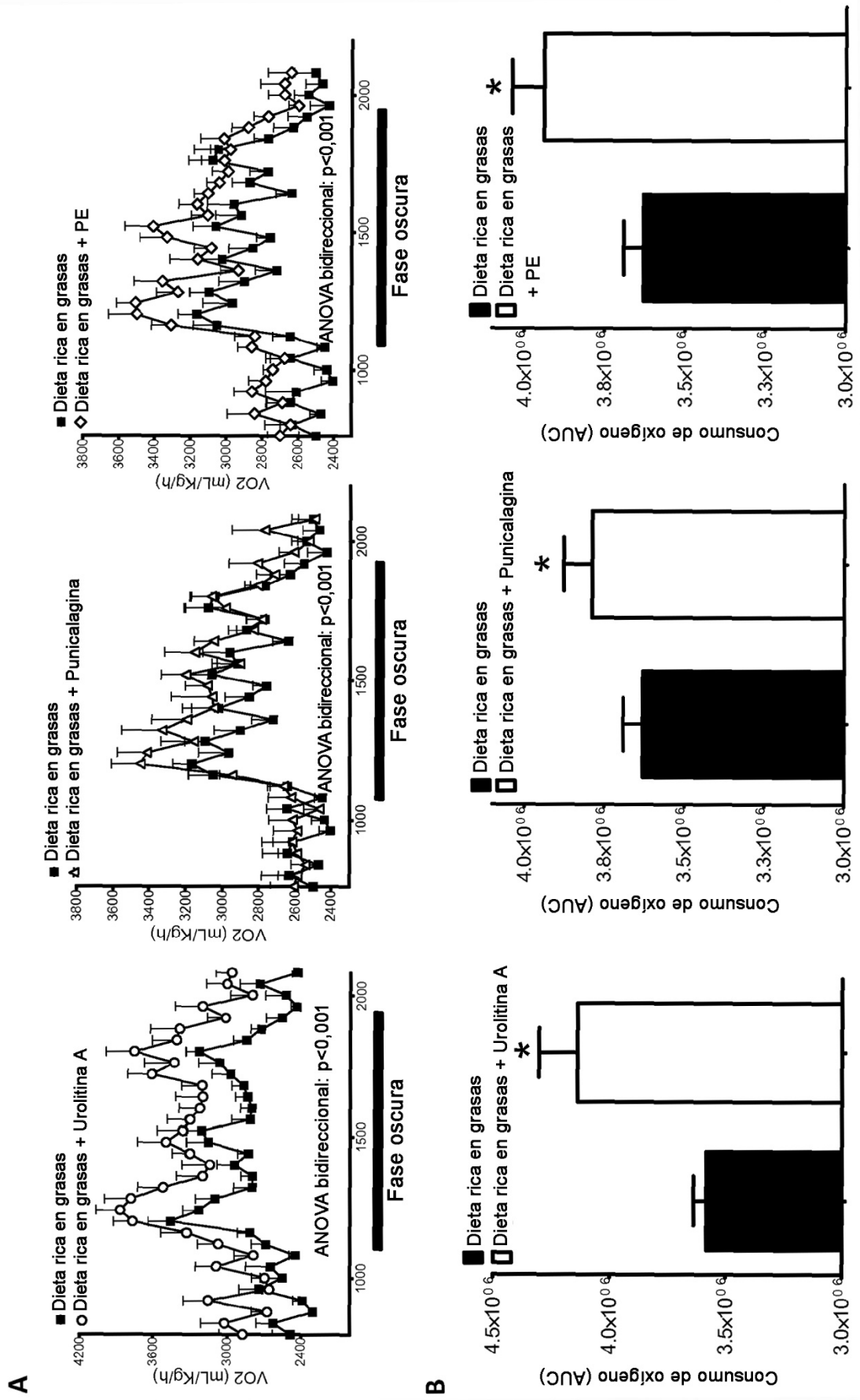
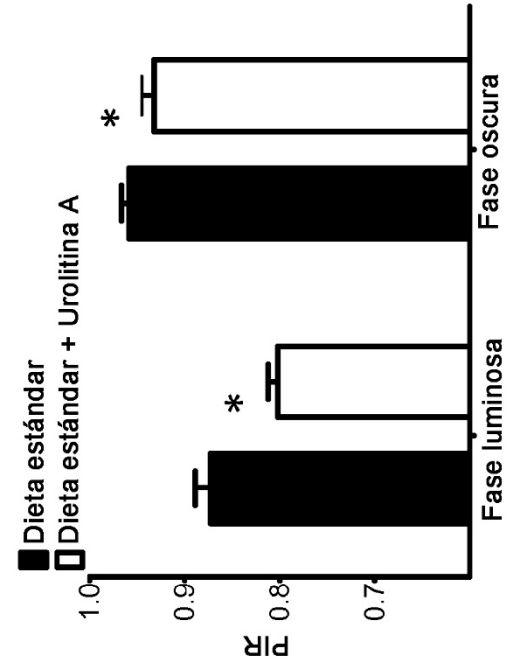
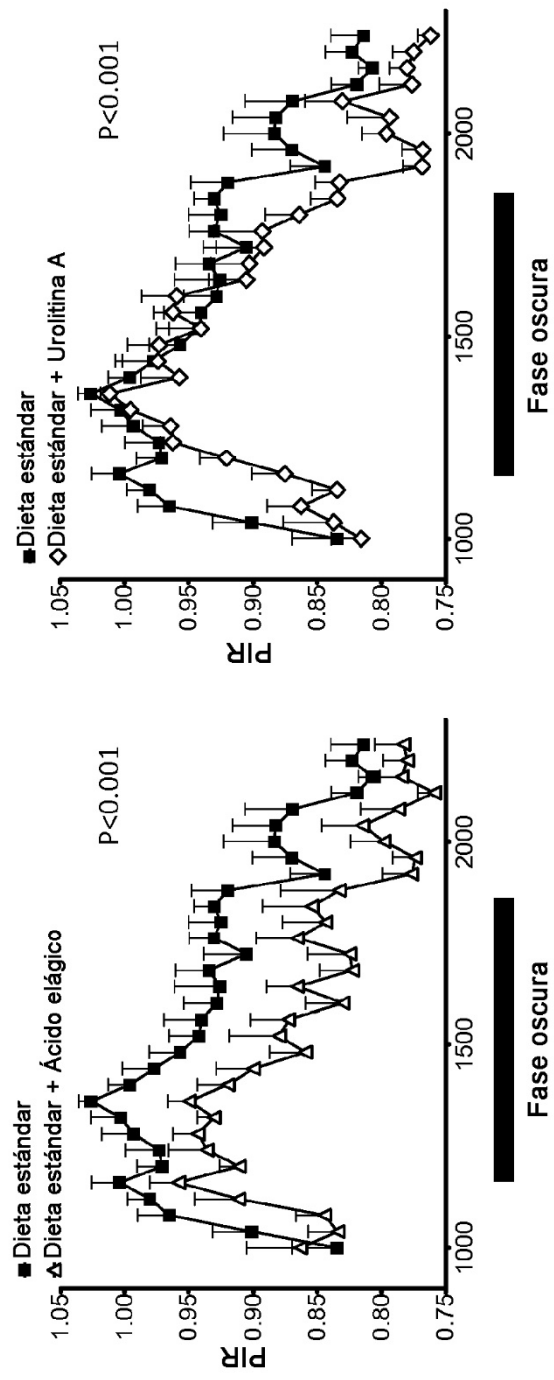


Figura 21

A



B

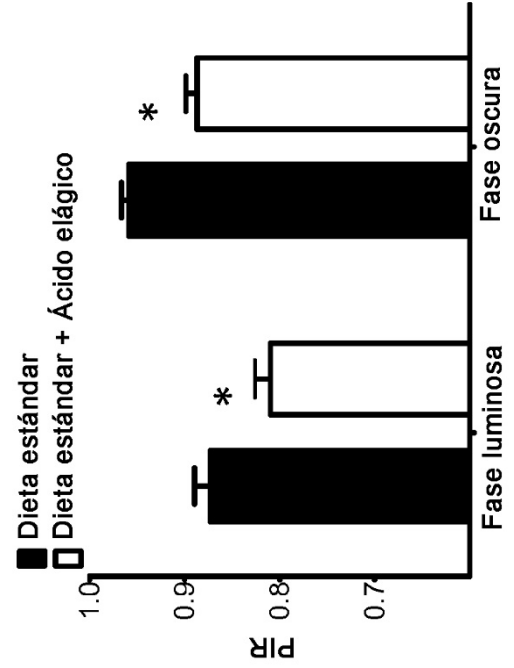
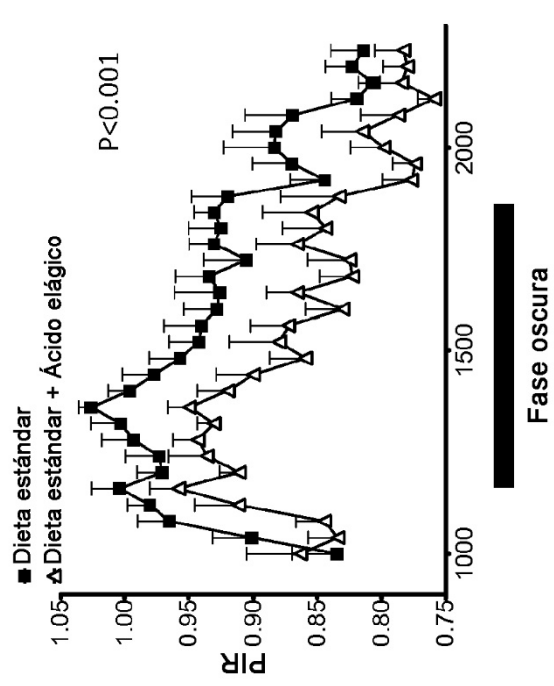
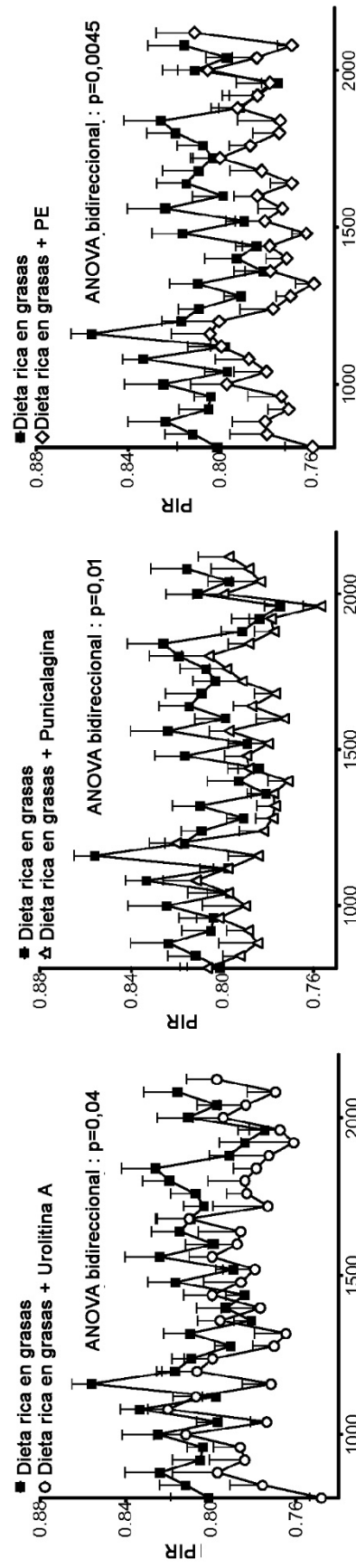


Figura 22

A



B

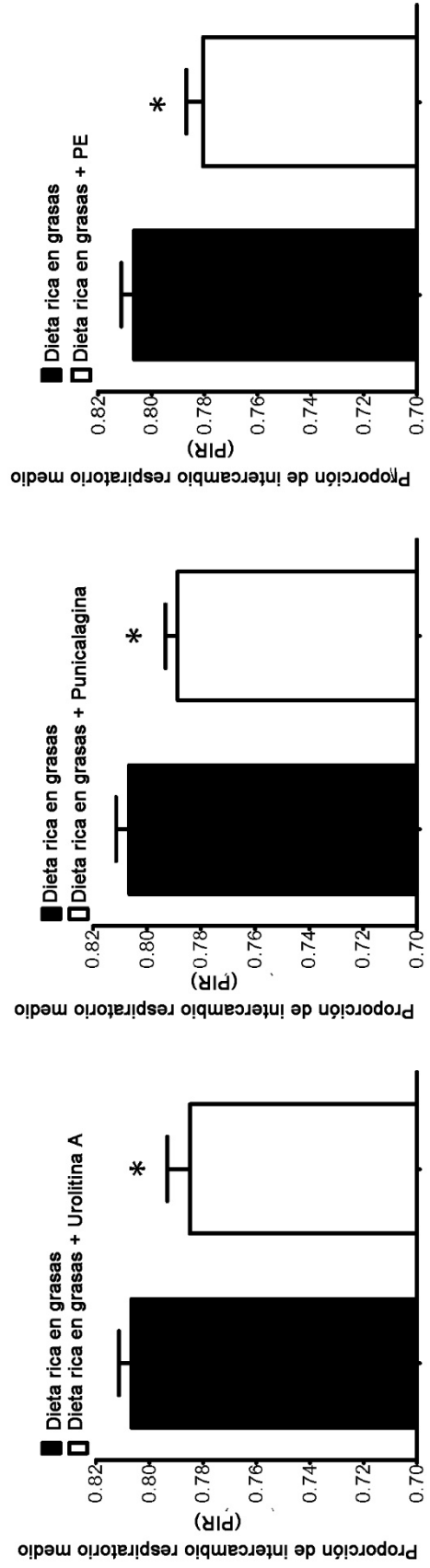
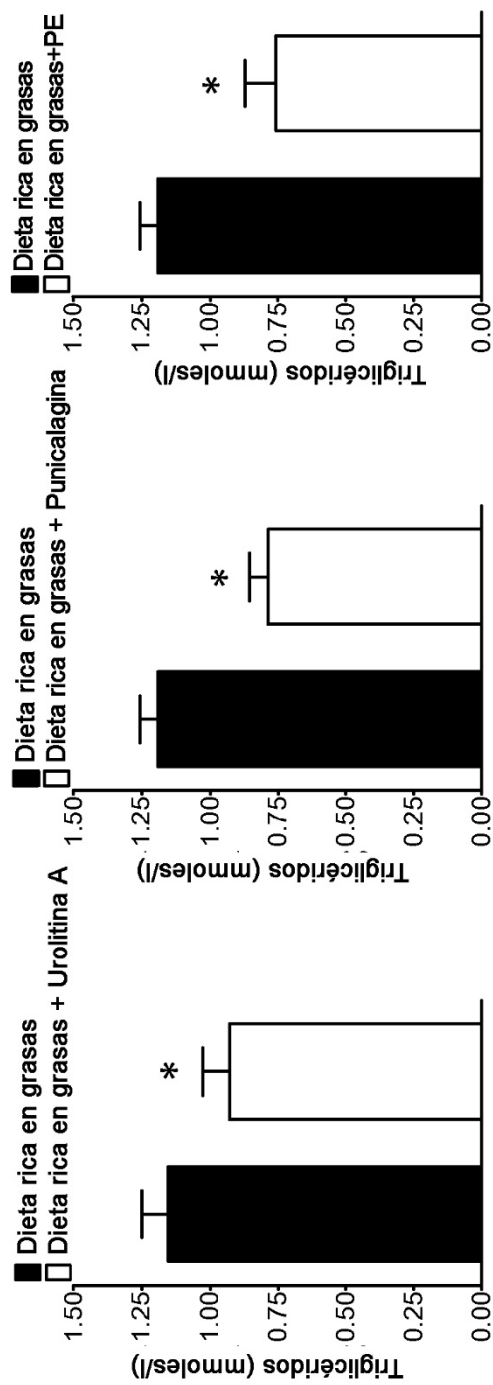


Figura 23

A



B

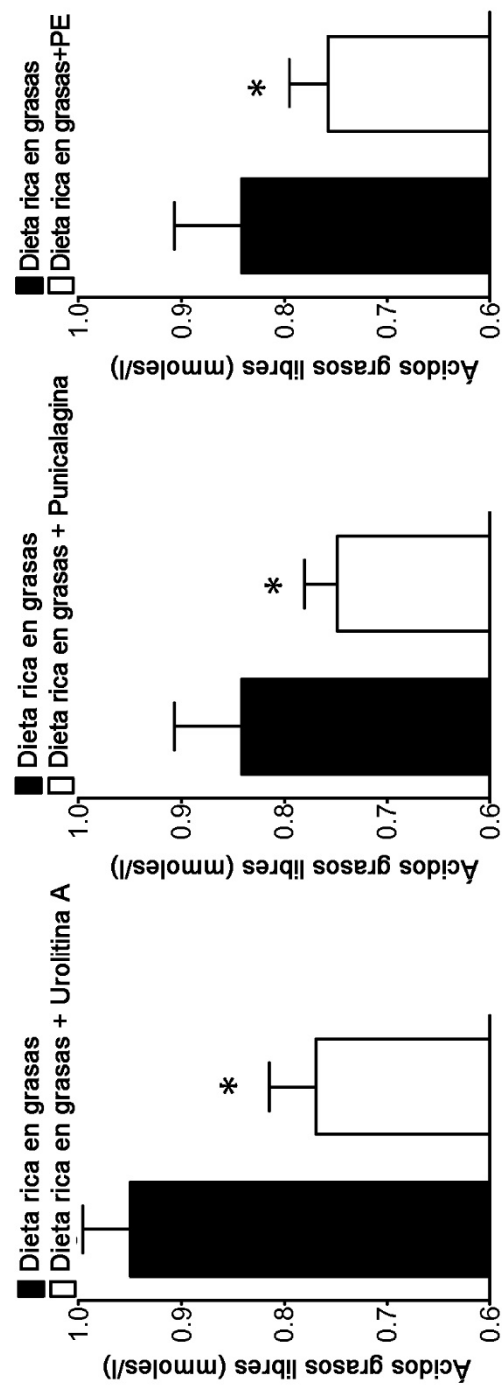


Figura 24

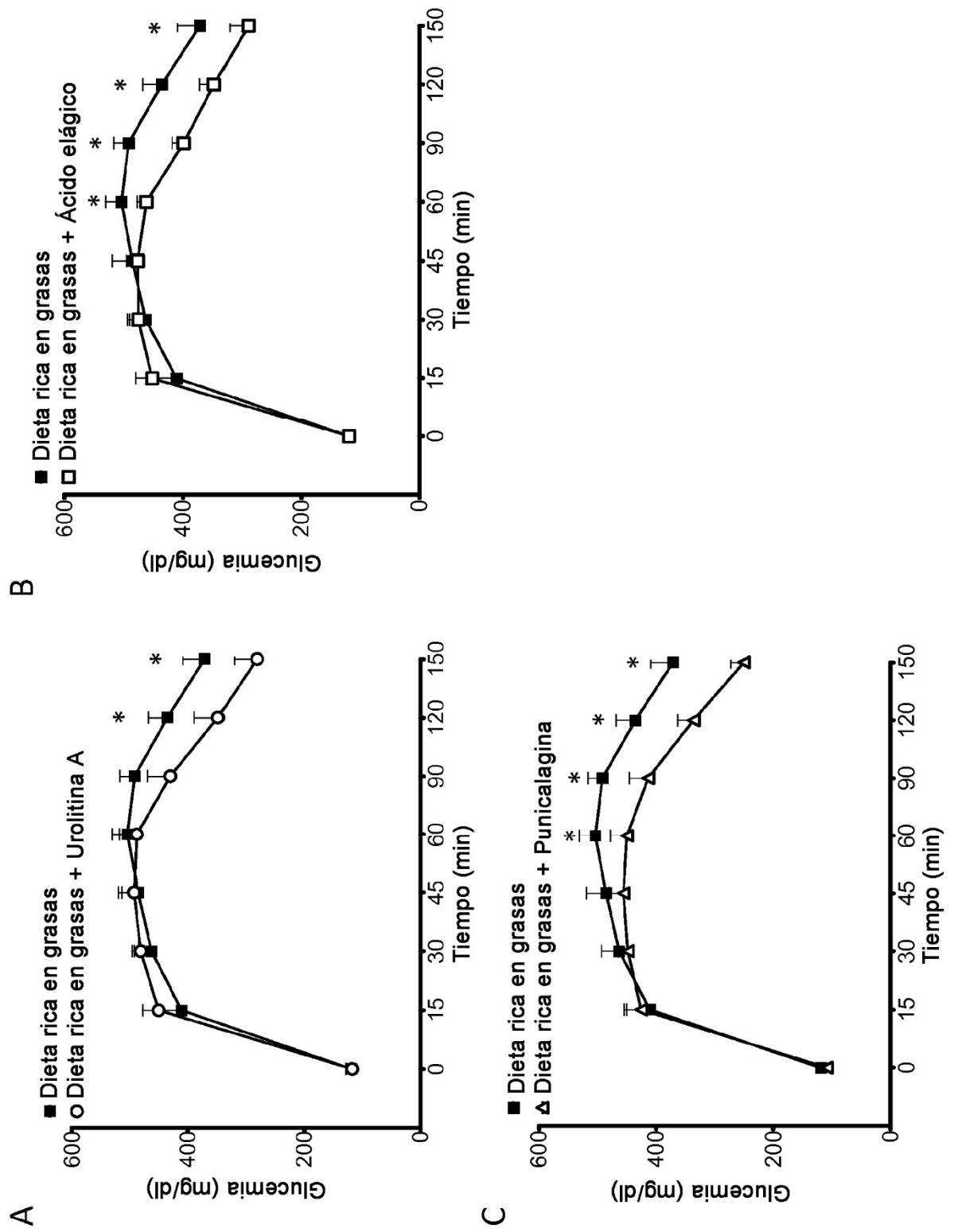


Figura 25

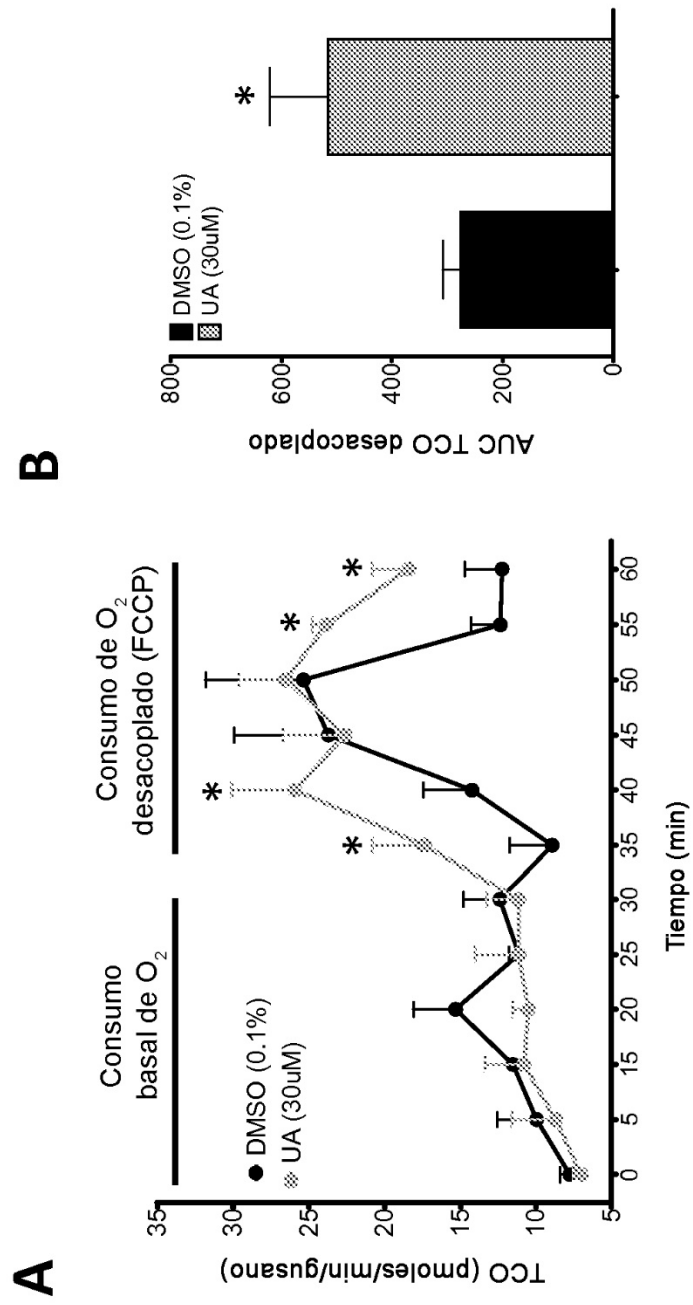


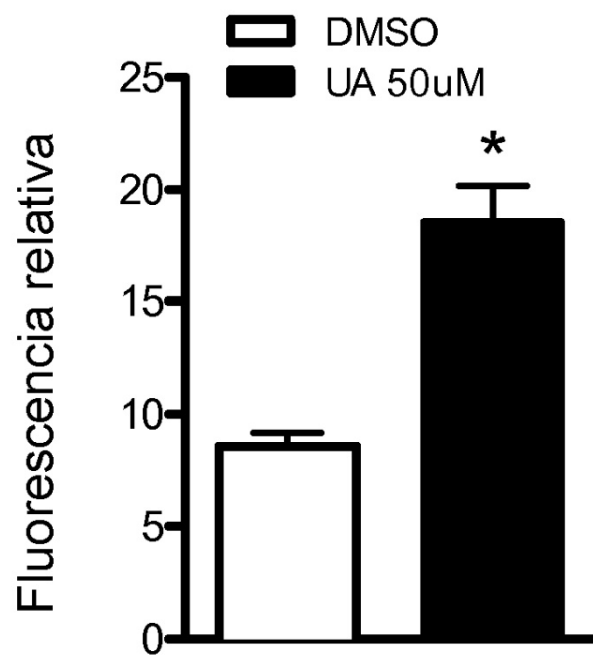
Figura 26

Figura 27

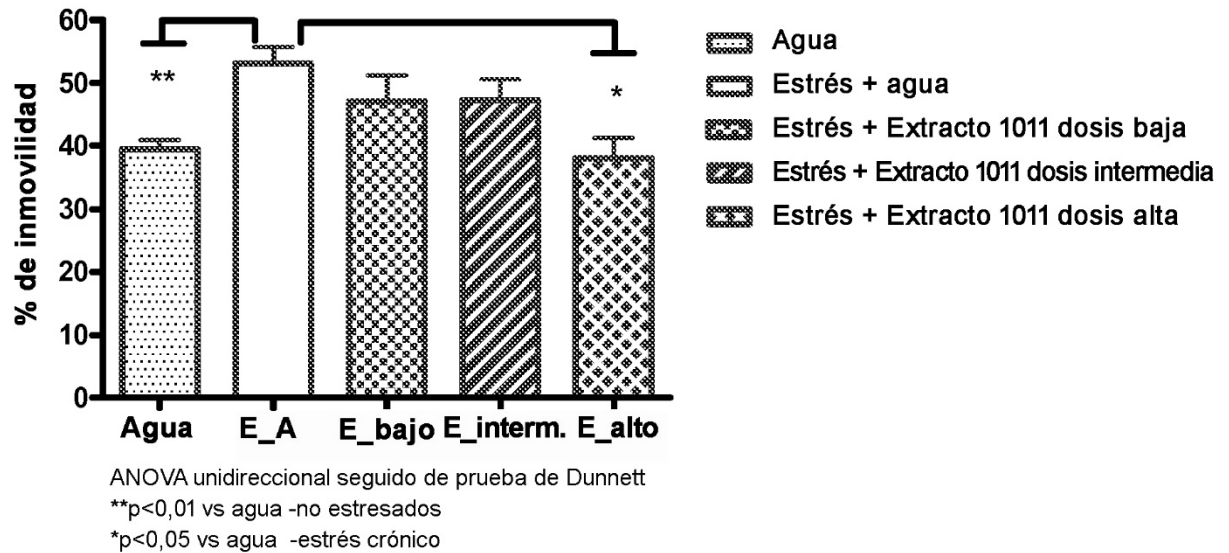


Figura 28

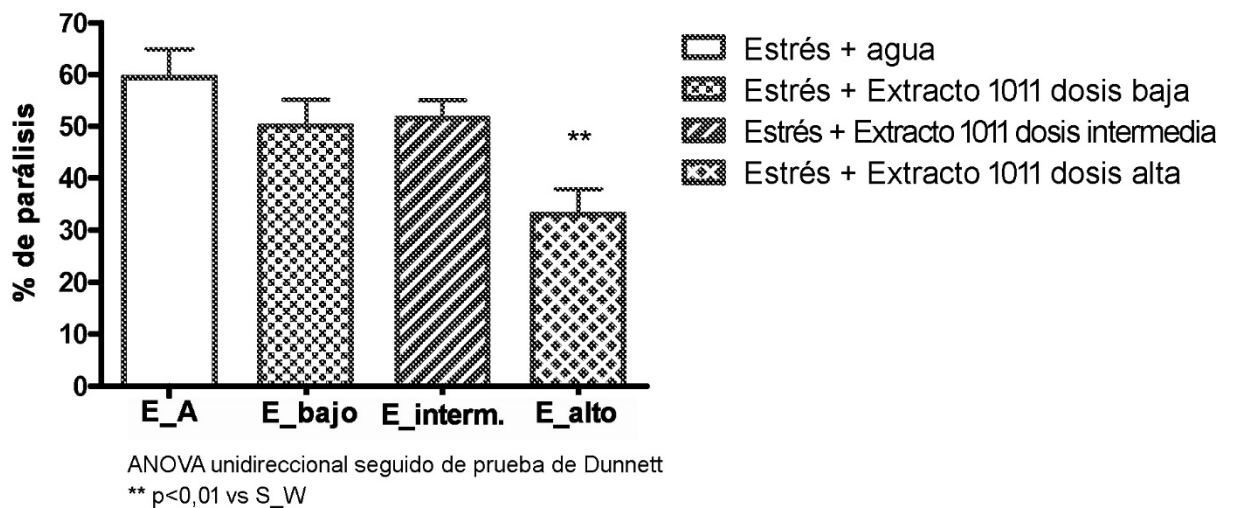


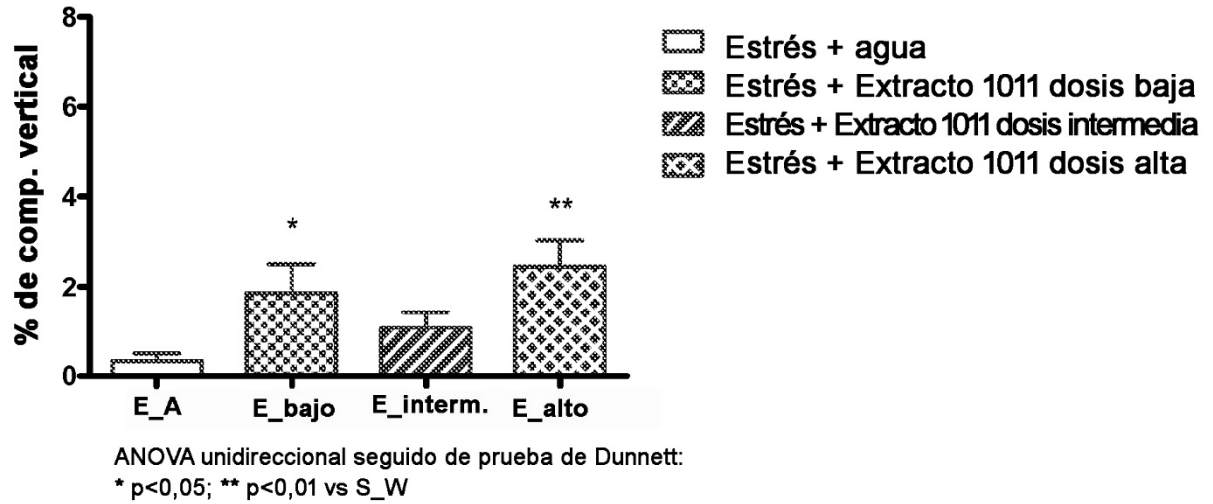
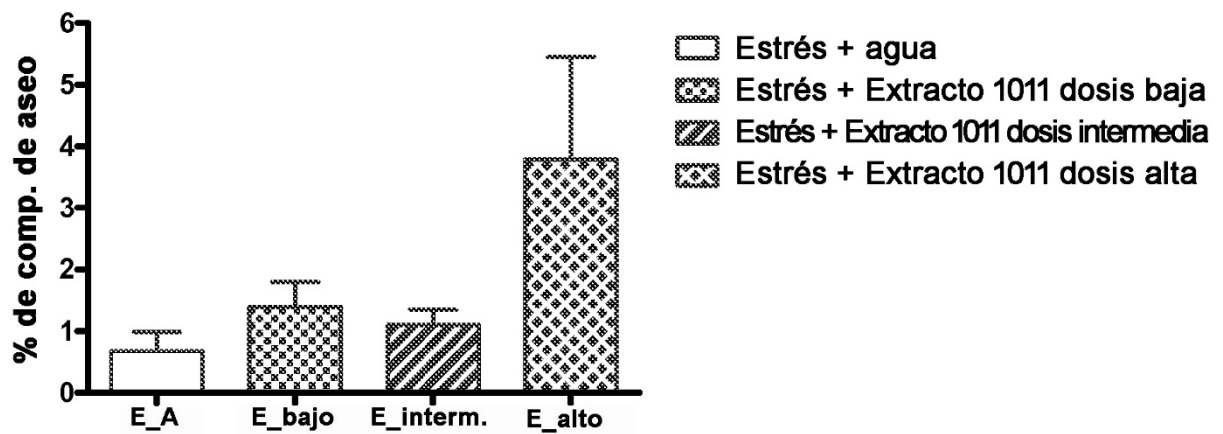
Figura 29**Figura 30**

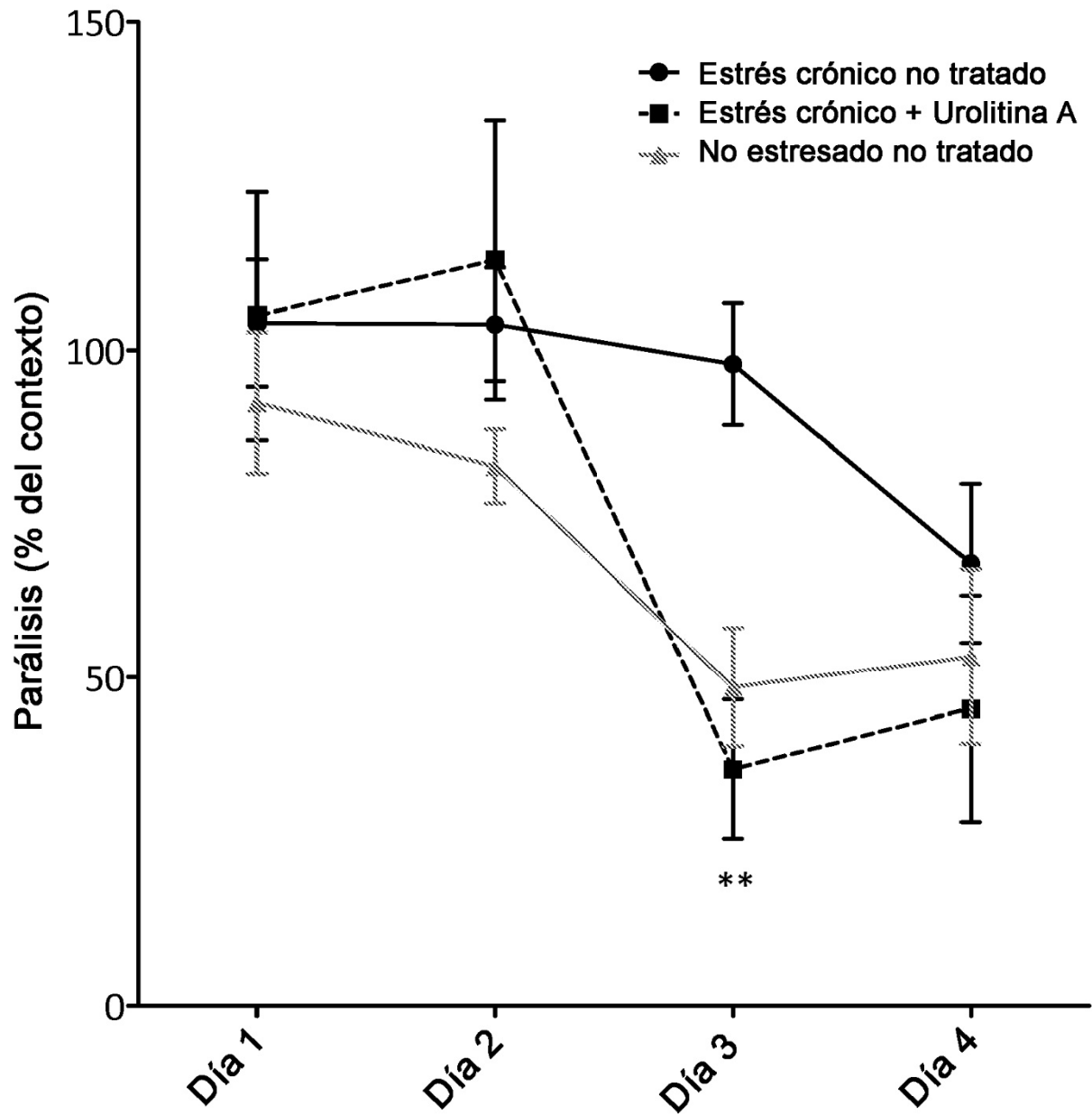
Figura 31

Figura 32

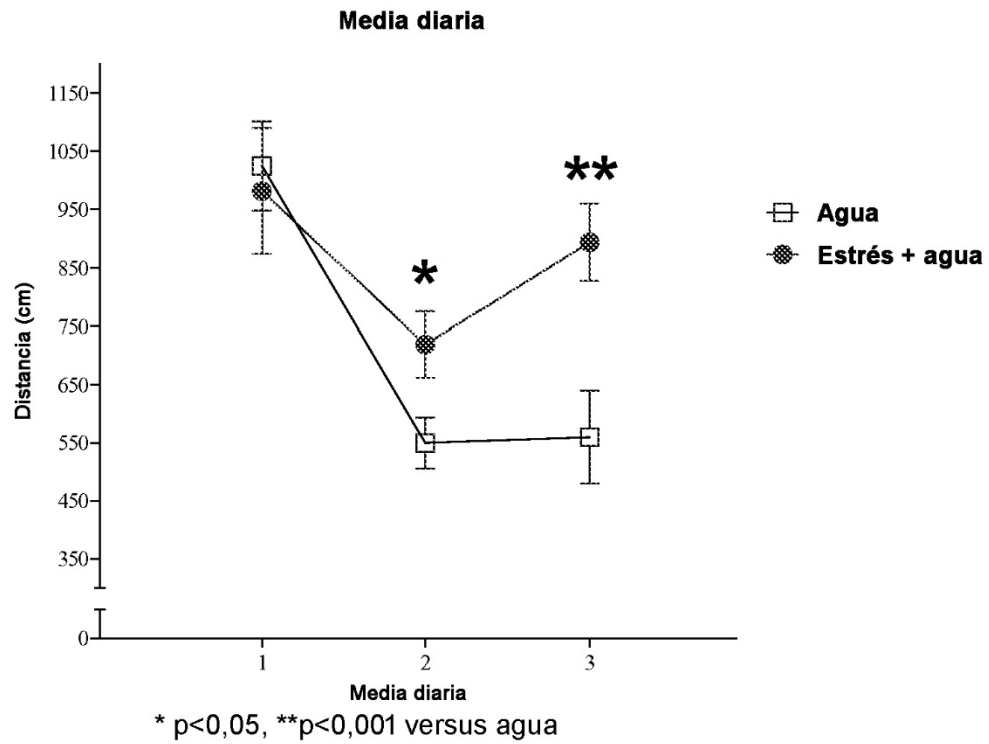


Figura 33

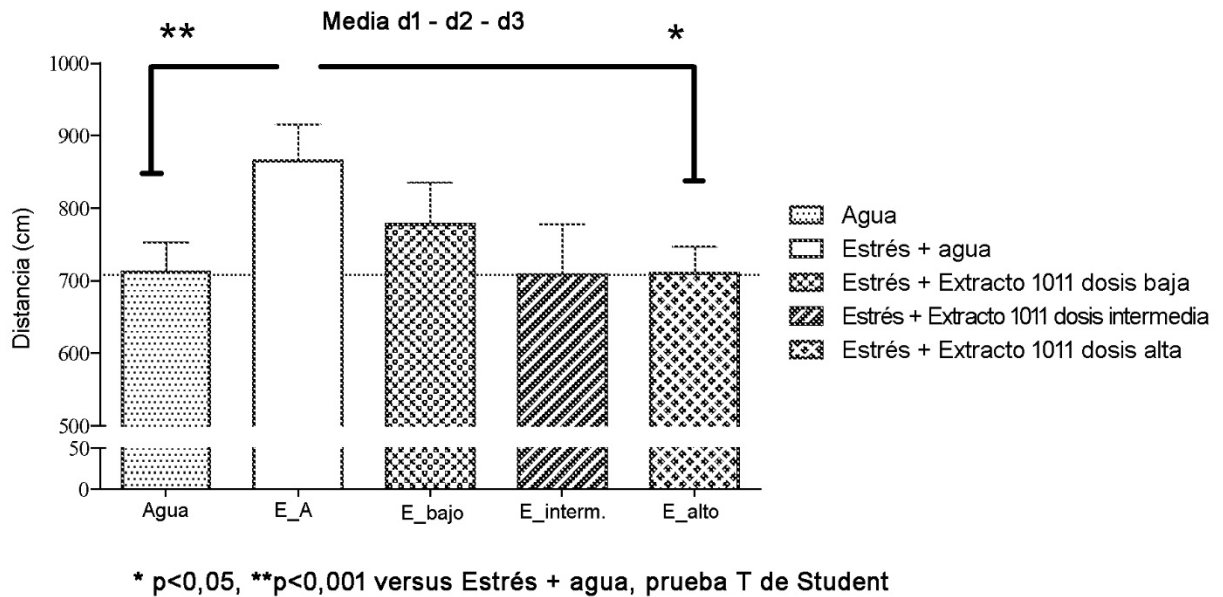


Figura 32

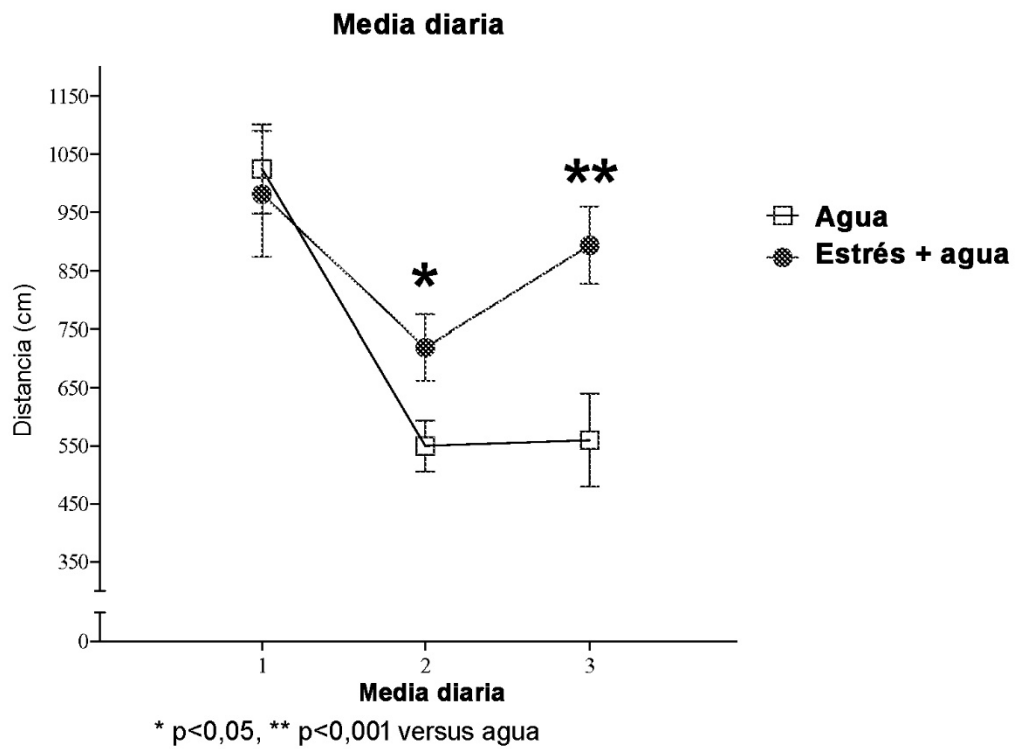


Figura 33

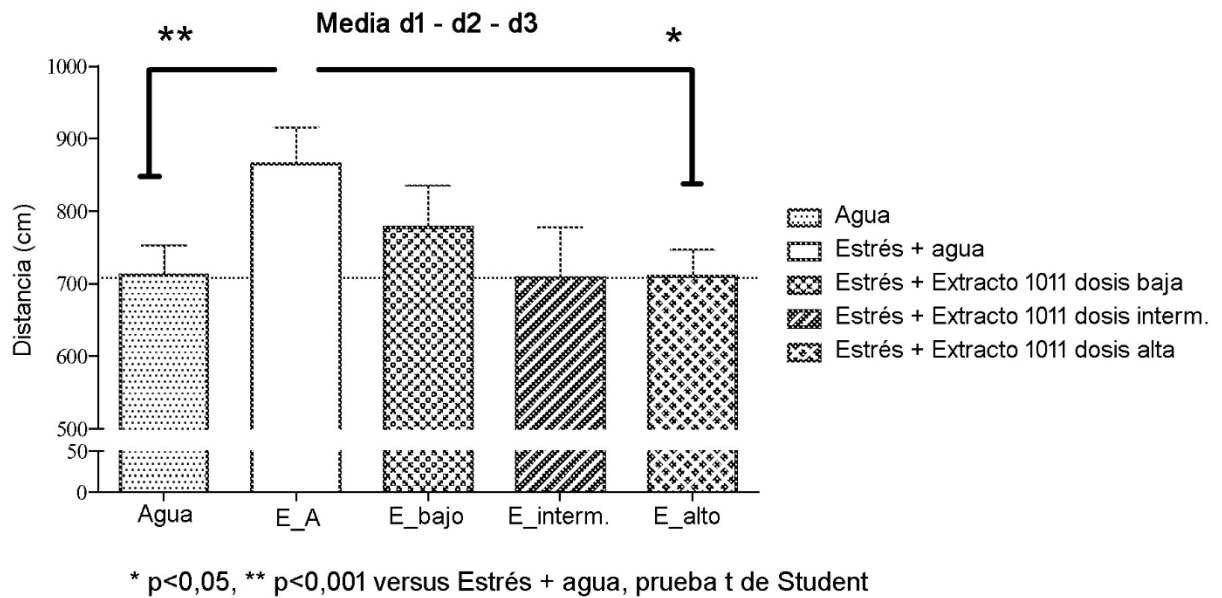


Figura 34

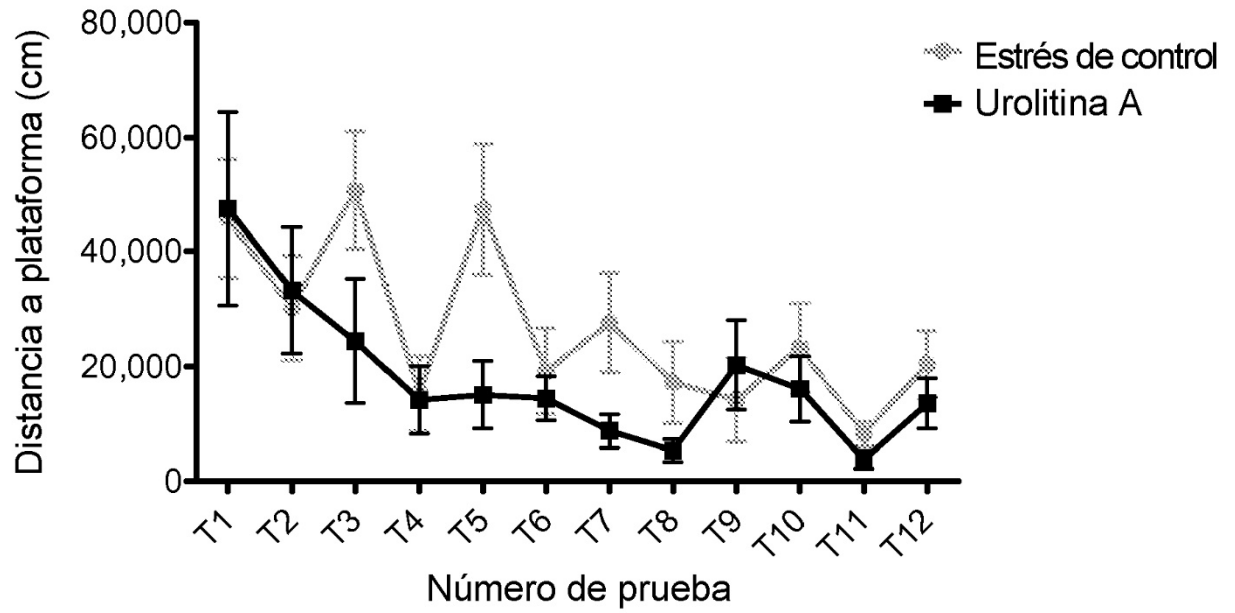


Figura 35

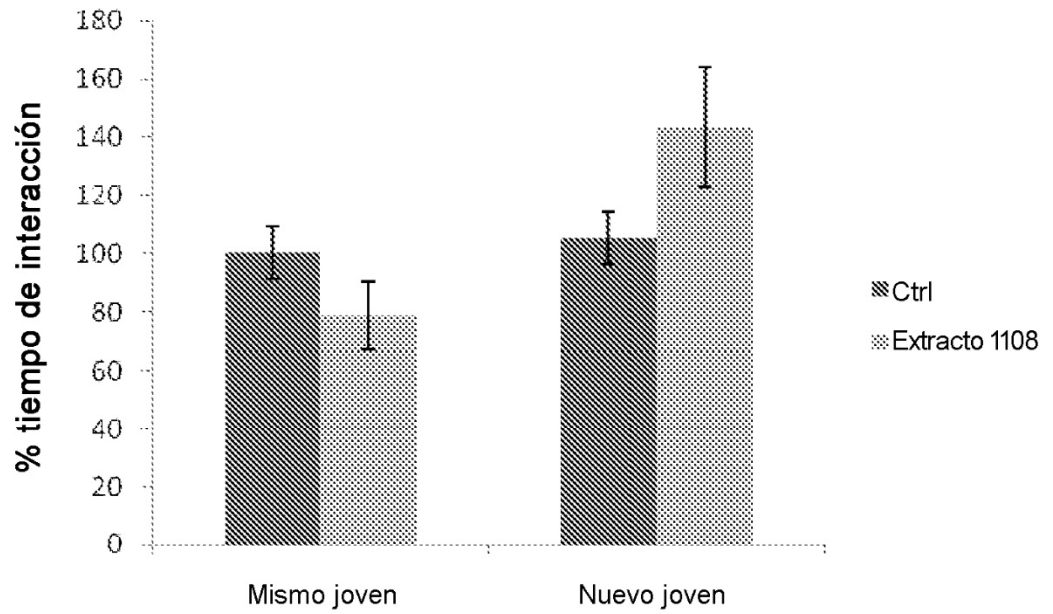


Figura 36

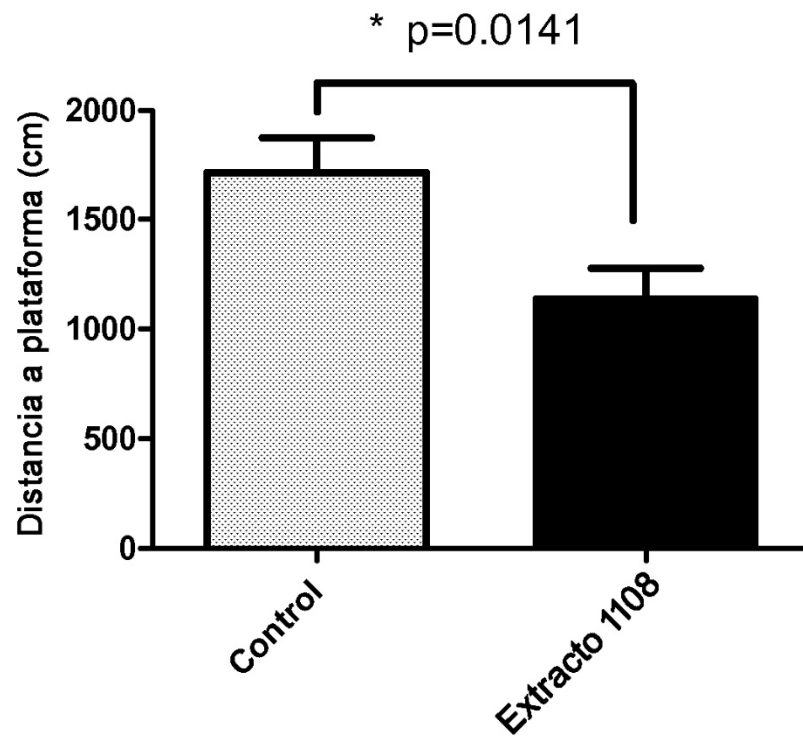


Figura 37

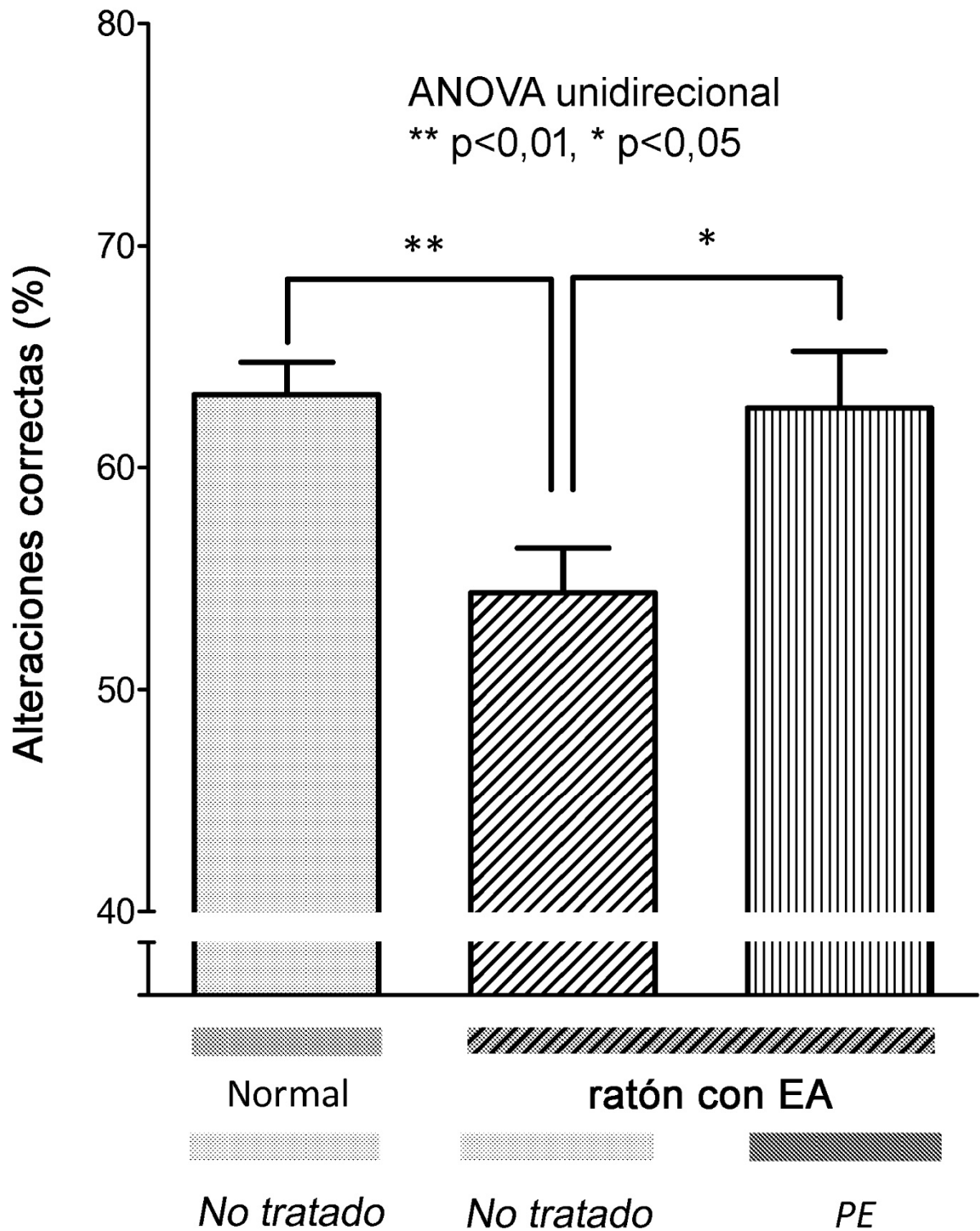


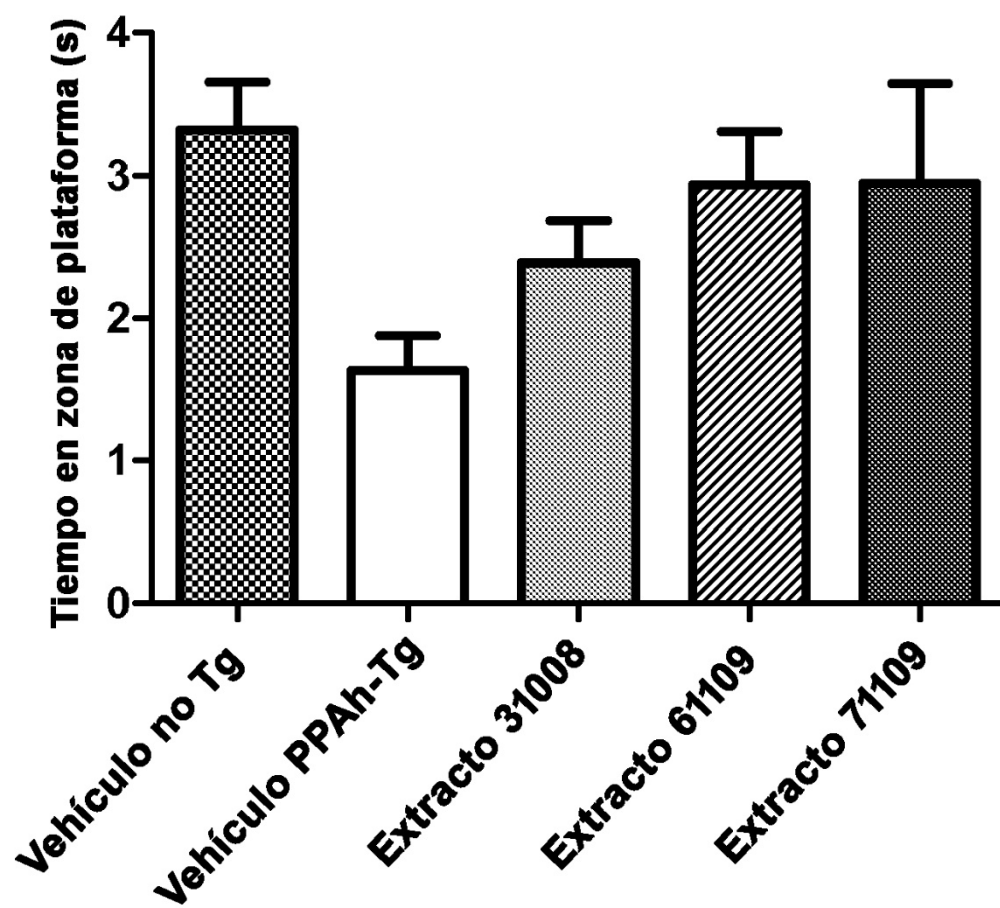
Figura 38

Figura 39

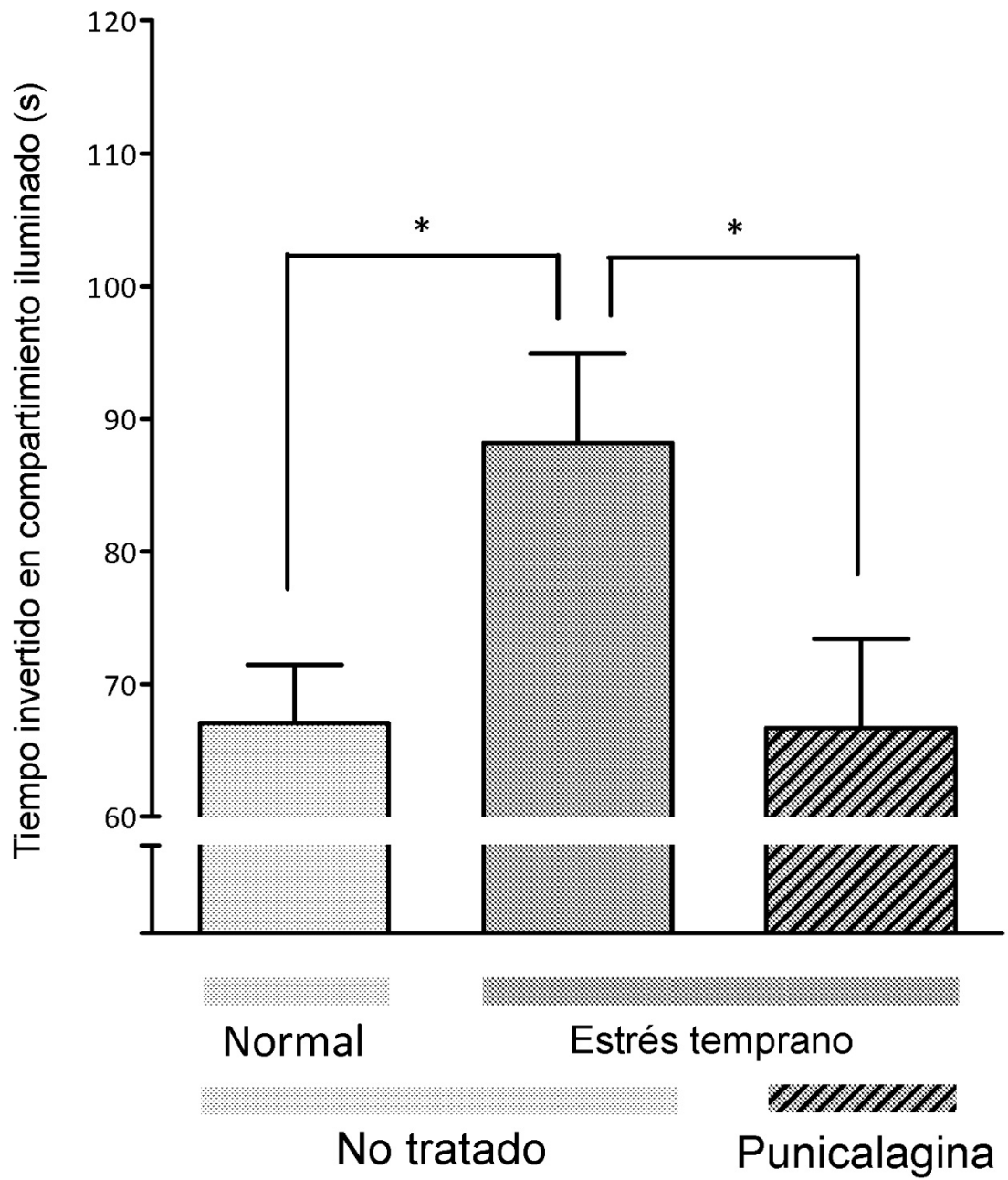


Figura 40

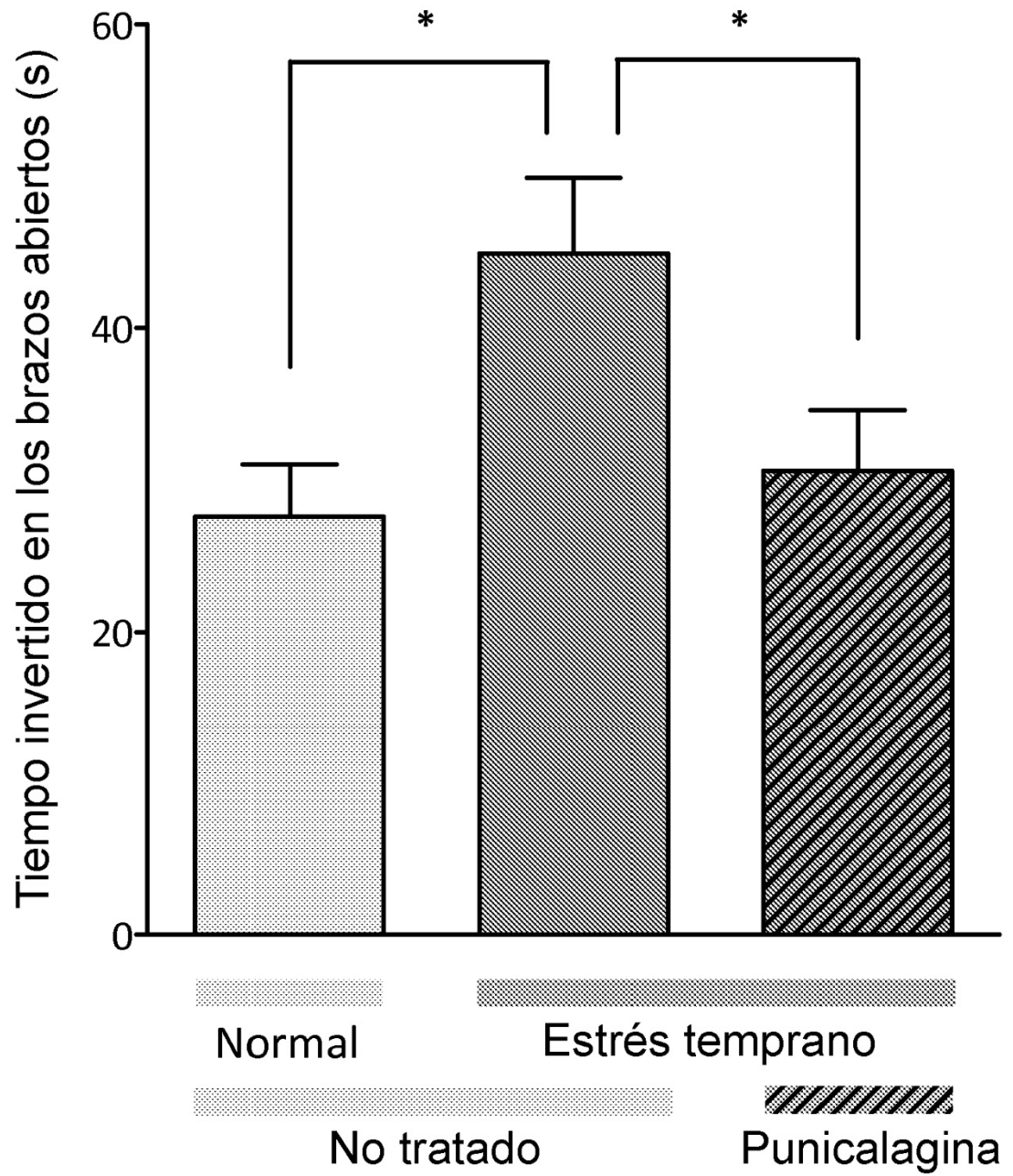


Figura 41

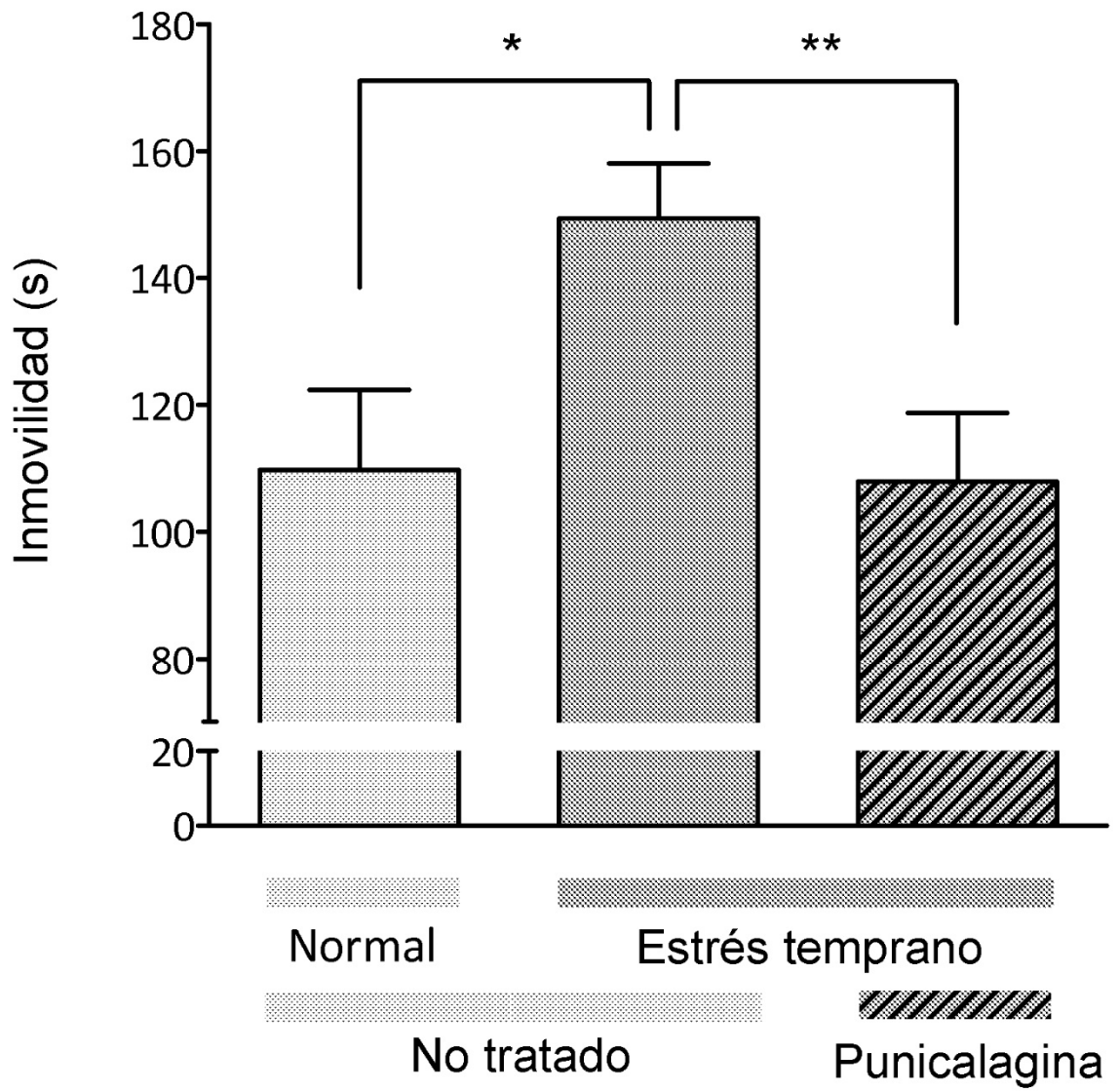


Figura 42

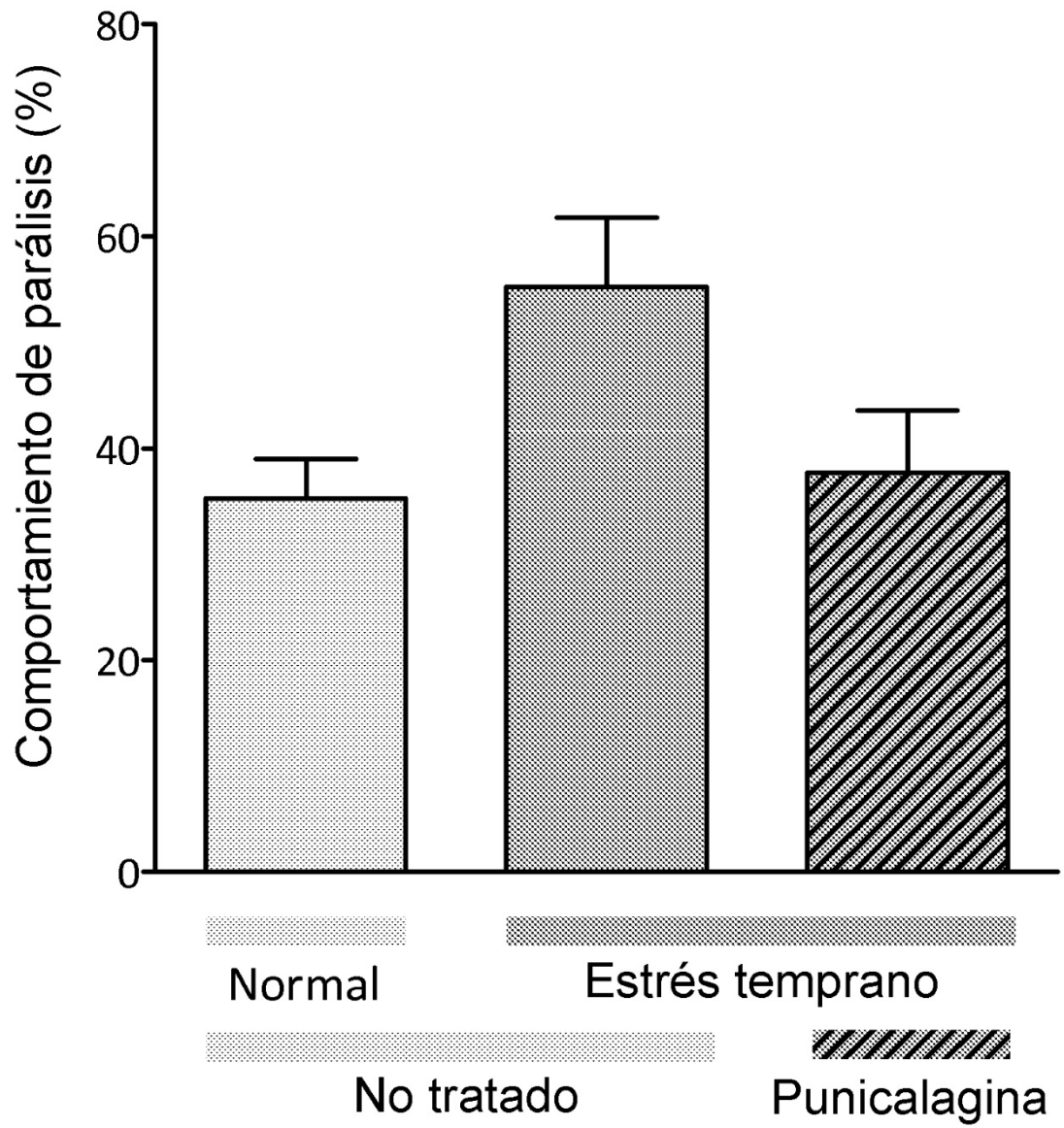


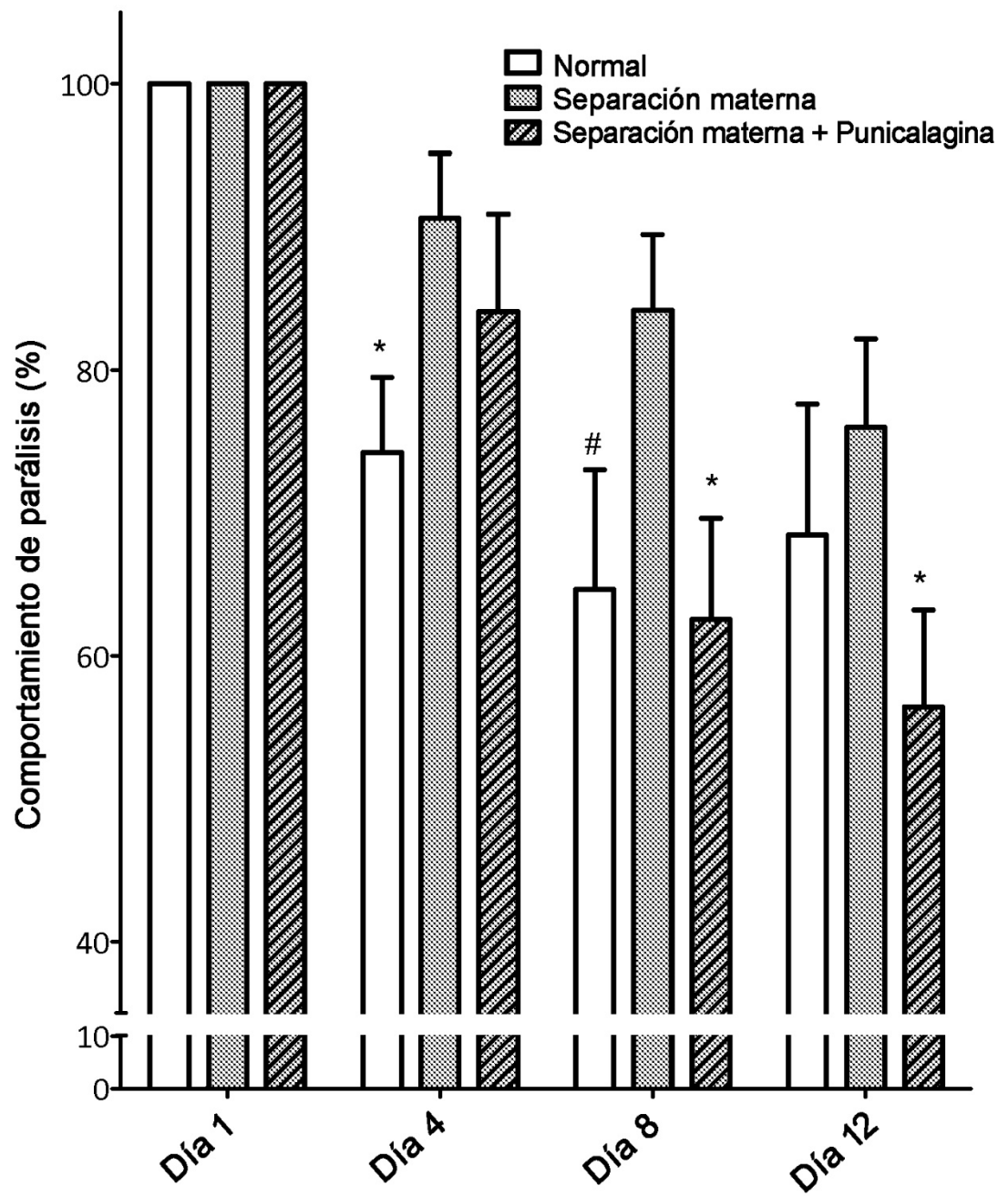
Figura 43

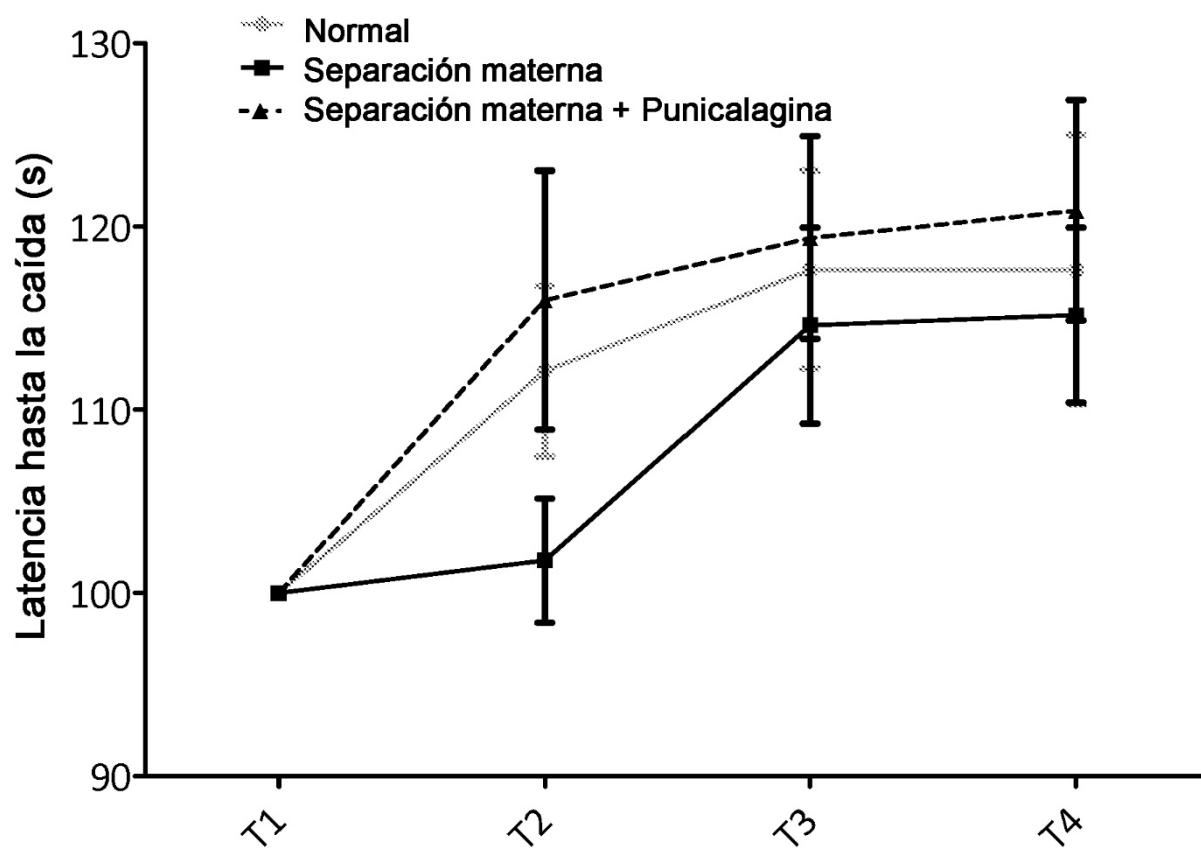
Figura 44

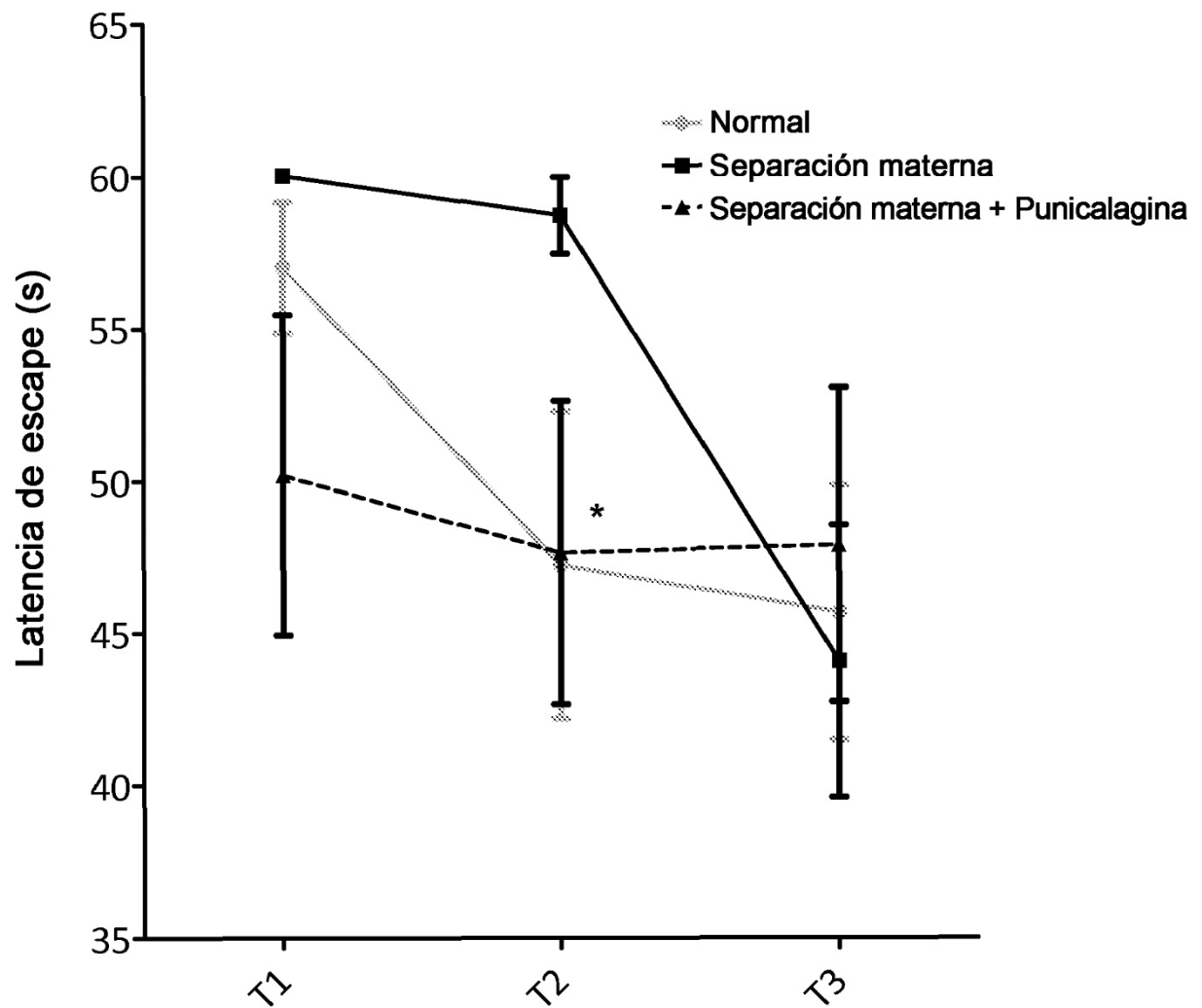
Figura 45

Figura 46

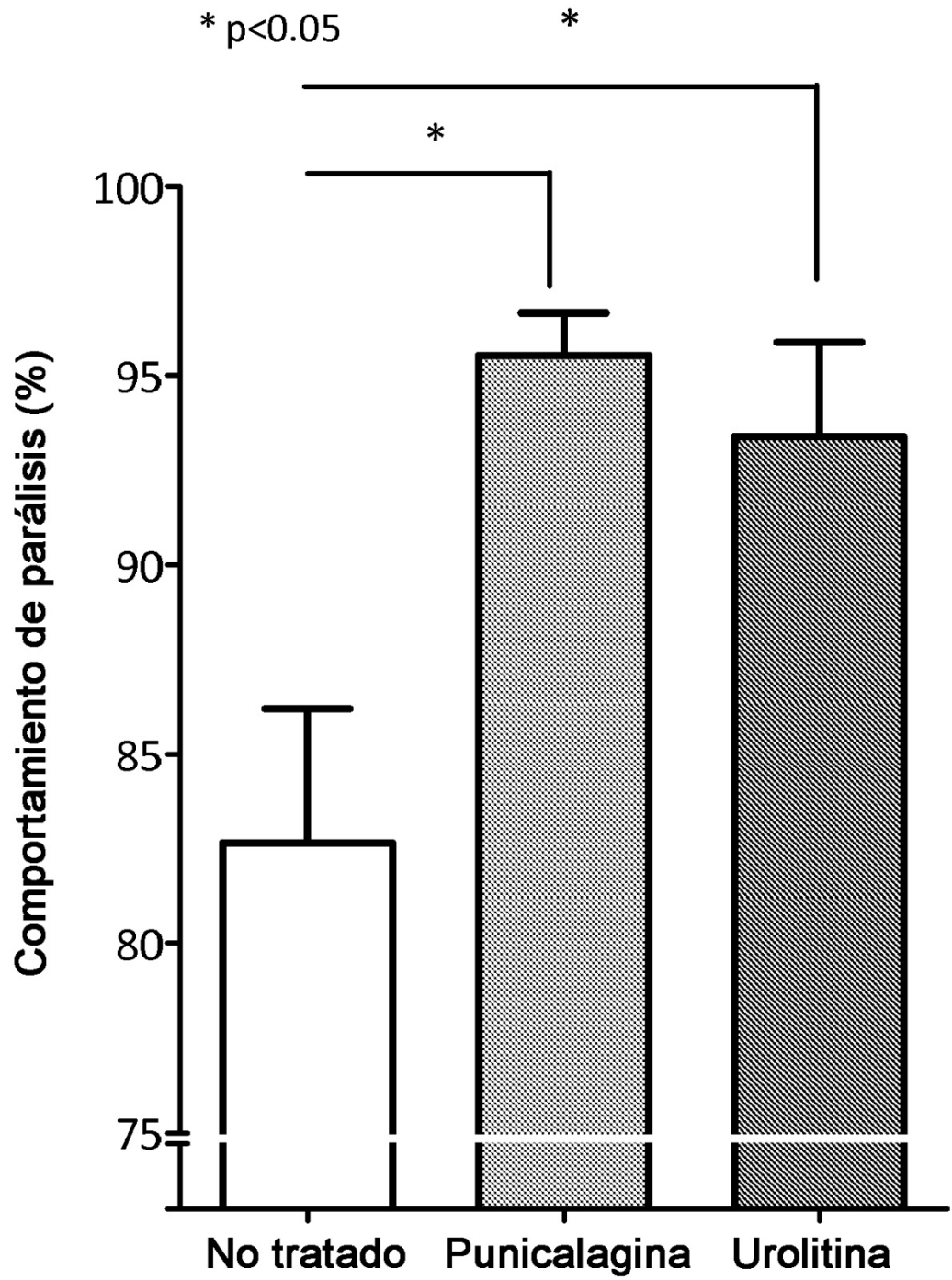


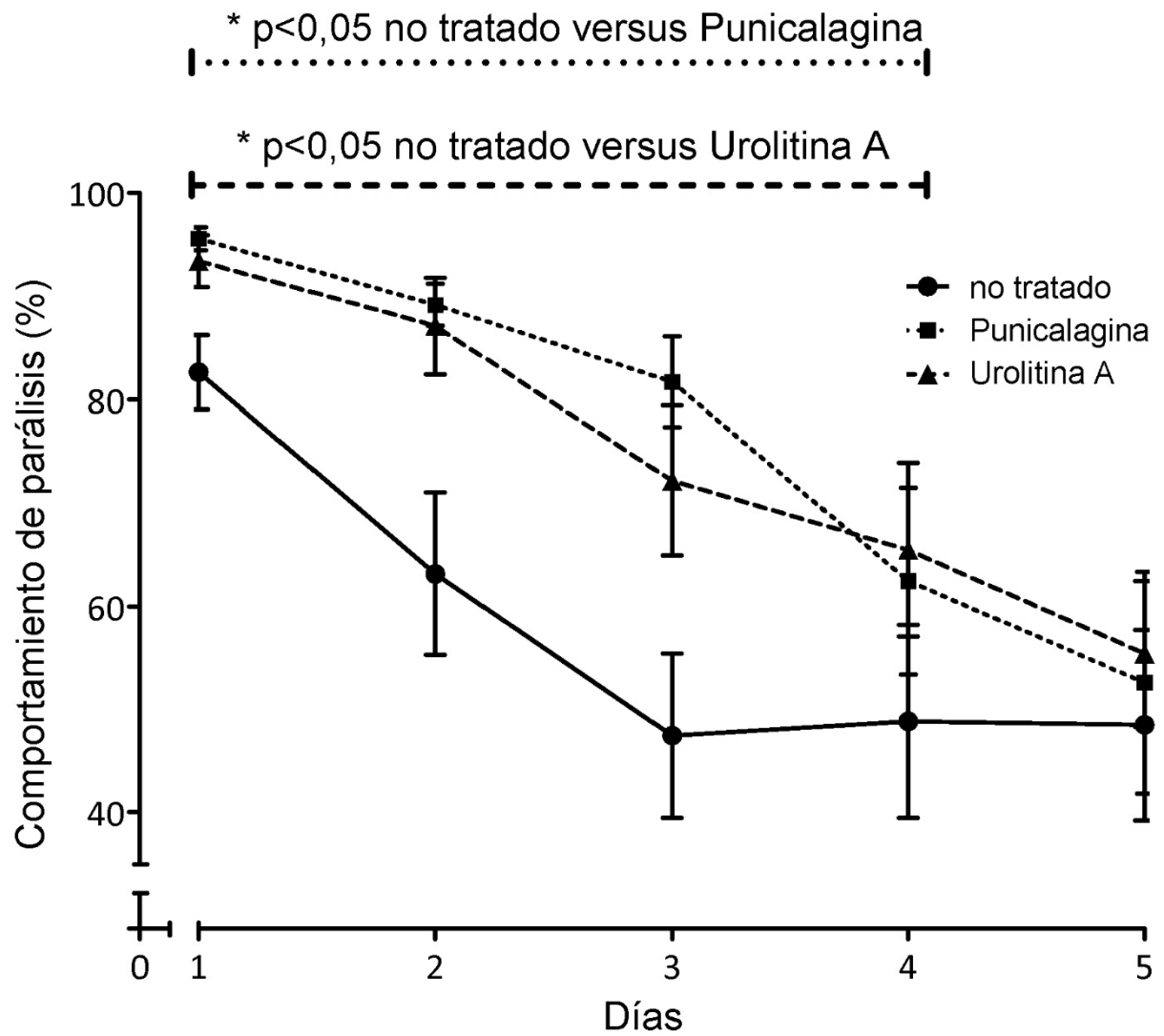
Figura 47

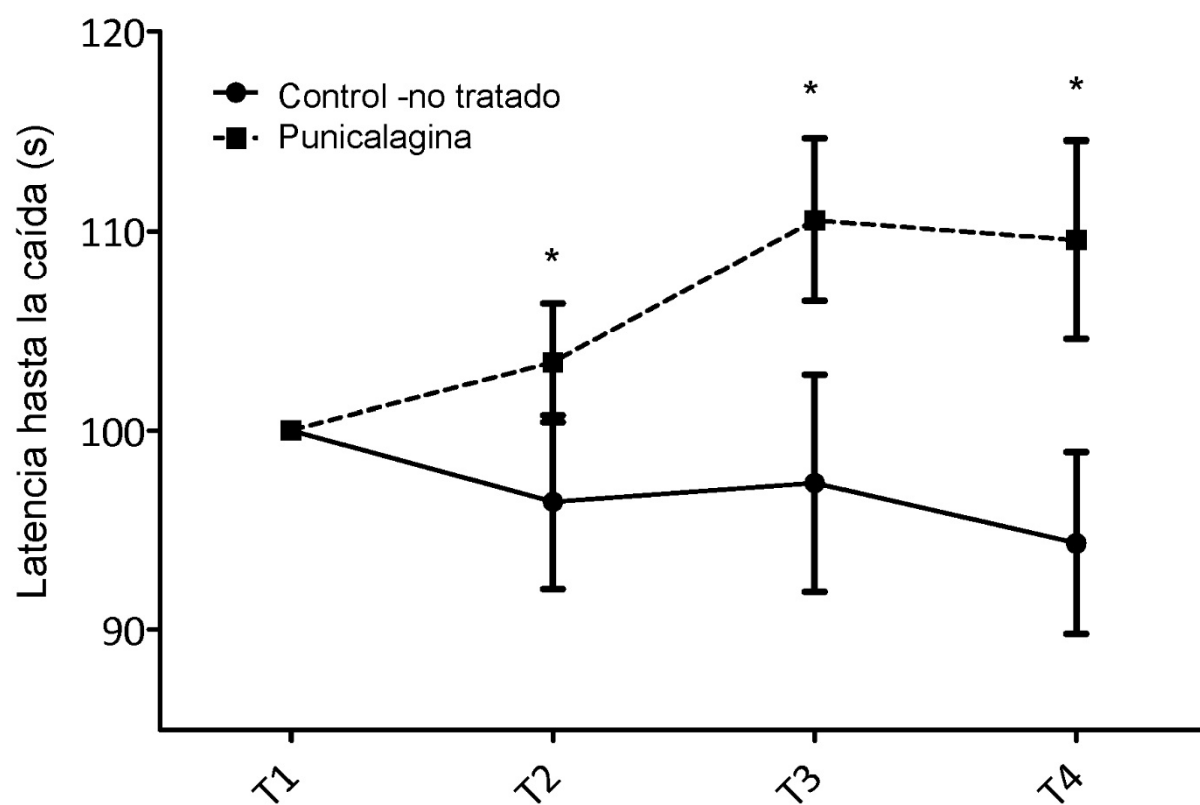
Figura 48

Figura 49