

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-172849- -00000-0000

Fecha: 2013-07-22 14:39:37
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 253

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y TRATAR ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y TRASTORNOS COGNITIVOS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A 23L 1/30

71. SOLICITANTE: AMAZENTIS SA

DOMICILIO: Ecublens, Suiza.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-172849-00000-0000 Fecha: 2013-07-22 14:39:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 253
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/067229	Fecha 23 de Diciembre de 2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/088519 A8	Fecha 28 de Junio de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y TRATAR ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y TRASTORNOS COGNITIVOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A23L 1/30		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
AMAZENTIS SA			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: Parc Scientifique EPFL, PSE-C,		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: CH-1024 Ecublens,		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Suiza	
PAÍS DE RESIDENCIA: Suiza			
7	INVENTOR (ES) VER HOJA INFORMACION COMPLEMENTARIA		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LÓPEZ DÍAZ		SILVANA MARIA	C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO	6181088
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO	notificaciones@clarkemodet.com.co.
PAÍS Colombia		ELECTRÓNICO	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	61/426.957
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2010/12/23

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-063557 // 13-072230	Fecha 27/06/2013 22/07/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463.CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios: 188		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. y Sustitución	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones: 80		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras Nº folios: 46		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	
		P-3882	

ANEXO INVENTORES

- 1.) **RINSCH, Christopher, L.**
(60 Rue De Lausanne CH-1110 Morges, Suiza);
- 2.) **BLANCO-BOSE, William**
(Chemin Chantemerle 13t CH-1010 Lausanne, Suiza);
- 3.) **SCHNEIDER, Bernard**
(Av. Des Cerisiers 37 CH-1009 Pully, Suiza);
- 4.) **THOMAS, Charles**
(Chemin De La Mebre 18 CH-1033 Cheseaux-sur-lausanne, Suiza);
- 5.) **SANDI, Carmen**
(Ch. De Roffens 2a CH-1121 Bremblens, Suiza);
- 6.) **AUWERX, Johan**
(8 Rue Roger De Lessert CH-1168 Buchillon, Suiza);
- 7.) **ANDREUX, Penelope**
(3 Av d' Evian CH-1006 Lausanne, Suiza);
- 8.) **HOUTKOOPER, Richardus**
(5 Rue De L'industrie CH-1005 Lausanne, Suiza);
- 9.) **PIRINEN, Eija**
(24 Ch De Chandieu CH-1006 Lausanne, Suiza);
- 10.) **MOUCHIROUD, Laurent**
(Avenue De Cour 126 CH-1007 Lausanne, Suiza);
- 11.) **GENOUX, David**
(3 Rue De L'ancienne Douane CH-1000 Lausanne, Suiza).

200000

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL
Y TRATAR ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y TRASTORNOS
COGNITIVOS

5

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reclama el beneficio bajo 35 U.S.C. 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 61/426,957, presentada el 23 de diciembre de 2010.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los elagitaninos son polifenoles monoméricos, oligoméricos, y poliméricos que son abundantes en algunos frutos, bayas y nueces, tales como granadas, frambuesas, fresas, frambuesas negras, nueces de castilla y almendras.

15 Los frutos y bayas son ampliamente consumidos frescos y como bebidas, tal como jugo, y se ha reportado que promueven la salud.

En los métodos de procesamiento de jugos de fruta comerciales, los elagitaninos, las cuales son particularmente abundantes en algunas cáscaras de fruta, se extraen en grandes cantidades en el jugo. Los elagitaninos pertenecen a la clase química de taninos, los cuales liberan ácido elágico en la hidrólisis. Los estudios in vitro han sugerido que los elagitaninos, a concentraciones en el rango de 10-10
20 macromolar (μM), tienen efectos potenciales anti-oxidantes, anti-aterogénicos, anti-trombóticos, anti-inflamatorios, y anti-angiogénicos. Los frutos pueden tener diferentes elagitaninos que son predominantes, por ejemplo, en el jugo de fruta preparado a partir de granada, el elagitanino
25 predominante es punicalagina [2,3 hexahidroxidifenoil-4,6-
30

000003

galagilglucosa], que se presenta como una mezcla de isómeros. Las propiedades anti-oxidantes potentes reportadas del jugo de granada se han atribuido al alto contenido de isómeros de punicalagina, los cuales alcanzan niveles de >2 g/L de jugo.

5 Los elagitaninos también se han identificado como los compuestos anti-aterogénicos activos en jugo de granada. También se ha sugerido que los elagitaninos de granada y extractos de fruta de granada inhiben la proliferación de células de cáncer humanas y modulan la apoptosis y trayectorias de señalización subcelulares inflamatorias. Ver,
10 por ejemplo, Seeram et al. (2005) J Nutr Biochem. 16:360-7; Adams et al. (2006) J Agric Food Chem. 54:980-85; Afaq et al. (2005) Photochem Photobiol. 81:38-45; Afaq et al. (2005) Int J Cáncer. 113:423-33. El extracto de fruta de granada también
15 se ha reportado que reduce el crecimiento de tumor de próstata y niveles de antígeno en suero de próstata (PSA) en ratones desnudos atímicos implantados con células de próstata CWR22Rv1. Malik et al. (2005) Proc Natl Acad Sci. 102:14813-8.

20 Desafortunadamente, la mayor parte de elagitaninos se absorben pobremente en el intestino humano. Sin embargo, un número de metabolitos derivados de elagitaninos se absorben por el intestino humano, incluyendo ciertos metabolitos finalmente formados en el intestino por
25 microorganismos comensales (es decir, microflora intestinal).

Los elagitaninos liberan ácido elágico bajo condiciones fisiológicas in vivo, y el ácido elágico luego se metaboliza gradualmente por la microflora intestinal del intestino en el intestino para producir urolitina D,
30 urolitina C, urolitina A (UA) y urolitina B (UB). Una vez que

000004

los metabolitos se absorben, sufren glucuronidación y una vez en el hígado, se metabolizan adicionalmente para producir glucurónidos, y/o sulfatos, para producir una combinación de metabolitos secretados en la bilis.

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

15 Se han hecho esfuerzos considerables para entender el mecanismo de los trastornos metabólicos, neurodegeneración y declinación cognitiva, para diseñar mejor las modalidades de tratamiento incluyendo aquellas basadas en los productos naturales. Una de las observaciones clave ha sido el papel de
20 la producción de energía mitocondrial declinante, correspondiente con la apoptosis y estrés oxidativo incrementado, juega un papel significativo en las enfermedades degenerativas y el proceso de envejecimiento. Se ha mostrado ahora que una variedad de enfermedades
25 degenerativas es causada por mutaciones en los genes mitocondriales codificados por el ADN mitocondrial (mtADN) o el ADN nuclear (nADN). De manera importante, las mutaciones somáticas de mtADN se acumulan con la edad en los tejidos post-mitóticos en asociación con la declinación relacionada
30 con la edad de la función mitocondrial y se piensa que son un

000305

factor importante en el envejecimiento y senectud. Las enfermedades heredadas pueden resultar de la sustitución de base de mtADN y mutaciones de rearreglo y pueden afectar el SNC, corazón y músculo esquelético, y sistemas renales, endocrinos y hematológicos.

Las mitocondrias generan la mayoría de la energía celular por fosforilación oxidativa (OXPHOS), y producen la mayoría de las especies de oxígeno reactivas tóxicas (ROS) como un sub-producto. Los defectos genéticos que inhiben la OXPHOS también causan la redirección de electrones de OXPHOS en la producción de ROS, incrementando así el estrés oxidativo. Una declinación en la producción de energía mitocondrial y un incremento en el estrés oxidativo pueden incidir en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mtPTP) para iniciar la muerte celular programada (apoptosis). La interacción de estos tres factores se considera que juega un papel principal en la patofisiología de enfermedades degenerativas y el proceso de envejecimiento, el cual afecta todos los tejidos del cuerpo.

En el cerebro normal, la función cognitiva óptima principalmente se basa en la actividad y comunicación entre las neuronas, células altamente complejas capaces de transportar señales eléctricas y provocar neurotransmisión química. La función neuronal depende de procesos celulares largos y complejos que pueden extenderse sobre centímetros o aún metros para conectar las neuronas o células objetivo, y pueden hacer más de 100,000 contactos sinápticos. Como tal, las neuronas son altamente dependientes del suministro de energía y, por lo tanto, se exponen al daño por estrés oxidativo. La función cognitiva es dependiente de un

000006

equilibrio cuidadoso de la señalización intracelular que toma lugar dentro de una red compleja de neuronas. La función cognitiva óptima se puede deteriorar por factores numerosos tales como envejecimiento, estrés celular, estrés crónico, y trastornos neurodegenerativos. La declinación cognitiva se puede caracterizar por una disminución del funcionamiento del pensamiento, aprendizaje, memoria, estado de alerta y/o habilidades psicológicas deterioradas, así como también por depresión y ansiedad.

También se ha mostrado que la función mitocondrial es importante en los trastornos metabólicos.

La diabetes y obesidad se han correlacionado con los compromisos en 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 niveles de obesidad, con alta eficiencia de acoplamiento posiblemente resultando en mayor deposición de almacenes de grasa (Harper, Green et al. 2008). En la diabetes, el trabajo reciente ha sugerido que la disfunción mitocondrial es una causa de la insensibilidad a insulina en miocitos y adipocitos, como un resultado de insuficiente suministro de energía o defectos en la trayectoria de señalización de insulina (Wang, Wang et al. 2010).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se refiere a composiciones que comprenden compuestos o precursores a compuestos los cuales se pueden usar para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos relacionados con la actividad

000307

mitocondrial reducida o inadecuada, incluyendo envejecimiento o estrés, diabetes, obesidad, y enfermedades neurodegenerativas. Estos mismos compuestos y composiciones también se pueden usar ventajosamente en individuos
5 generalmente saludables para incrementar o mantener la velocidad metabólica, disminuir el porcentaje de grasa corporal, incrementar o mantener la masa muscular, controlar el peso corporal, mejorar o mantener el funcionamiento mental (incluyendo memoria), mejorar o mantener el funcionamiento
10 muscular, mejorar o mantener el estado de ánimo, y controlar el estrés.

Un objeto de la presente invención proporciona un extracto de planta, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos o metabolitos aislables del mismo o
15 sintetizados, para el uso en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad iniciado o caracterizado (i) por la actividad mitocondrial inadecuada; (ii) por trastornos metabólicos tales como diabetes y obesidad; (iii) por una declinación de la función cognitiva; o (iv) por alteraciones
20 del estado de ánimo.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un extracto de fruta, fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos aislables del mismo, para el uso como un inductor de la función
25 mitocondrial.

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

En otro aspecto, la invención proporciona un
30 extracto de fruta, fracción activa del mismo, o uno o más

000008

componentes activos aislables del mismo, para el uso en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad iniciado o caracterizado por la función mitocondrial reducida.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de
5 un fruto o un extracto, o fracción activa del mismo, o uno o más componentes activos aislables del mismo, como se definió anteriormente para la manufactura de un medicamento para el uso en (i) la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad iniciado o caracterizado por la función
10 mitocondrial reducida; o (ii) mejoramiento de la función cognitiva o muscular. Tales estados de enfermedad pueden incluir, sin limitación, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, trastorno de ansiedad, trastorno metabólico, diabetes mellitus, y
15 obesidad.

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para la manufactura de un medicamento para el uso en (i) la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad iniciado o caracterizado por la función mitocondrial
20 reducida; o (ii) mejoramiento de la función cognitiva o muscular; el proceso se caracteriza por el uso, como un ingrediente esencial del medicamento, de un fruto, o un extracto o fracción activa del mismo o uno o más componentes activos aislables del mismo como se definió anteriormente.

25 En un aspecto aún adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un componente activo derivado de un fruto o un extracto o fracción activa o uno o más componentes activos aislables del mismo como se definió anteriormente y un portador
30 farmacéuticamente aceptable.

000009

Un objeto de la presente invención es proporcionar extractos de plantas, fracción activa de los mismos, o uno o más componentes activos o metabolitos aislables de los mismos, o sintetizados, para el uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto que se beneficiaría de la actividad mitocondrial incrementada, para mejorar (i) la función cerebral, (ii) la función metabólica, incluyendo diabetes u obesidad, (iii) el funcionamiento muscular y (iv) el incremento de los niveles de ATP de tejido.

Un objeto de la presente invención es proporcionar extractos, composiciones y compuestos los cuales son neuroprotectores, neurotróficos, y/o promotores de excrecencia de neuritas y, en consecuencia, mejorar la función cognitiva, así como también los métodos de uso de estos compuestos y composiciones.

Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos y composiciones que mejoran, protegen, y mantienen la función cerebral y cognición. Otro objeto de esta invención es mejorar, proteger contra y manejar trastornos del estado de ánimo. Otro objeto de esta invención es la protección contra trastornos o síntomas inducidos por estrés o asociados con estrés.

Un objeto de esta invención es proporcionar compuestos neuroprotectores para proteger al cerebro de lesiones, así como también mejorar el funcionamiento cognitivo y memoria en adultos normales. Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos que estimulan la plasticidad neuronal. La plasticidad neuronal es bien sabido que es un proceso clave necesario para las funciones cognitivas y memoria. Tales compuestos pueden

000010

influir en la excrecencia de neuritas, número de ramificaciones por células, procesos principales por células y números uniformes de sinapsis formadas.

La invención también se refiere a varios compuestos
5 polifenol y derivados de los mismos, relacionados con elagitaninos, como compuestos naturales bioactivo encontrados en la granada y otras frutas, así como también extractos naturales bioactivos los cuales contienen estos compuestos. Estos compuestos incluyen elagitaninos, punicalagina, y ácido
10 elágico, todos los cuales se encuentran en la granada, pero también se pueden aislar de otros frutos y bayas, así como también metabolitos de estos compuestos. Como se describe en la presente, estos compuestos ahora se ha mostrado que tienen efectos benéficos en (i) la función mitocondrial, (ii) el
15 metabolismo celular, y (iii) la plasticidad neuronal.

El uso de modelación in vitro de excrecencia de neuritas y formación de proceso en cultivo de células neuronales y células primarias, varios compuestos fueron examinados por sus efectos benéficos.

20 Como se describió anteriormente, el envejecimiento, neurodegeneración, y estrés crónico tienen impactos negativos en la excrecencia de neuritas. Notablemente, se ha descubierto que los compuestos de la presente invención tienen propiedades neuroprotectoras, exhiben fuerte actividad
25 estimulatoria en células PC-12 y neuronas mesencefálicas primarias, y mejoran la función cognitiva y memoria en modelos animales.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición, tal como un farmacéutico, un alimento médico, un
30 alimento funcional, un aditivo alimenticio, o un suplemento

dietético, que comprende los compuestos o una mezcla de los mismos de la invención. La composición también puede contener opcionalmente un agente terapéutico adicional, o se puede administrar en combinación con otro compuesto terapéutico.

5 También se proporcionan productos empaquetados, que contienen la composición mencionada anteriormente y una etiqueta y/o instrucciones para el uso en el mejoramiento de la memoria y funcionamiento cognitivo y/o para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con el daño al cerebro típico
10 de las afecciones encontradas en el adulto mayor.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de extracto de granada: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que
15 consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el
20 funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de un elagitanino: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que
25 consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el
30 funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

000012

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de punicalagina: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que
5 consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el
10 funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de ácido elágico: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que
15 consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el
20 funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de una urolitina: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que
25 consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el
30 funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es obesidad.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es velocidad metabólica reducida.

5 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es síndrome metabólico.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es diabetes mellitus.

10 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es enfermedad cardiovascular.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es hiperlipidemia.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es enfermedad neurodegenerativa.

15 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es trastorno cognitivo.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es trastorno del estado de ánimo.

20 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es estrés.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es trastorno de ansiedad.

25 En cada uno de los anteriores, en una modalidad el producto alimenticio o suplemento nutricional es para el manejo de peso.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad el producto alimenticio o suplemento nutricional es para incrementar el funcionamiento muscular.

30 En cada uno de los anteriores, en una modalidad el producto alimenticio o suplemento nutricional es para

incrementar el funcionamiento mental.

Un aspecto de la invención es un método para incrementar o mantener la función mitocondrial. El método incluye la etapa de poner en contacto las células con una
5 cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar la función de las mitocondrias.

Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir, o controlar una afección o enfermedad relacionada con mitocondrias asociada con una función
10 mitocondrial alterada o una densidad mitocondrial reducida. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad o afección asociada con la función mitocondrial
15 alterada o densidad mitocondrial reducida.

Un aspecto de la invención es un método para incrementar la velocidad metabólica. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la
20 misma, para incrementar la velocidad metabólica.

Un aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la
25 misma, para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

Un aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar la obesidad. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para
30 prevenir o tratar la obesidad.

000015

Un aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar enfermedad cardiovascular. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular.

Un aspecto de la invención es un método para tratar la hiperlipidemia. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la hiperlipidemia. En una modalidad, la hiperlipidemia es hipertrigliceridemia. En una modalidad, la hiperlipidemia es ácidos grasos libres elevados.

Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno metabólico. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno metabólico. En una modalidad, el trastorno metabólico es diabetes mellitus. En una modalidad, el trastorno metabólico es obesidad.

Un aspecto de la invención es un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad neurodegenerativa. En una modalidad, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste de Complejo de demencia por SIDA, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia

000016

telangiectasia, enfermedad de Batten, encefalopatía
espongiforme bovina (BSE), enfermedad de Canavan,
degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob,
demencia con cuerpos de Lewy, insomnio familiar fatal,
5 degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de
Huntington, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe,
enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis
múltiple, atrofia de sistemas múltiples, neuroacantocitosis,
enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Parkinson,
10 enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, parálisis
supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de
Sandhoff, esclerosis mielinoclástica difusa, ataxia
espinocerebelar, degeneración combinada subaguda de la médula
espinal, tabes dorsal, enfermedad de Tay-Sachs, encefalopatía
15 tóxica, encefalopatía espongiforme transmisible, y síndrome
del erizo tambaleante. En una modalidad, la enfermedad
neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste de
enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica,
enfermedad de Huntington, y enfermedad de Parkinson. En una
20 modalidad, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de
Alzheimer.

Un aspecto de la invención es un método para
mejorar la función cognitiva. El método incluye la etapa de
administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad
25 efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para
mejorar la función cognitiva. En una modalidad, la función
cognitiva se selecciona del grupo que consiste de percepción,
memoria, atención, comprensión del habla, generación del
habla, comprensión de lectura, creación de imágenes,
30 aprendizaje, y razonamiento. En una modalidad, la función

000017

cognitiva se selecciona del grupo que consiste de percepción, memoria, atención, y razonamiento. En una modalidad, la función cognitiva es memoria.

Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno cognitivo. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno cognitivo. En una modalidad, el trastorno cognitivo se selecciona del grupo que consiste de delirio, demencia, trastorno del aprendizaje, trastorno de déficit de atención (ADD), y trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD). En una modalidad, el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje. En una modalidad, el trastorno cognitivo es trastorno de déficit de atención (ADD). En una modalidad, el trastorno cognitivo es trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD).

Un aspecto de la invención es un método para tratar déficit cognitivo inducido por estrés o relacionado con estrés. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el déficit inducido por estrés o relacionado con estrés.

Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno del estado de ánimo. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del estado de ánimo. En una modalidad, el trastorno del estado de ánimo se selecciona del grupo que consiste de depresión, depresión

000018

post-parto, distimia, y trastorno bipolar. En una modalidad, el trastorno del estado de ánimo es depresión. En una modalidad, el trastorno del estado de ánimo es distimia.

Un aspecto de la invención es un método para tratar
5 trastorno del estado de ánimo inducido por estrés o
relacionado con estrés, por ejemplo, distimia. El método
incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del
mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina
o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del
10 estado de ánimo inducido por estrés o relacionado con estrés.

Un aspecto de la invención es un método para tratar
un trastorno de ansiedad. El método incluye la etapa de
administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad
terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de
15 la misma, para tratar el trastorno de ansiedad. En una
modalidad, el trastorno de ansiedad se selecciona del grupo
que consiste de trastorno de ansiedad generalizado, trastorno
de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia,
trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo,
20 y trastorno de estrés post-traumático. En una modalidad, el
trastorno de ansiedad es trastorno de ansiedad generalizado.
En una modalidad, el trastorno de ansiedad es trastorno de
estrés post-traumático.

Un aspecto de la invención es un método para tratar
25 ansiedad inducida por estrés o relacionada con estrés. El
método incluye la etapa de administrar a un sujeto en
necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de
una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la
ansiedad inducida por estrés o relacionada con estrés.

30 Un aspecto de la invención es un método para

000019

mejorar el funcionamiento muscular. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar el funcionamiento muscular. En una modalidad, el funcionamiento muscular se selecciona del grupo que consiste de fuerza, velocidad, y resistencia.

Un aspecto de la invención es un método para tratar una enfermedad muscular o neuromuscular. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad muscular o neuromuscular. En una modalidad, la enfermedad muscular o neuromuscular es una miopatía. En una modalidad, la enfermedad muscular o neuromuscular es una distrofia muscular. En una modalidad, la enfermedad muscular o neuromuscular es Distrofia muscular de Duchenne.

Un aspecto de la invención es un método para promover la excrecencia de neuritas. El método incluye la etapa de poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para promover la excrecencia de neuritas. En una modalidad, la puesta en contacto comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la urolitina o precursor de la misma, para promover la excrecencia de neuritas.

Las siguientes modalidades pueden pertenecer a cada aspecto y modalidad de la invención descrita y, como sea apropiado, entre sí.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la

000020

misma es una urolitina aislada.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma es un precursor de urolitina aislada.

En una modalidad, la urolitina se selecciona del
5 grupo que consiste de urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D, así como también sus metabolitos, incluyendo, por medio de ejemplo, sus formas glucuronidadas, metiladas, y sulfatadas, y combinaciones de estas urolitinas.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la
10 misma se administra como un alimento natural seleccionado del grupo que consiste de bayas, uvas, granadas, escaramujos, y nueces.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra como un producto alimenticio procesado,
15 incluyendo como medio de ejemplo un jugo, concentrado, o extracto, con base en un alimento natural seleccionado del grupo que consiste de bayas, uvas, granadas, escaramujos, y nueces.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la
20 misma se administra como jugo, concentrado, o extracto de granada.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra como un elagitanino.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la
25 misma se administra como punicalagina.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra como ácido elágico.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra como una urolitina. En una modalidad, la
30 urolitina o precursor de la misma se administra oralmente.

000021

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra parenteralmente. En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra al menos semanalmente. En varias modalidades, 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 modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra al menos diariamente. En varias modalidades, la urolitina o precursor de la misma se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 veces al día.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 0.1 - 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 2 - 120 mg de urolitina por kg de peso corporal. En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 4 - 90 mg de urolitina por kg de peso corporal. En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 8 - 30 mg de urolitina por kg de peso corporal.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero pico de al menos 0.001 micromolar (μM). En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero pico de al menos 0.01 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr

un nivel en suero pico de al menos 0.1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero pico de al menos 1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero pico de al menos 10 μM .

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero sostenido de al menos 0.001 micromolar (μM). En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero sostenido de al menos 0.01 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero sostenido de al menos 0.1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero sostenido de al menos 1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero sostenido de al menos 10 μM .

En una modalidad, el sujeto no está recibiendo una urolitina o un precursor de la misma, para tratar otra afección que requiere la administración de una urolitina o un precursor o metabolito de la misma, seleccionada del grupo que consiste de aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección, e inflamación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** representa fórmulas estructurales para urolitina A (UA), ácido elágico (EA), telimagrandina (TL),

000023

punicalagina (PA), y punicalina (PB).

La **Figura 2** representa ácido elágico (EA) y sus metabolitos, urolitina D (UD), urolitina C (UC), urolitina A (UA), y urolitina B (UB), los cuales se producen por
5 microflora intestinal en animales, incluyendo humanos.

La **Figura 3** es un par de gráficas de barra que representan los niveles de expresión en genes mitocondriales en respuesta a las concentraciones indicadas de ácido elágico (panel superior) y urolitina A (panel inferior).

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

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

20 La **Figura 5B** es una gráfica de barras que representa el análisis densitométrico de bandas en la Figura 4A que muestra el nivel relativo de P-AMPK activada después de los tratamientos en comparación con las células tratadas con control.

25 La **Figura 6** es una gráfica de barras que representa los números celulares totales para cultivos de células PC-12 después del tratamiento con 0.5 μ M de los compuestos indicados. PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

30 La **Figura 7** es una gráfica de barras que representa

000024

la excrecencia de neuritas media (μm) en células PC-12 después del tratamiento con $0.5 \mu\text{M}$ de los compuestos indicados. La excrecencia se expresa por célula. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 8** es una gráfica de barras que representa el porcentaje de células PC-12 que muestra la excrecencia de neuritas extensa ($>20 \mu\text{m}$) después del tratamiento con $0.5 \mu\text{M}$ de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 9** es una gráfica de barras que representa la formación de proceso media en células PC-12 después del tratamiento con $0.5 \mu\text{M}$ de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; PA, punicalagina; PB, punicalina; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 10** es una gráfica de barras que representa la excrecencia media por célula de neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (TH) dopaminérgica primaria después del tratamiento con $0.1 \mu\text{M}$ de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 11** es una gráfica de barras que representa el porcentaje de neuronas positivas a TH dopaminérgica primaria que muestran excrecencia de neuritas extensa ($> 20 \mu\text{m}$) después del tratamiento con $0.1 \mu\text{M}$ de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 12** es una gráfica de barras que representa el número medio de procesos formados en neuronas positivas a TH dopaminérgica primaria después del tratamiento con 0.1 μ M de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, 5 dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 13** es una gráfica de barras que representa la longitud de proceso máxima en las neuronas positivas a TH dopaminérgica primaria después del tratamiento 10 con 0.1 μ M de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 14** es una gráfica de barras que representa las ramificaciones medias por neurona positiva a 15 TH dopaminérgica primaria después del tratamiento con 0.1 μ M de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

La **Figura 15** es una gráfica de barras que 20 representa el número medio de dendritas por neurona positiva a TH dopaminérgica primaria después del tratamiento con 0.1 μ M de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; Tl, telimagrandina.

25 La **Figura 16** es una gráfica de barras que representa la longitud de dendritas media por neurona positiva a TH dopaminérgica primaria después del tratamiento con 0.1 μ M de los compuestos indicados. SP, SP600125; dbcAMP, dibutiril cíclico AMP; UA, urolitina A; EA, ácido elágico; 30 Tl, telimagrandina.

000026

La **Figura 17** es tres series de gráficas de barras que representan los efectos del tratamiento con urolitina A, punicalagina, y extracto de granada (PE) en el comienzo de la obesidad en ratones alimentados con dieta de alta grasa (HFD). La urolitina A se administró como aditivo alimenticio; PE y punicalagina se administraron por sonda. (A) seguimiento de peso corporal expresado como porcentaje de incremento en comparación con el peso corporal inicial. (B) Porcentaje de masa de grasa medida por EchoMRI después de 5 semanas de tratamiento. (C) Porcentaje de masa magra medido por EchoMRI después de 5 semanas de tratamiento. Composición del grupo: control de HFD (aditivo alimenticio): n = 10; control de HFD (sonda): n = 10; HFD más urolitina A (aditivo alimenticio): n = 9; HFD más punicalagina (sonda): n = 8; HFD más PE (sonda): n = 7. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. *p < 0.05 (prueba t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron por ANOVA de 2 vías. Los valores de p se indican.

La **Figura 18** es dos pares de gráficas de barras que representan los efectos del ácido elágico y urolitina A en la masa magra y masa de grasa en ratones alimentados con dieta chow estándar. (A) Porcentaje de masa magra (músculo) medida por EchoMRI después de 2 semanas de tratamiento. (B) Porcentaje de masa de grasa (músculo) medida por EchoMRI después de 2 semanas de tratamiento. Composición del grupo: control de dieta chow (aditivo alimenticio): n = 8; dieta chow más ácido elágico (aditivo alimenticio): n = 7; Dieta chow más urolitina A (aditivo alimenticio): n = 7. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. *p < 0.05 (Prueba t de Student).

La **Figura 19** es un par de gráficas y un par

correspondiente de gráficas de barras que representan los efectos del ácido elágico y urolitina A en el consumo de oxígeno en ratones alimentados con dieta chow estándar. (A) Seguimiento de consumo de oxígeno durante un período de 20 h.

5 Las barras llenas corresponden a la fase de oscuridad (7 pm a 7 am). El resto corresponde a la fase de luz. (B) Consumo de oxígeno representado como el área bajo la curva (AUC). Composición del grupo: control de dieta chow (aditivo alimenticio): n = 8; dieta chow más ácido elágico (aditivo alimenticio): n = 7; dieta chow más urolitina A (aditivo alimenticio): n = 7. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. *p < 0.05 (Prueba t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron por ANOVA de 2 vías. El valor de p se indica (Control de dieta chow vs dieta chow más
10 tratamiento).
15

La **Figura 20** es una serie de gráficas y una serie correspondiente de gráficas de barras que representan el efecto de urolitina A, punicalagina, y extracto de granada (PE) en el consumo de oxígeno en ratones alimentados con una
20 dieta de alta grasa (HFD). (A) Seguimiento del consumo de oxígeno durante un período de 20 h. Las barras llenas corresponden a la fase de oscuridad (7 pm a 7 am). El resto corresponde a la fase de luz. (B) Consumo de oxígeno representado como el área bajo la curva (AUC). Composición
25 del grupo: control de HFD (aditivo alimenticio): n=10; control de HFD (sonda): n = 10; HFD más urolitina A (aditivo alimenticio): n = 9; HFD más punicalagina (sonda): n = 8; HFD más PE (sonda): n = 7. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. *p < 0.05 (Prueba t de Student). Para el panel A, los
30 resultados se analizaron por ANOVA de 2 vías.

000028

La **Figura 21** es un par de gráficas y un par correspondiente de gráficas de barras que representan el efecto del ácido elágico y urolitina A en la relación de intercambio respiratorio (RER) en ratones alimentados con dieta chow estándar. (A) Seguimiento de la RER durante un período de 20 h. Las barras llenas corresponden a la fase de oscuridad (7 pm a 7 am). El resto corresponde a la fase de luz. (B) RER representada como la RER media. Composición del grupo: Control de dieta chow (aditivo alimenticio): $n = 8$; Dieta chow más ácido elágico (aditivo alimenticio): $n = 7$; Dieta chow más urolitina A (aditivo alimenticio): $n = 7$. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. $*p < 0.05$ (Prueba t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron por ANOVA de 2 vías. El valor de p se indica (Control de dieta chow vs dieta chow más tratamiento).

La **Figura 22** es una serie de gráficas y una serie correspondiente de gráficas de barras que representan el efecto de la urolitina A, punicalagina, y extracto de granada (PE) en la relación de intercambio respiratorio (RER) en ratones alimentados con una dieta de alta grasa (HFD). (A) Seguimiento de RER durante un período de 20 h. (B) RER representada como la RER media. Composición del grupo: control de HFD (aditivo alimenticio): $n = 10$; HFD más urolitina A (aditivo alimenticio): $n = 9$; HFD más punicalagina (aditivo alimenticio): $n = 10$; HFD más PE (aditivo alimenticio): $n = 10$. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. $*p < 0.05$ (Prueba t de Student). Para el panel A, los resultados se analizaron por ANOVA de 2 vías.

La **Figura 23** es dos series de gráficas que representan el efecto de la urolitina A, punicalagina, y

000029

extracto de granada (PE) en triglicéridos y ácidos grasos libres en ratones alimentados con una dieta de alta grasa (HFD). (A) Niveles en plasma de triglicéridos en ratones alimentados con HFD tratados por 14 semanas. (B) Niveles en plasma de ácidos grasos libres en ratones alimentados con HFD tratados por 14 semanas. Composición del grupo: control de HFD (aditivo alimenticio): $n = 10$; control de HFD (sonda): $n = 10$; HFD más urolitina A (aditivo alimenticio): $n = 9$; HFD más punicalagina (sonda): $n = 8$; HFD más PE (sonda): $n = 7$. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. $*p < 0.05$ (Prueba t de Student).

La **Figura 24** es una serie de gráficas que representan el efecto de urolitina A, ácido elágico, y punicalagina en glicemia en ratones alimentados con una dieta de alta grasa (HFD). (A) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con HFD tratados por aditivo alimenticio con urolitina A por 10 semanas. (B) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con HFD tratados por aditivo alimenticio con ácido elágico por 10 semanas. (C) Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con HFD tratados por aditivo alimenticio con punicalagina por 10 semanas. Composición del grupo: control de HFD (aditivo alimenticio): $n = 10$; HFD más urolitina A (aditivo alimenticio): $n = 9$; HFD más punicalagina (aditivo alimenticio): $n = 10$. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. $*p < 0.05$ (Prueba t de Student).

La **Figura 25** es una gráfica de líneas y una gráfica de barras que representan el efecto de la urolitina A (UA) en respiración no acoplada y basal (consumo de oxígeno) en *C. elegans* viejos (10 días de edad). (A) Respiración no acoplada

000030

y basal (FCCP) en gusanos de control de 10 días de edad tratados con 0.1% DMSO y gusanos de 10 días de edad tratados con 30 μ M urolitina A en 0.1% DMSO. (B) Área bajo la curva (AUC) representativa de respiración no acoplada (FCCP) en gusanos de control de 10 días de edad tratados con vehículo (0.1% DMSO) o 30 μ M urolitina A en 0.1% DMSO. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. *p < 0.05 (Prueba t de Student). OCR, velocidad de consumo de oxígeno.

La **Figura 26** es una gráfica de barras que representa el efecto de la urolitina A en mitocondrias en músculo de *C. elegans*. La cepa SJ4103 de *C. elegans* transgénica muestra fluorescencia debido a la expresión específica de músculo de proteína fluorescente verde (GFP) la cual se dirige a la membrana de mitocondrias. La presencia de mitocondrias en el músculo de los *C. elegans* es muestra por un incremento en la fluorescencia. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. *p = 0.0014 (Prueba t de Student).

La **Figura 27** es una gráfica de barras que representa la movilidad de ratones sometidos a estrés crónico con o sin tratamiento con extracto de granada.

La **Figura 28** es una gráfica de barras que representa el grado de una respuesta de "paralización" de ratones en un contexto de inducción de ansiedad con o sin tratamiento con extracto de granada.

La **Figura 29** es una gráfica de barras que representa el efecto en ratones de la administración de extracto de granada en el grado de inhibición inducida por ansiedad de erguido.

La **Figura 30** es una gráfica de barras que representa el efecto de la administración de extracto de

granada en el grado de inhibición inducida por ansiedad de acicalamiento en ratones.

La **Figura 31** es una gráfica de líneas que representa la extinción de una memoria a un contexto adverso particular cuando se expone repetidamente al contexto en la ausencia del efecto adverso. Los datos se muestran para ratones que han sufrido estrés a edad temprana pero son tratados con el elagitanino punicalagina. La paralización (%) se expresa como un porcentaje del tiempo de paralización durante la exposición inicial al contexto.

La **Figura 32** es una gráfica que representa el efecto en ratones del estrés crónico en el aprendizaje efectivo en el laberinto de agua de Morris.

La **Figura 33** es una gráfica de barras que representa el efecto en ratones crónicamente estresados de la administración de extracto de granada en el funcionamiento de aprendizaje en el laberinto de agua de Morris.

La **Figura 34** es una gráfica que representa la distancia acumulada de una plataforma oculta para varios ensayos durante la fase de entrenamiento en el laberinto de agua de Morris, una medición del aprendizaje cognitivo. Los datos se muestran para ratones que han sufrido estrés a edad temprana, normalmente ratones de control criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana pero son tratados con el elagitanino punicalagina. La distancia a la plataforma es la suma de las distancias acumuladas entre el ratón y la plataforma oculta para todos los intervalos medidos (25 intervalos/seg) durante el período de observación (60 seg).

La **Figura 35** es una gráfica de barras que representa la memoria de ratas viejas en una prueba de

reconocimiento social cuando se tratan ya sea con el extracto de granada 1108 o un control (Ctrl).

La **Figura 36** es una gráfica de barras que representa los resultados del laberinto de agua de Morris para ratas viejas tratadas con extracto de granada 1108 o control (Ctrl).

La **Figura 37** es una gráfica de barras que representa el porcentaje de alteraciones correctas en un laberinto en Y para el modelo de ratón 5XFAD con enfermedad de Alzheimer, tanto tratado como no tratado, así como también ratones de control normales. Significancia: $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, ANOVA de una vía.

La **Figura 38** es una gráfica de barras que representa los resultados del laberinto de agua de Morris para ratones transgénicos con modelación de enfermedad de Alzheimer (hAPP-Tg) tratados con extractos derivados de granada 31008, 61109, 71109, o control (Vehículo). También se muestran resultados para ratones tipo silvestre (No Tg) tratados con control (Vehículo).

La **Figura 39** es una gráfica de barras que representa los resultados de la caja de oscuridad/luz para ratones que han sufrido estrés a edad temprana versus ratones de control normalmente criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Significancia: $*p < 0.05$, (Prueba t de Student).

La **Figura 40** es una gráfica de barras que representa los resultados para el laberinto en O elevado para ratones que han sufrido estrés a edad temprana versus ratones de control normalmente criados, y ratones que han sufrido

estrés a edad temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Significancia: $*p < 0.05$, (Prueba t de Student).

La **Figura 41** es una gráfica de barras que
5 representa los resultados para la prueba de nado forzado para ratones que han sufrido estrés a edad temprana versus ratones de control normalmente criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.
10 Significancia: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Prueba t de Student).

La **Figura 42** es una gráfica de barras que
representa los resultados para el entrenamiento en el
paradigma de acondicionamiento de miedo contextual durante la
primera descarga leve la cual toma lugar a 4 min. Los
15 resultados se muestran para ratones que han sufrido estrés a edad temprana versus ratones de control normalmente criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana y tratados con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.

La **Figura 43** es una gráfica de barras que
representa la extinción de una memoria a un contexto adverso
particular cuando se expone repetidamente al contexto en la
ausencia del efecto adverso. Los datos se muestran para
ratones que han sufrido estrés a edad temprana, ratones de
20 control sin estrés normalmente criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana y tratamiento con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Significancia: $*p < 0.05$, $\#p=0.05$ (Prueba t de Student). Los animales sin estrés normales se comparan con
25 los animales estresados a edad temprana (es decir, separación
30

maternal). Los animales estresados a edad temprana tratados con punicalagina se comparan con animales estresados a edad temprana no tratados.

La **Figura 44** es una gráfica de líneas que demuestra el nivel de aprendizaje motriz como se mide por la latencia en segundos para caer de una barra giratoria. Los datos se muestran para ratones que han sufrido estrés a edad temprana, ratones de control normalmente criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana y se han tratado con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.

La **Figura 45** es una gráfica que representa la latencia de escape en segundos del laberinto de agua de Morris durante la fase de entrenamiento, una medición del aprendizaje cognitivo. Los datos se muestran para ratones que han sufrido estrés a edad temprana, ratones de control normalmente criados, y ratones que han sufrido estrés a edad temprana y se han tratado con el elagitanino punicalagina. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Significancia: *p < 0.05 (Prueba t de Student).

La **Figura 46** es una gráfica de barras que representa los efectos de los compuestos derivados de granada en el reconocimiento contextual en ratones normales, ya sea no tratados o tratados con punicalagina o urolitina A. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Significancia: *p < 0.05 (prueba t de Student).

La **Figura 47** es una gráfica de barras que representa los efectos de los compuestos derivados de granada en la retención de memoria para un contexto particular en ratones normales, ya sea no tratados o tratados con

punicalagina o urolitina A. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Significancia: Los datos se analizaron usando ya sea ANOVA de una vía o ANOVA de medida repetida, seguido por una prueba de comparación múltiple de LSD pos-hoc de Fisher.

5 *p < 0.05.

La **Figura 48** es una gráfica de líneas que demuestra el funcionamiento muscular y habilidades motrices como se mide por la latencia para caer en segundos desde una barra giratoria. Los datos se muestran para ratones de control no
10 tratados normalmente criados y ratones que se han tratado con el elagitanino punicalagina. Significancia: *p < 0.05 por análisis de ANOVA.

La **Figura 49** es una gráfica de líneas que demuestra el nivel del funcionamiento muscular y resistencia como se
15 mide por la capacidad de un ratón para correr en una banda caminadora a velocidades elevadas. Los datos se muestran para ratones de control no tratados normalmente criados y ratones que se han tratado con urolitina A. Significancia: *p < 0.05, **p < 0.01 (Prueba t de Student).

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En biología y psicología, el término "estrés" se refiere a la consecuencia de la falla de un humano u otro animal a responder apropiadamente a amenazas fisiológicas,
25 emocionales, o físicas, ya sea reales o imaginadas. El término "estrés" se empleó primero en un contexto biológico por el endocrinólogo Hans Selye en la década de 1930. Más tarde amplió y popularizó el concepto para incluir la respuesta fisiológica inapropiada a cualquier demanda. Cubre
30 un amplio rango de fenómenos, desde irritación leve a

000036

disfunción drástica que puede causar crisis severa de la salud.

Todas estas características psicobiológicas de estrés pueden representar manifestaciones de estrés oxidativo, un desequilibrio entre la producción y manifestación de especies de oxígeno reactivas y la capacidad de un sistema biológico fácilmente para desintoxicar los intermediarios reactivos o para reparar el daño resultante. Las alteraciones en el estado redox normal de tejidos pueden causar efectos tóxicos mediante la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, lípidos, y ADN. Algunas especies oxidativas reactivas aún pueden actuar como mensajeros mediante un fenómeno llamado "señalización redox".

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

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

Otras enzimas capaces de producir superóxido (O_2^-) son xantina oxidasa, NADPH oxidasas y citocromos P450. El peróxido de hidrógeno, otro agente oxidante fuerte, se produce por una amplia variedad de enzimas incluyendo diversas oxidasas. Las especies de oxígeno reactivas juegan papeles importantes en la señalización celular, un proceso llamado señalización redox. Por consiguiente, para mantener

000037

la homeostasis celular apropiada un equilibrio se debe alcanzar entre la producción de oxígeno reactivo y el consumo.

Los mejores antioxidantes celulares estudiados son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutatióna peroxidasa. Los antioxidantes enzimáticos menos bien estudiados incluyen las peroxirredoxinas y la sulfirredoxina recientemente descubierta. Otras enzimas que tienen propiedades antioxidantes (aunque este papel no es primario) incluyen paraoxonasa, glutatióna-S transferasas, y aldehído deshidrogenasas.

El estrés oxidativo contribuye a la lesión de tejido después de la irradiación e hiperoxia. Se sospecha que es importante en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y enfermedad de Huntington. El estrés oxidativo también se piensa que está vinculado con ciertas enfermedades cardiovasculares, puesto que la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) en el endotelio vascular es un precursor para la formación de placa. El estrés oxidativo también juega un papel en la cascada isquémica debido a la lesión por reperfusión de oxígeno después de hipoxia. Esta cascada incluye tanto apoplejías y ataques cardíacos. El estrés oxidativo también se ha implicado en síndrome de fatiga crónica.

Notablemente, los inventores han descubierto que ciertos compuestos derivados de elagitaninos son útiles en el tratamiento y prevención de manifestaciones fisiológicas y psicológicas de estrés, incluyendo estrés oxidativo. Sin pretender estar ligado a cualquier mecanismo de acción, se

considera que los compuestos ejercen efectos benéficos en mitocondrias, promoviendo y restaurando las funciones mitocondriales cruciales y contrarrestando la disfunción mitocondrial inducida por estrés. Estos mismos compuestos se han descubierto, de conformidad con la invención actual, que son útiles en el tratamiento y prevención de cualquiera de una variedad de afecciones, enfermedades, y trastornos relacionados con la disfunción mitocondrial incluyendo, sin limitación, enfermedades neurodegenerativas y trastornos cognitivos, trastornos metabólicos incluyendo resistencia a la insulina, trastornos del estado de ánimo, y trastornos de ansiedad.

Los elagitaninos (ETs) son polifenoles incluidos dentro de los "taninos hidrolizables" así llamados en los cuales el ácido hexahidroxidifénico forma diésteres con azúcares (más frecuentemente β -D-glucosa). Los ET pueden presentarse como polímeros complejos que alcanzan pesos moleculares hasta 4000 y mayores. Estos polímeros se pueden hidrolizar con ácidos o bases para producir ácido elágico (EA), el cual se puede usar indirectamente para cuantificar ET. El EA a su vez es una fuente de productos metabólicos adicionales incluyendo urolitinas.

Muchas especies de plantas que contienen elagitaninos se han usado para el tratamiento de enfermedades, particularmente en Asia (Okuda et al., 2009). Estos incluyen *Agrimonia pilosa* (agrimoniina), *Camelia japonica* (cameliatanino A), *Cornus officinalis* (cornusina A), *Geranium thunbergii* (geraniina), *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 quebula* (ácido quebulínico), entre otras. Los usos principales de estas plantas medicinales se han asociado a sus actividades antioxidantes, antidiarreicas, antimicrobianas, e inmunomoduladoras.

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

También son abundantes en las granadas (Gil et al., 2000), y uvas moscatel (Lee and Talcott, 2002) y son constituyentes importantes de madera, particularmente roble (Glabasnia and Hofmann, 2006). Los elagitaninos se pueden incorporar en productos alimenticios, tales como vinos, y whiskey, mediante la migración desde la madera a la matriz alimenticia durante diferentes procesos de envejecimiento. El ácido elágico también se ha encontrado en varios tipos de miel y se ha propuesto como un marcador floral para miel de brezo (Ferrerres et al., 1996). El ácido elágico libre y diferentes derivados glicosídicos también están presentes en

000040

estos productos alimenticios, incluyendo glucósidos, ramnósidos, arabinosidos y los ésteres de acetilo correspondientes (Zafrilla et al., 2001).

Un número de estudios han mostrado que el contenido de elagitanino de varios productos alimenticios puede ser bastante alto (**Tabla 1**). Por ejemplo, un cristal de jugo de granada (200 mL) puede proporcionar tanto como 1 g de elagitaninos y ácido elágico conjuntamente, una porción de frambuesas (100 g de frambuesas) alrededor de 300 mg, una porción de fresas 70 mg, y cuatro nueces de castilla algunos 400 mg de elagitaninos.

Los elagitaninos dietéticos representativos incluyen punicalagina de granada, sanguina-H-6 de frambuesa y fresa, y pedunculagina de nueces de castilla. Todos estos liberan ácido elágico en la hidrólisis, aunque otros metabolitos también se pueden producir y son distintivos de los elagitaninos individuales (por ejemplo, ácido galágico y ter-galágico).

Tabla 1. Contenido de elagitaninos (ET) y ácido elágico (EA) en varios productos alimenticios.

Alimento	Contenido
<i>Frutos frescos</i>	
Fresa	263-330 mg/100 g f.w.
25 Fresa	51-330 mg/100 g f.w.
Frambuesa	77-85 mg/100 g f.w.
Frambuesa	25 mg/100 g f.w.
Camemoro	315 mg/100 g f.w.
Camemoro	56-360 mg/100 g f.w.
30 Zarzamora	1.5-2.0 mg/g d.w.

000741

Zarza ártica	69-320 mg/100 g f.w.
Granada	35-75 mg/100 g f.w. (arilos)
Uvas moscatel	36-91 mg/100 g f.w.

5

Nueces

Nuez de castilla	802 mg/50 g (8 nuts)
Pacana	20.96-86.2 mg/g (EA)
Castaña	1.61-24.9 mg/kg d.w. (EA)

10

Frutos procesados

Jugo de granada (punicalagina)	1500-1900	mg/L
Jugo de granada	2020-2660 mg/L (ET y EA)	
15 Jugo de granada	5700 mg/L (ET y EA)	
Mermelada de fresa	76 mg/100 g f.w.	
Mermelada de frambuesa	24 mg/100 g f.w.	
Jugo de uva moscatel	18-84 mg/L	

20 *Vinos*

Vino tinto envejecido en barricas de roble	9.4 mg/L
Vino tinto envejecido en barricas de roble	50 mg/L

25 Vino de uva moscatel 2-65 mg/L

Espíritus

Whiskey	1-2 mg/L
Cognac	31-55 mg/L

30 f.w., peso fresco

000042

d.w., peso seco

Los elagitaninos tienen una enorme variabilidad estructural, formando derivados diméricos y oligoméricos. También tienen una distribución más extendida que las galotaninos. Los elagitaninos adicionales y fuentes reportadas para los mismos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Otros elagitaninos.

	Peso Molecular	Fuente	Referencia
10		Duramen de Roble Europeo	(Puech, Mertz et al. 1999)
	2-O-galoil-punicalina		
	Casaurictina	Árbol de rhu, planta Stachyrys	Wikipedia
15	Castalagina y Vecalagina	934.63	Corteza de granada
	Castalina		(Tanaka, Nonaka et al. 1986)
	Casuarictina	<i>T. japonica</i>	
	Casuariina	Hojas de árbol de banaba	(Bai, He et al. 2008)
20	Casuarinina	Hojas de árbol de banaba	(Bai, He et al. 2008)
	Casuarinina	Granada	
	Ácido quebulágico	<i>T. quebula</i>	
	Ácido quebulinicónico	<i>T. quebula</i>	
	Corilagina	Granada	
	Cornusiina E		
25	Epipunicacorteína A	Hojas de árbol de banaba	(Bai, He et al. 2008)

000043

	Flosina B		Hojas de árbol de banaba	(Bai, He et al. 2008)
	Gemina D		<i>T. japonica</i>	
	Granatina A		Granada	
	Granatina B		Granada	
5	Grandinina			
	Lagerstroemina		Hojas de árbol de banaba	(Bai, He et al. 2008)
	Lambertianina C		Frambuesas	(Gasperotti, Masuero et al.)
10	Pedunculagina	784.52	Corteza de granada, y pericarpio	(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	
15	Roburina A			
	Roburina B			
	Roburina C			
	Roburina D			
	Roburina E			
	Rubusuaviina C		Hojas de té	
20	Sanguina H-4		Uvas moscatel	(Lee, Johnson et al. 2005)
	Sanguina H-5		Uvas moscatel	(Lee, Johnson et al. 2005)
	Sanguina H-6		Frambuesas , Sanguisorba	(Vrhovsek, Palchetti et al. 2006)
25	Sanguina H-10			

000044

	Estaquiurina		Hojas de árbol de banaba	(Bai, He et al. 2008)
	Estrictinina			
	Telimagrandina I		Granada	
5	Telimigrandina II		Granada	
	Terquebulina			
	Terflavina A			
	Terflavina B			
	Tergalagina		<i>T. catappa</i>	
	Terminalina/ Galagildilactona		Granada	

Muchos elagitaninos potencialmente activos se
10 pueden aislar de varias especies de plantas *Terminalia*. En particular, tanto la punicalagina como la punicalina se han identificado en varias especies *Terminalia*, incluyendo, por ejemplo, *T. catappa*, *T. quebula* Retz, *T. myriocarpa*, y *T. citrine*. La punicalagina también se ha aislado de *Cistus*
15 *salvifolius* (un arbusto Mediterráneo) y *Combretum molle* (un arbusto Africano).

El ácido elágico normalmente se encuentra en cantidades relativamente bajas en tejidos de plantas. El ácido elágico se piensa que se deriva de elagitaninos, los
20 cuales cuando se descomponen forman ácido hexahidroxidifénico, el cual se convierte espontáneamente a ácido elágico. Algunas fuentes adicionales de ácido elágico se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Fuentes con ácido elágico.

Fruto	Cantidad	Referencia
Acai	55.4 $\pm$ 1.39 mg/L pulpa fresca	(Del Pozo-Insfran, Brenes et al.)
Umbú	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.)
Cambucí	240 mg/100 g peso seco 512 mg/100 g peso seco (comercial)	(De Souza Schmidt Goncalves, Lajolo et al.)
Uvas moscatel	219 mg/100 g peso seco	(Lee, Johnson et al. 2005)

Los frutos de granada (*Punica granatum*) son alimentos medicinales antiguos los cuales se han usado durante siglos en la medicina popular. Se consumen frescos y como jugo, el cual es una fuente excelente de elagitaninos y ácido elágico. Los elagitaninos en el jugo y cáscara de fruta de granada incluyen punicalina, punicalagina, corilagina, casuarinina, terminalina/galagildilactona, pedunculagina, telimagrandina, granatina A, y granatina B. Otras partes de la planta de granada contienen elagitaninos adicionales, incluyendo punicafolina, punicacorteína A, punicacorteína B, punicacorteína C, punicacorteína D, y punigluconina. Los jugos comerciales contienen elagitaninos tipo galagilo, incluyendo isómeros de punicalagina (1500-1900 mg/L), taninos hidrolizables no definidos (400-500 mg/L), y ácido elágico y sus glucósidos (120-260 mg/L) (Gil et al., 2000). Las punicalaginas, elagitaninos en los cuales los ácidos galágico

000046

y elágico se enlazan a una molécula de glucosa, son abundantes en la cáscara de granada. Los isómeros de punicalagina y derivados de ácido elágico no están presentes en el jugo de arilo, pero durante el procesamiento del jugo industrial se extraen de la cáscara y membrana que rodea los arilos y se liberan en grandes cantidades en el jugo.

Los extractos de la invención se pueden preparar primero extrayendo el jugo de una fruta, por ejemplo, se puede extraer el jugo de la granada usando métodos de extracción de jugo industriales estándares conocidos en el arte los cuales pueden incluir la extracción de jugo de fruta completa por aplicación de presión al fruto entero o primero quitando la cáscara de la granada y luego aplicando presión al material restante, que consiste de los arilos, los materiales membranosos los cuales atrapan los arilos y el material de la cáscara producido durante el proceso de separación de la cáscara. Alternativamente, la cáscara, la cual es una rica fuente de los elagitaninos, en particular punicalagina, puede sufrir un proceso de extracción de jugo que incluye una extracción con agua. Los métodos de extracción sin agua alternativos pueden emplear otros solventes tales como etanol, acetona, o metanol, como medio de ejemplo.

El extracto típicamente es un extracto acuoso, el cual puede consistir esencialmente del jugo de la fruta, opcionalmente con la adición de agua extra. Tales extractos acuosos se pueden concentrar, enriquecer o condensar, por ejemplo, por técnicas estándares, por ejemplo, evaporación bajo presión reducida y métodos de filtración. Los ejemplos de concentrados son aquellos los cuales son al menos 2 veces

000047

concentrados, más usualmente al menos 4 veces, por ejemplo al menos 8 veces, al menos 40 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, o al menos 1000 veces.

Los extractos se pueden fraccionar para aislar uno
5 o más componentes activos en estos, por ejemplo, por
filtración de peso molecular, o cromatografía en un soporte
sólido adecuado tal como un gel de sefarosa (para
cromatografía por exclusión de tamaño) o columna de
intercambio iónico usando HPLC en una alúmina o sílice
10 adecuadamente tratado, por ejemplo sílice revestido con ODS,
o por extracción con solvente.

Los estudios de estimulación de digestión *in vitro*
han mostrado que, en general, los elagitaninos son bastante
estables bajo las condiciones fisiológicas del estómago. Las
15 condiciones ácidas (HCl, pH 1.8-2.0) y las enzimas del
estómago no hidrolizan los elagitaninos originales para
liberar ácido elágico libre (EA), y no se ha observado
degradación de los elagitaninos (Tomas-Barberan et al.,
2009). Mientras que el estómago parece ser el primer lugar
20 importante para la absorción de EA libre, los elagitaninos no
se absorben. Bajo las condiciones fisiológicas del intestino
delgado, sin embargo, hay una liberación de EA libre a partir
de elagitaninos. Esta hidrólisis parece ser debido a las
condiciones de pH (pH alcalino neutro a leve, 7.0-7.3) antes
25 que al efecto de las enzimas pancreáticas y sales biliares
(Larrosa et al., 2006).

Los estudios en animales también se han usado para
evaluar la biodisponibilidad y metabolismo del EA y
elagitaninos. Una rápida absorción y metabolismo del EA se
30 reportó por Doyle and Griffiths (1980) en ratas. Estos

autores detectaron la urolitina A (UA) y otro metabolito (muy probablemente urolitina B (UB)) en heces y orina. Se demostró que tanto la UA como UB son de origen microfloral puesto que ninguna se encontró en animales libres de gérmenes. El EA sin
5 cambió no fue detectado en la orina y heces. Estas urolitinas son grandemente absorbidas y glucuronizadas por las células intestinales. En este caso, no se producen metil éteres ya que la UA y UB no tienen agrupamientos orto-dihidroxilo en sus moléculas y por lo tanto no son sustratos para catecol-O-
10 metil transferasa (COMT). En el caso de la UB, un hidroxilo adicional se puede introducir por el citocromo P450, y este incrementa las posibilidades de glucuronización y mejora la excreción del metabolito. Teel and Martin (1988) encontraron que tanto el EA libre como algunos conjugados (éster de
15 sulfato, glucurónido y conjugados de glutatona) se detectaron en la orina, bilis y sangre de ratones. La absorción de ^3H -EA ocurrió mayormente dentro de dos horas de la administración oral. Los niveles en sangre, bilis y tejidos fueron bajos, y los compuestos absorbidos se
20 excretaron en la orina. Más de la mitad del ^3H -EA administrado permaneció en el tracto gastrointestinal después de 24 h.

El metabolismo de varios ET dietéticos y derivados de EA se ha valorado en humanos. En un estudio que involucra
25 cuarenta voluntarios saludables, divididos en cuatro grupos, se administraron diferentes productos alimenticios que contienen ET, incluyendo fresas (250 g), frambuesas rojas (225 g), nueces (35 g), y vino tinto envejecido en barricas de roble (300 mL). Las fresas y frambuesas contienen ambas el
30 ET sanguina H-6; las nueces contienen el ET pedunculagina; y

el vino envejecido en barrica de roble contiene el ET vescalagina. Después de la ingesta, cinco fracciones de orina se colectaron a 8, 16, 32, 40, y 56 h. No se detectaron ET ni EA en la orina usando análisis de LC-MS/MS. Sin embargo, el
5 metabolito microbiano 3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (urolitina B) conjugada con ácido glucurónico se detectó entre las fracciones iniciando a 32 h hasta 56 h en todos los sujetos, independiente del producto alimenticio consumido. De acuerdo con los resultados obtenidos, los derivados de
10 urolitina B se excretaron independientemente del ET consumido. Una porción monomérica común en los ET consumidos fue EA (m/z - a 301), lo cual podría indicar que esta subunidad que pertenece a las moléculas de ET fue la molécula crítica para producir derivados de urolitina B. Una
15 transformación metabólica similar al ácido elágico y urolitina se observó para los elagitaninos en humanos que consumen jugo de granada (Cerde, Espin et al. 2004; Cerde, Periago et al. 2005).

Uno de los factores principales en el metabolismo y
20 biodisponibilidad de elagitaninos es su transformación microbiana para producir una serie de derivados de urolitina (FIG. 2). Entre ellos, los mejores caracterizados y conocidos son la urolitina A y B, pero los intermediarios con tres y cuatro hidroxilos también se producen en el intestino
25 delgado, absorbidos, y excretados en la bilis después de la conjugación con metil éteres y glucurónidos (Espin et al., 2007). Los experimentos en animales muestran que estos metabolitos comienzan a ser formados en el intestino delgado, indicando que las bacterias anaeróbicas pueden ser
30 responsables de esto. El metabolismo continúa a lo largo del

tracto GI iniciando con las urolitinas D y C para finalizar con la producción de las urolitinas A y B. Las diferencias en la producción de estos metabolitos por voluntarios humanos muestran que se pueden producir por la actividad de microorganismos específicos presentes en el intestino.

En el tracto gastrointestinal y en otros tejidos (principalmente en el hígado), los metabolitos microbianos EA y elagitanino adicionalmente se metabolizan por cualquiera de las enzimas Fase I (hidroxilación) y Fase II (metilación, glucuronidación, y sulfatación) para producir metabolitos más solubles que se pueden distribuir entre los tejidos y luego excretar en la orina.

Por consiguiente, la UB se puede hidroxilar para producir UA y esta se puede hidroxilar adicionalmente para producir derivados tri-hidroxi.

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

Para resumir, los elagitaninos generalmente no se absorben en el intestino. Más bien, liberan EA en el intestino, el cual solamente se absorbe pobremente en el estómago e intestino delgado. El EA se metaboliza grandemente por bacterias no identificadas en el lumen intestinal para producir urolitinas. El metabolismo microbiano inicia en el

000051

intestino delgado y los primeros metabolitos producidos retienen cuatro hidroxilos fenólicos (urolitina D, cuatro grupos hidroxilo), y adicionalmente se metabolizan a lo largo del tracto intestinal para remover las unidades de hidroxilo que conducen a la urolitina C (tres hidroxilos), urolitina A (dos hidroxilos) y B (un hidroxilo) en las partes distales del colon (**FIG. 2**). Los metabolitos absorbidos se conjugan con ácido glucurónico (una o dos unidades), y/o metil éteres (cuando están presentes agrupamientos orto-dihidroxilo). Los conjugados de urolitina A y B son los metabolitos principales detectados en plasma y orina, aunque algunos derivados de trihidroxi (hidroxilo-UA) o EA-dimetil éter glucurónido también se han detectado en cantidades menores. Las tetrahidroxi-urolitinas, trihidroxi-urolitinas, y derivados de EA generalmente no se detectan en plasma periférico, sino se absorben en el intestino delgado y se transportan al hígado donde adicionalmente se metabolizan y excretan con bilis al intestino delgado estableciendo una circulación enterohepática que es responsable de la vida relativamente larga de urolitinas en plasma y orina.

Además de las fuentes alimenticias naturales, muchos documentos han aparecido sobre la biosíntesis, aislamiento, y actividad biológica de taninos, especialmente elagitaninos, durante los últimos veinte años (por ejemplo, Xie et al., 1995, Yoshida et al., 1982, 1984, 1985, 1986, 1989, 1990a/b, 1991a-d, 1992a/b, 1995, Nonaka et al., 1980, 1984, 1989a-c, 1990, Tanaka et al., 1986a/b, 1990, 1992a/b, 2001, Hatano et al., 1988, 1989, 1990a-c, 1991, 1995, Lin et al., 1990, Nishizawa et al., 1982, 1983, Haddock et al., 1982a/b, Kashiwada et al., 1992a/b, 1993, Kadota et al.,

1990, Okuda et al., 1982a-e, 1983a/b, El-Mekkawy et al.,
Chemistry and Biology of Elagitaninos 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 los elagitaninos
5 puros por aislamiento de fuentes naturales puede ser
engorroso y producir solo cantidades relativamente pequeñas
de productos naturales puros. Ver, por ejemplo, Okuda et al.,
(1982) *Chem Pharm Bull.* 30:4230-4233; Okuda et al. (1982)
Chem Pharm Bull. 30:234-4236. Por lo tanto, es notable que
10 los métodos para la síntesis total de muchos elagitaninos son
conocidos. Ver, por ejemplo, Khanbabaee, K., *Strategies for
the synthesis of Elagitaninos, In: Chemistry and Biology of
Elagitaninos*, Ed. S. Quideau, World Scientific Publishing,
Singapore, 2009, pp. 152-202, incluyendo referencias citadas
15 en la presente.

Las actividades antioxidantes de extractos
alimenticios ricos en elagitaninos se han determinado usando
varios ensayos *in vitro*, y las altas actividades de fresas
(Meyers et al., 2003, Aaby et al., 2005, 2007), frambuesas
20 (Liu et al., 2002, Beekwilder et al., 2005), camemoros
(Kähkönen et al., 2001) y otras bayas de *Rubus* (Wada and Ou,
2002), granada (Gil et al., 2000) y nueces (Anderson et al.,
2001) y sus elagitaninos se han reportado extensamente. Estos
alimentos también se clasifican alto cuando se comparan con
25 otros alimentos basados en plantas.

Se conoce menos acerca de los efectos del consumo
de alimentos ricos en elagitanino en el estado antioxidante
in vivo. En mujeres ancianas, la capacidad de antioxidante
total de suero incrementó por aproximadamente 10% durante el
30 período de 4 horas después del consumo de 240 g de fresas

000053

(Cao et al., 1998). Una dosis única de extracto de granada estandarizado (Mertens-Talcott et al., 2006) y el consumo a largo plazo de jugo de granada (Rosenblat et al., 2006) también mejoraron varios parámetros antioxidantes en voluntarios humanos. Sin embargo, el consumo diario de nueces por tres semanas no tuvo efecto en el estado antioxidante de sujetos con síndrome metabólico (Davis et al., 2007).

El crecimiento de células de cáncer es dependiente del equilibrio entre la proliferación y apoptosis. La proliferación celular no regulada y supresión de apoptosis son etapas claves en la iniciación y progresión del cáncer. Existe una cantidad de evidencia sustancial que los extractos de alimentos ricos en elagitanino reducen el crecimiento de células de cáncer *in vitro* inhibiendo la proliferación celular, induciendo la muerte celular apoptótica, y modulando la cinética del ciclo celular y trayectorias de transducción de señal.

Los estudios *in vitro* realizados con líneas celulares de cáncer han mostrado que las fresas (Meyers et al., 2003, Olsson et al., 2004, Ramos et al., 2005, Wang et al., 2005, Wu et al., 2007), frambuesas (Liu et al., 2002, Olsson et al., 2004, Wu et al., 2007), camemoros (Wu et al., 2007) y escaramujos (Olsson et al., 2004) inhiben la proliferación celular, inducen la apoptosis y causan la detención del ciclo celular en células de cáncer de colon, hígado, pulmón, mama o cervical. En estos estudios, la contribución de elagitaninos en las actividades de extractos de baya no fue valorada. Sin embargo, un estudio reciente (Ross et al., 2007) sugiere que la actividad anti-proliferativa de las frambuesas se asocia predominantemente

000054

con los elagitaninos.

También se ha reportado que el jugo de granada y sus elagitaninos inhiben la proliferación, inducen la apoptosis, y suprimen la señalización de células inflamatorias en líneas celulares de cáncer de color (Seeram et al., 2005, Adams et al., 2006, Larrosa et al., 2006). Igualmente, los polifenoles en la piel de uva moscatel inhiben el crecimiento de células de cáncer de colon e inducen la apoptosis (Yi et al., 2005). Las fracciones aisladas de uvas rojas moscatel y ricas en ácido elágico, glucósidos de ácido elágico, y elagitaninos inducen la apoptosis, disminuyen el número de células, y causan alteraciones en la cinética del ciclo celular en células de carcinoma de colon (Mertens-Talcott et al., 2006).

El jugo de fruta de granada es efectivo contra las células de cáncer de próstata *in vitro*, pero no contra células epiteliales de próstata normales. El tratamiento de células de cáncer de próstata humanas altamente agresivas con extracto de fruta de granada resultó en la inhibición del crecimiento celular y viabilidad e inducción de la apoptosis (Malik et al., 2005, Malik and Mukhtar, 2006).

De conformidad con la invención actual, ahora se ha descubierto que los elagitaninos y sus metabolitos, incluyendo ácido elágico y, especialmente, urolitinas, exhiben inesperadamente efectos protectores y restauradores en las mitocondrias. Sin pretender estar limitado a cualquier mecanismo particular, se considera que varios tipos de estrés resultan en lesión por estrés a las mitocondrias, reduciendo su capacidad para realizar numerosas funciones esenciales para la función celular total. Los métodos de la invención

son útiles para tratar afecciones que involucran lesión por estrés a las mitocondrias, la lesión se puede manifestar en cualquier número de maneras incluyendo, pero no limitado a, enfermedad mitocondrial.

5 Las mitocondrias son los "centro de energía" de las células. Estos organelos de doble membrana juegan un papel crítico en la generación de la vasta mayoría de la energía celular (ATP) vía fosforilación oxidativa. Las mitocondrias también son esenciales para otras funciones metabólicas
10 clave, tal como β -oxidación de ácido graso, catabolismo de aminoácidos, cetogénesis, y generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) con funciones de señalización importantes y control de homeostasis de calcio.

La matriz mitocondrial contiene la maquinaria
15 enzimática para la β -oxidación de ácidos grasos, la cual genera acetil-CoA de cadenas de acilo, y reduce equivalentes en la forma de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavina adenina dinucleótido reducido (FADH₂) en el proceso. La acetyl-CoA proporciona de combustible el ciclo
20 del ácido tricarboxílico (TCA), también conocido como el ciclo de ácido cítrico o ciclo de Krebs, el cual también produce NADH y FADH₂. Estos productos donan electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC), conduciendo a la generación de un gradiente de protones a través de la
25 membrana mitocondrial interna. La disipación de este gradiente a través de la ATP sintasa mitocondrial genera energía en la forma de ATP.

La ETC está compuesta de 4 complejos de subunidades múltiples grandes (complejos I a IV), los cuales transportan
30 electrones generados por el ciclo de TCA a un aceptor final,

000056

oxígeno molecular (O_2), formando H_2O en complejo IV. El transporte de electrones se acompaña por la liberación de grandes cantidades de energía libre, la mayoría de la cual se aprovecha para la translocación de protones (H^+) desde la matriz al espacio de intermembrana (fuerza motriz de protones); el resto se disipa como calor. La energía contenida en el gradiente electroquímico de H^+ generada por la ETC luego se acopla a la producción de ATP como retroflujo de H^+ en la matriz a través de la ATP sintasa mitocondrial. Por consiguiente, la fosforilación oxidativa resulta del transporte de electrones, la generación de un gradiente de protones, y flujo de protones subsecuente acoplado a la ATP sintasa mitocondrial.

La ROS también puede activar las proteínas no acopladas (UCPs) que disipan el gradiente de protones sin producir ATP. Se considera que las UCPs son reguladores naturales de este proceso, respondiente a y controlando la producción de ROS mitigando la formación de un gradiente de protones grande. Adicionalmente, las UCPs y no acoplamiento de respiración están implicados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos importantes, tal como termogénesis adaptativa, regulación de oxidación de ácidos grasos, participación en inflamación, prevención de formación de ROS, homeostasis de glucosa, regulación del peso corporal, y envejecimiento.

La citrato sintasa es la enzima inicial del ciclo de TCA mitocondrial. Esta enzima cataliza la reacción entre la acetil coenzima A (Acetil CoA) y ácido oxaloacético para formar ácido cítrico. La actividad de esta enzima refleja tanto la biogénesis mitocondrial como fosforilación oxidativa

mitocondrial, puesto que su actividad incrementa proporcionalmente a la densidad mitocondrial (número de mitocondrias por célula) y la actividad de respiración mitocondrial. En consecuencia, la medición de citrato sintasa
5 permite una valoración total del estado funcional mitocondrial, con mayor actividad indicando una fosforilación oxidativa incrementada y síntesis de ATP y menor actividad indicando lo contrario.

Para entender mejor el mecanismo molecular
10 fundamental que conduce al mejoramiento de la función mitocondrial, se puede realizar un perfil de genes mitocondriales claves (que codifican el ADN genómico y mitocondrial) que cubre la fosforilación oxidativa, complejos de cadena mitocondriales, ciclo de TCA, proteína no
15 acopladas, factores transcripcionales, co-factores y proteínas de depuración de ROS.

La enseñanza convencional en biología y medicina es que las mitocondrias funcionan solo como "fábricas de energía" para las células. Sin embargo, más de 95% (2900 de
20 3000) de genes que codifican proteínas mitocondriales están involucrados con otras funciones unidas a las obligaciones especializadas de las células diferenciadas en las cuales residen. Estas obligaciones evolucionan durante el desarrollo de embrión a adulto, y cuando los tejidos crecen, maduran, y
25 se adaptan al ambiente postnatal. Estas otras funciones no relacionadas con ATP inicialmente están involucradas con la mayoría de las trayectorias metabólicas principales usadas por una célula para construir, descomponer, y recircular sus bloques de construcción moleculares. Las células aún no
30 pueden producir el ARN y ADN que necesitan para crecer y

funcionar con mitocondrias. Los bloques de construcción de ARN y ADN son purinas y pirimidinas. Las mitocondrias contienen las enzimas de velocidad limitada para la biosíntesis de pirimidina (dihidroorotato deshidrogenasa) y síntesis del heme (ácido d-amino levulínico sintetasa) requeridas para producir hemoglobina. En el hígado, las mitocondrias se especializan para desintoxicar el amoníaco en el ciclo de urea. Las mitocondrias también se requieren para el metabolismo de colesterol, para la síntesis de testosterona y estrógeno, para el metabolismo de neurotransmisor, y para la producción de radicales libres y desintoxicación. Las mitocondrias hacen todo esto además para oxidar la grasa, proteína, y carbohidratos ingeridos en la dieta.

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

Las enfermedades mitocondriales resultan de las fallas de las mitocondrias, compartimientos especializados presentes en cada célula del cuerpo excepto glóbulos rojos.

Las mitocondrias son responsables de crear más de 90% de la

000059

energía necesaria por el cuerpo para sostener la vida y soportar el crecimiento. Cuando fallan, cada vez menos energía se genera dentro de la célula. La lesión celular y aún la muerte celular siguen. Si este proceso se repite en todo el cuerpo, los sistemas completos comienzan a fallar, y la vida de la persona en quién está sucediendo esto es severamente comprometida. Las enfermedades mitocondriales principalmente afectan a los niños, pero el comienzo en adultos está llegando a ser más reconocido.

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

Muchos síntomas en los trastornos mitocondriales son no específicos. Los síntomas también pueden mostrar un curso episódico, con exacerbaciones periódicas. La afección episódica de migraña, así como también mialgia, síntomas gastrointestinales, tinnitus, depresión, fatiga crónica, y diabetes, se han mencionado entre las diversas manifestaciones de trastornos mitocondriales en documentos de revisión en medicina mitocondrial (Chinnery and Turnbull (1997) *QJM* 90:657-67; Finsterer (2004) *Eur J Neurol*. 11:163-86). En pacientes con trastornos mitocondriales, la sintomatología clínica típicamente ocurre en tiempos de mayor demanda de energía asociada con estresores fisiológicos, tales como enfermedad, ayuno, exceso de ejercicio, y temperaturas ambientales extremas. Además, los estresores psicológicos también activan frecuentemente la sintomatología, presumiblemente debido a las demandas de energía cerebral mayores para las cuales el paciente es

000060

incapaz de igualar suficiente producción de ATP.

Dependiendo de cuales células se afectan, los síntomas pueden incluir pérdida de control motriz, dolor y debilidad muscular, trastornos gastrointestinales y dificultades para tragar, pobre crecimiento, enfermedad cardiaca, enfermedad hepática, diabetes, complicaciones respiratorias, convulsiones, problemas visuales/auditivos, acidosis láctica, retrasos del desarrollo y susceptibilidad a infección.

10 Las enfermedades mitocondriales incluyen, sin limitación, enfermedad de Alper; Síndrome de Barth; defectos de beta-oxidación; deficiencia de carnitina; deficiencia de carnitina-acil-carnitina; síndrome de oftalmoplegia externa progresiva; deficiencia de co-enzima Q10; deficiencia de Complejo I; deficiencia de Complejo II; deficiencia de Complejo III; deficiencia de Complejo IV; deficiencia de Complejo V; deficiencia de CPT I; deficiencia de CPT II; síndrome de deficiencia de creatina; deficiencia de citocromo c oxidasa; aciduria glutárica tipo II; síndrome de Kearns-Sayre; acidosis láctica; LCHAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga); neuropatía óptica hereditaria de Leber; enfermedad de Leigh; cardiomiopatía infantil letal; enfermedad de Luft; MAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media); citopatía mitocondrial; 25 depleción de ADN mitocondrial; encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y síntomas tipo apoplejía; encefalopatía mitocondrial; miopatía mitocondrial; síndrome de ataxia recesiva mitocondrial; distrofias musculares; epilepsia mioclónica y enfermedad de fibras rojas rasgadas; 30 encefalopatía gastrointestinal mioneurogénica; neuropatía,

000361

ataxia, retinitis pigmentosa, y ptosis; síndrome de Pearson; mutaciones de POLG; deficiencia de piruvato carboxilasa; deficiencia de piruvato deshidrogenasa; SCHAD (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta); y deficiencia de
5 acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de extracto de granada: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que
10 consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el
15 funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

Como se usa en la presente, un "producto alimenticio" se refiere a un producto preparado a partir de un alimento natural. Los ejemplos no limitantes de productos alimenticios incluyen jugos, vinos, concentrados, mermeladas, jaleas, conservas, pastas, y extractos. Como se usa en la
20 presente, un "suplemento nutricional" se refiere a un producto adecuado para consumo u otra administración principalmente para sus propiedades promotoras de salud antes que su contenido calórico.

25 Como se usa en la presente, el término "síndrome metabólico" se refiere a una combinación de trastornos médicos que, cuando se presentan conjuntamente, incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes. Afecta una de cinco personas en los Estados Unidos y la
30 prevalencia incrementa con la edad. Algunos estudios han

000082

mostrado que la prevalencia en los Estados Unidos es una estimación de 25% de la población. De conformidad con la definición mundial de consenso de la Fundación Internacional de la Diabetes (2006), el síndrome metabólico es obesidad

5 central más cualquiera de los dos de los siguientes:

- Triglicéridos Elevados: > 150 mg/dL (1.7 mmol/L), o tratamiento específico para esta anormalidad de lípidos;
- Colesterol HDL Reducido: < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) en hombres, < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres, o
10 tratamiento específico para esta anormalidad de lípidos;
- Presión arterial elevada: BP sistólica > 130 o BP diastólica >85 mm Hg, o tratamiento de hipertensión previamente diagnosticada; y
- Glucosa en plasma en ayuno elevada: (FPG)>100 mg/dL
15 (5.6 mmol/L), o diabetes tipos 2 previamente diagnosticada.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de un elagitanino: para el tratamiento o
20 prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno
25 de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

En ciertas modalidades de conformidad con este y otros aspectos de la invención, el elagitanino se selecciona del grupo que consiste de 2-O-galoil-punicalina, casaurictina, castalagina y vecalagina, castalina,
30

000063

casuarictinaa, casuariina, casuarinina, ácido quebulágico, ácido quebulínico, corilagina, cornusiina E, epipunicacorteína A, flosina B, gemina D, granatina A, granatina B, grandinina, lagerstroemina, lambertianina C, pedunculagina, puniacacorteína A, puniacacorteína B, puniacacorteína C, puniacacorteína C, puniacacorteína D, punicafolina, punicalagina, punicalina, punigluconina, roburina A, roburina B, roburina C, roburina D, roburina E, rubusuaviina C, sanguina H-4, sanguina H-5, sanguina H-6, sanguina H-10, estaquiurina, estrictinina, telimagrandina I, telimigrandina II, terquebulina, terflavina A, terflavina B, Tergalagina, y terminalina/galagildilactona. Desde luego, los elagitaninos adicionales también se contemplan por la invención.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de punicalagina: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o mental.

Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de ácido elágico: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular,

000064

hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

5 Un aspecto de la invención es un producto alimenticio o suplemento nutricional que comprende una cantidad efectiva de una urolitina: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome
10 metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

15 En ciertas modalidades de conformidad con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina A. En ciertas modalidades de conformidad con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina B. En ciertas modalidades de conformidad con este y otros aspectos
20 de la invención, la urolitina es urolitina C. En ciertas modalidades de conformidad con este y otros aspectos de la invención, la urolitina es urolitina D.

 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es obesidad.

25 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es velocidad metabólica reducida.

 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es síndrome metabólico.

30 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es diabetes mellitus.

000065

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es enfermedad cardiovascular.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es hiperlipidemia.

5 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es enfermedad neurodegenerativa.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es trastorno cognitivo.

10 En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es trastorno del estado de ánimo.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es estrés.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad la afección es trastorno de ansiedad.

15 En cada uno de los anteriores, en una modalidad el producto alimenticio o suplemento nutricional es para el manejo de peso.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad el producto alimenticio o suplemento nutricional es para
20 incrementar el funcionamiento muscular.

En cada uno de los anteriores, en una modalidad el producto alimenticio o suplemento nutricional es para incrementar el funcionamiento mental.

Un aspecto de la invención es un método para
25 incrementar o mantener la función mitocondrial. El método incluye la etapa de poner en contacto las células con una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar la función de las mitocondrias.

Un aspecto de la invención es un método para
30 tratar, prevenir, o controlar una afección o enfermedad

000066

relacionada con mitocondrias asociada con una función mitocondrial alterada o una densidad mitocondrial reducida. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad o afección asociada con la función mitocondrial alterada o densidad mitocondrial reducida.

Un aspecto de la invención es un método para incrementar la velocidad metabólica. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar la velocidad metabólica. Como se describe en otra parte en la presente, los precursores de una urolitina pueden incluir, sin limitación, un elagitanino, punicalagina, y ácido elágico.

Un aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

Un aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar la obesidad. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar la obesidad.

Un aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar la enfermedad

000067

cardiovascular.

Un aspecto de la invención es un método para tratar la hiperlipidemia. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la hiperlipidemia. En una modalidad, la hiperlipidemia es hipertrigliceridemia. En una modalidad, la hiperlipidemia es ácidos grasos libres elevados.

Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno metabólico. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno metabólico. En una modalidad, el trastorno metabólico es diabetes mellitus. En una modalidad, el trastorno metabólico es obesidad.

Envejecimiento

Por mucho, el factor de riesgo más grande para enfermedades neurodegenerativas, tal como enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), y esclerosis lateral amiotrófica (ALS), es envejecimiento.

Se ha pensado que las mitocondrias contribuyen al envejecimiento mediante la acumulación de mutaciones de ADN mitocondrial (mtADN) y producción neta de especies de oxígeno reactivas (ROS). Aunque la mayoría de las proteínas mitocondriales se codifican por el genoma nuclear, las mitocondrias contienen muchas copias de su propio ADN. El mtADN humano es una molécula circular de 16,569 pares de base que codifica 13 componentes de polipéptido de la cadena respiratoria, así como también los rARN y tARN necesarios

000068

para soportar la síntesis de proteína intramitocondrial usando su propio código genético. Las mutaciones heredadas en mtADN se sabe que causan una variedad de enfermedades, la mayoría de las cuales afectan el cerebro y músculos - tejidos con altos requerimientos de energía. Se ha hipotetizado que las mutaciones somáticas de mtADN adquiridas durante el envejecimiento contribuyen a la declinación fisiológica que ocurre con envejecimiento y neurodegeneración relacionada con el envejecimiento. Está bien establecido que el mtADN acumula mutaciones con el envejecimiento, especialmente supresiones a gran escala y mutaciones puntuales. En la región de control de mtADN, las mutaciones puntuales en sitios específicos pueden acumularse a altos niveles en ciertos tejidos: T414G en fibroblastos cultivados, 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 parecen ocurrir a bajos niveles en el cerebro, aunque el nivel completo puede ser alto. Usando una estrategia de secuenciación-clonación-reacción en cadena de polimerasa (PCR), se encontró que el nivel promedio de mutaciones puntuales en dos regiones codificantes de proteína de mtADN de cerebro de sujetos ancianos fue ~2 mutaciones por 10 kb. Las regiones no codificantes, las cuales pueden estar bajo menor presión de selección, potencialmente se acumulan entre dos y cuatro veces cuando mucho. La acumulación de estas supresiones y mutaciones puntuales con envejecimiento se correlaciona con la declinación de la función mitocondrial. Por ejemplo, se ha encontrado una correlación negativa entre la actividad de citocromo oxidasa de cerebro y niveles de

000000

mutación puntual incrementada en un gen citocromo oxidasa (CO1).

La producción neta de ROS es otro mecanismo importante por el cual se piensa que las mitocondrias contribuyen al envejecimiento. Las mitocondrias contienen múltiples portadores de electrones capaces de producir ROS, así como también una red extensa de defensas antioxidantes. Las lesiones mitocondriales, incluyendo daño oxidativo por sí solo, pueden causar un desequilibrio entre la producción de ROS y remoción, resultando en producción neta de ROS. La importancia del envejecimiento de la producción neta de ROS mitocondrial se soporta por las observaciones que mejoran las defensas antioxidantes mitocondriales que pueden incrementar la longevidad. En *Drosophila*, la sobre-expresión de las enzimas antioxidantes mitocondriales manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y metionina sulfóxido reductasa prolonga la duración de vida. Esta estrategia es más exitosa en cepas de corta vida de *Drosophila*, y no tiene efecto en cepas de larga vida. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que la sobre-expresión de catalasa experimentalmente dirigida a mitocondrias incrementa la duración de vida en una cepa de ratón de larga vida.

La declinación cognitiva durante el envejecimiento se ha observado que ocurre en animales envejecidos y se piensa que ocurre como un resultado de los cambios en la fisiología sináptica de neuronas envejecidas. Se piensa que estos cambios conducen a una pérdida global total de la función integradora de la señalización neuronal en el cerebro (Bishop, Lu et al. 2010) y susceptibilidad incrementada para los efectos de largo plazo de estrés oxidativo e inflamación

(Joseph, Shukitt-Hale et al. 2005). Se piensa que la pérdida de células la cual toma lugar durante el envejecimiento normal ocurre principalmente debido al estrés oxidativo como un resultado de los radicales libres producidos por una trayectoria oxidativa ineficiente y parcialmente no acoplada. En efecto, se ha mostrado que un rasgo común en el envejecimiento entre diferentes especies, (*C. elegans*, *D. melanogaster*, ratones, ratas, chimpancés, y humanos) ha sido evidencia de la función mitocondrial reducida. Esta interpretación adicionalmente se valida por la observación que el deterioro significativo de la función mitocondrial acorta la duración de vida tanto en *C. elegans* (Rea, Ventura et al. 2007) como ratones (Trifunovic, Wredenberg et al. 2004; Kujoth, Hiona et al. 2005). El mejoramiento de la función mitocondrial, mediante la sobre-expresión de catalasa en ratones, resulta en duraciones de vida extendidas (Schriner, Linford et al. 2005).

Con el envejecimiento y la declinación de la función mitocondrial, las neuronas en el cerebro llegan a ser más vulnerables a las patologías dependientes de la edad, así como también la muerte celular. Esto resulta en una pérdida de las conexiones entre las neuronas, así como también la función neuronal deteriorada (pérdida de neurotransmisores, ausencia de descarga). También hay evidencia incrementada que las neuronas responden al daño de ADN no reparado por el silenciamiento de expresión genética mediante mecanismos epigenéticos, conduciendo así a la supresión adicional de funciones celulares. Adicionalmente, las células neuronales envejecidas muestran en todas las especies una expresión incrementada de genes involucrados en las trayectorias de

000071

respuesta de estrés.

Muchas características de estos cambios se observan en cultivo *in vitro* de células neuronales envejecidas, las cuales muestran formación de proceso y excrecencia de neuritas disminuida. Una disminución que podría ser invertida por factores de crecimiento neuronal (Rozovsky, Wei et al. 2005).

Trastornos Neurodegenerativos

10 Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de trastornos heterogéneos caracterizados por pérdida selectiva gradualmente progresiva de sistemas neuronales anatómicamente o fisiológicamente relacionados. Los ejemplos prototípicos incluyen enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de 15 Parkinson (PD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y enfermedad de Huntington (HD).

Las etapas tempranas de neurodegeneración comparten muchas de las mismas características como la declinación vista en el envejecimiento. Es interesante señalar que las 20 enfermedades tal como enfermedad de Alzheimer muestran una incidencia incrementada con la edad, con más de 50% de adultos mayores de 85 que presentan la enfermedad (Hebert, Scherr et al. 2003). Como se discutió anteriormente, la función mitocondrial declinante parecer ser una 25 característica del envejecimiento. Esta declinación de la función neuronal probablemente tendrá un impacto significativo en las poblaciones neuronales con demandas bioenergéticas grandes, un conjunto de neuronas son las neuronas piramidales grandes las cuales se degeneran en 30 enfermedad de Alzheimer (Bishop, Lu et al. 2010). La

declinación de estas clases de neuronas en respuesta a la función mitocondrial deteriorada puede ser responsable del comienzo de enfermedad neurodegenerativa. Los efectos de los trastornos neurodegenerativos en la supervivencia neuronal se pueden modelar *in vitro*. Cuando las células neuronales N2 se incuban con el péptido A-beta ($A\beta$), el cual se piensa que es el agente causante de la enfermedad de Alzheimer, hay un impacto significativo en la excrecencia de neuritas, la cual se puede invertir por anti-oxidantes. Manczak et al. (2010) *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 2:S609-31.

La forma más común de muerte celular en la neurodegeneración es vía la trayectoria apoptótica mitocondrial intrínseca. Esta trayectoria controla la activación de la caspasa-9 regulando la liberación del citocromo c del espacio de intermembrana mitocondrial. La concentración de ROS, subproductos normales de la actividad de cadena respiratoria mitocondrial, es mediada en parte por antioxidantes mitocondriales, tal como manganeso superóxido dismutasa (SOD2) y glutatióna peroxidasa. La sobreproducción de ROS (estrés oxidativo) es un aspecto central de todos los trastornos neurodegenerativos. Además de la generación de ROS, las mitocondrias también están involucradas con las funciones sustentadoras de vida, incluyendo homeostasis de calcio, fisión y fusión mitocondrial, la concentración de lípidos de las membranas mitocondriales, y la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT). La enfermedad mitocondrial que conduce a la neurodegeneración es probablemente, al menos en algún nivel, para involucrar todas estas funciones (DiMauro and Schon, 2008).

Hay evidencia que la disfunción mitocondrial y

estrés oxidativo juegan un papel causal en la patogénesis de la enfermedad neurodegenerativa, incluyendo en cuatro de las enfermedades más bien conocidas: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y
5 esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como enfermedad de Lou Gehrig).

La enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza clínicamente por la declinación cognitiva progresiva, y patológicamente por la presencia de placas seniles compuestas
10 principalmente de péptido amiloide- β ($A\beta$) y enredos neurofibrilares integrados principalmente de tau hiperfosforilado. Aproximadamente 5-10% de los casos son familiares, ocurriendo en una manera dominante autosómica de comienzo temprano. Estas proteínas se sabe que están
15 asociadas con tales casos familiares: proteína precursora amiloide (APP) - la cual es escindida secuencialmente por β - y γ -secretasas para producir $A\beta$ -- y presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), una o la otra de las cuales es un componente de cada complejo de γ -secretasa. La extensa literatura soporta un
20 papel para la disfunción mitocondrial y daño oxidativo en la patogénesis de AD. El daño oxidativo ocurre temprano en el cerebro con AD, antes del comienzo de la patología de placa significativa. El daño oxidativo también precede la deposición de $A\beta$ en ratones APP transgénicos, con sobre-
25 regulación de genes relacionada con el metabolismo mitocondrial y apoptosis que ocurren incluso antes y co-localización con las neuronas que sufren daño oxidativo.

Varias trayectorias que conectan el estrés oxidativo y patología de AD recientemente se han descubierto.
30 El estrés oxidativo puede activar las trayectorias de

000074

señalización que alteran el procesamiento de APP o tau. Por ejemplo, el estrés oxidativo incrementa la expresión de β -secretasa mediante la activación de la cinasa c-Jun amino-terminal y proteína cinasa activada por mitógeno p38 (MAPK), e incrementa la fosforilación de tau aberrante por la activación de glicógeno sintasa cinasa 3. La inactivación inducida por oxidante de moléculas críticas también puede ser importante. En un estudio proteómico, se encontró que la prolil isomerasa PIN1 es particularmente sensible al daño oxidativo. La PIN1 cataliza los cambios conformacionales de proteína que afectan el procesamiento tanto de APP como tau. El knock out de *Pin1* incrementa el procesamiento de APP amiloidogénica y niveles de A β intracelular en ratones. Los ratones con knock out de *Pin1* también exhiben hiperfosforilación de tau, déficits motriz o de comportamiento, y degeneración neuronal. El daño inducido por estrés oxidativo de PIN1 y proteínas similarmente sensibles por consiguiente podría ser importante en la promoción de procesos neurodegenerativos.

Las mitocondrias también juegan un papel importante en la enfermedad de Parkinson (PD) la cual se caracteriza clínicamente por rigidez progresiva, bradiquinesia y temblor, y patológicamente por pérdida de neuronas pigmentadas en la sustancia negra y la presencia de cuerpos de Lewy inclusiones citoplásmicas distintivas que inmunotiñen la α -sinucleína y ubiquitina.

Las mitocondrias primero fueron implicadas en PD debido a MPTP (1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), cuyo metabolito MPP⁺ inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, que causa

parkinsonismo en abusadores de drogas de diseño. Este modelo se ha refinado en animales de laboratorio, en los cuales la infusión crónica de rotenona - otro inhibidor de complejo I - o MPTP resulta clínicamente en un fenotipo parkinsoniano y patológicamente en degeneración nigral con inclusiones citoplásmicas inmunorreactivas para α -sinucleína y ubiquitina. El mecanismo de toxicidad en estos modelos de inhibición de complejo I probablemente involucra el estrés oxidativo. La inhibición del complejo I y estrés oxidativo se muestra que son relevantes a la PD que se presenta naturalmente cuando la deficiencia de complejo I y depleción de glutatión se encuentran en la sustancia negra de pacientes con PD idiopática y en pacientes con PD pre-sintomática.

Muchos de los genes asociados con PD también implican mitocondrias en la patogénesis de la enfermedad. Hasta ahora, las mutaciones o polimorfismos en mtADN y al menos nueve genes nucleares nombrados se han identificado como causantes de PD o que afectan el riesgo de PD: α -sinucleína, parkina, ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1, DJ-1, cinasa 1 inducida por homólogo de tensina y fosfatasa (PTEN) (*PINK1*), cinasa 2 de repetición rica en leucina (*LRRK2*), el receptor nuclear *NURR1*, *HTRA2*, y tau. De los genes nucleares, la α -sinucleína, parkina, DJ-1, *PINK1*, *LRRK2*, y *HTRA2* directamente o indirectamente involucran mitocondrias. En un número menor de casos, las mutaciones de mtADN heredadas resultan en parkinsonismo, típicamente como una característica de un síndrome mayor. En una familia, la mutación G11778A de atrofia óptica de Leber se asoció con parkinsonismo sensible a l-DOPA, que co-ocurre variablemente con demencia, distonia, oftalmoplegia y ataxia. Notablemente,

000076

esta mutación es una subunidad de complejo I. Las mutaciones en el gen de mtADN polimerasa- γ codificada nuclear (*POLG*) deterioran la replicación de mtDNA y resultan en múltiples supresiones de mtADN, típicamente causando miopatía y oftalmoplegia externa progresiva crónica. En tales familias, las mutaciones *POLG* también se co-segregan con parkinsonismo.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza clínicamente por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad del tejido muscular, reflejando la degeneración de neuronas motrices superiores e inferiores en la corteza, tallo cerebral y médula espinal. Aproximadamente 90% de los casos son esporádicos (SALS) y 10% son familiares (FALS). Aproximadamente 20% de los casos familiares son causados por mutaciones en Cu/Zn-superóxido dismutasa (*SOD1*). Tanto en SALS como FALS, las muestras de biopsia y post mórtem de la médula espinal, nervios y músculos muestran anomalías en la estructura, número y localización mitocondrial. Los defectos en las actividades de los complejos de cadena respiratoria también se han detectado en músculos y médula espinal.

La enfermedad de Huntington (HD) se caracteriza clínicamente por corea, alteraciones psiquiátricas, y demencia, y patológicamente por pérdida de neuronas de larga proyección en la corteza y estriato. La HD es heredada en una manera dominante autosómica, y es debido a la expansión de una repetición de trinucleótido de CAG en el gen huntingtina (*HTT*), que da lugar a un estiramiento de poliglutamina expandida en la proteína correspondiente. El número normal de repeticiones de CAG (Q) es menor de 36; los números de repeticiones mayores de 40 se asocian con la enfermedad

000077

humana. Varias líneas de evidencia demuestran el involucramiento de la disfunción mitocondrial en HD. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear revela lactato incrementado en la corteza y ganglios basales. Los estudios bioquímicos muestran actividades disminuidas de complejos II y III de la cadena de transporte de electrones en el cerebro humano con HD. En células estriatales de embriones de ratón knock in con *Htt* mutante, la respiración mitocondrial y producción de ATP son significativamente deterioradas.

10 Un aspecto de la invención es un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa, muerte neuronal relacionada con la edad o disfunción. Como se usa en la presente, "enfermedad neurodegenerativa" o, equivalentemente, "trastorno neurodegenerativo", se refiere a cualquier

15 afección que involucra la pérdida progresiva de neuronas funcionales en el sistema nervioso central. En una modalidad, la enfermedad neurodegenerativa se asocia con muerte celular relacionada con la edad. Las enfermedades neurodegenerativas ejemplares incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer,

20 enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como ALS y como enfermedad de Lou Gehrig), así como también complejo de demencia por SIDA, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia,

25 enfermedad de Batten, encefalopatía espongiforme bovina (BSE), enfermedad de Canavan, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia con cuerpos de Lewy, insomnio familiar fatal, degeneración frontotemporal lobular, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe,

30 enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis

000078

múltiple, atrofia de sistemas múltiples, neuroacantocitosis, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, esclerosis
5 mielinoclástica 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 modalidad, el método se usa para tratar
10 disfunción o muerte neuronal relacionada con la edad. Tal método se dirige a la neurodegeneración que no es atribuible a una enfermedad neurodegenerativa específica, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, y enfermedad de Parkinson.

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

En una modalidad, una enfermedad neurodegenerativa
20 es enfermedad de Alzheimer.

El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, por lo cual se
25 trata la enfermedad neurodegenerativa.

De conformidad con este y otros métodos de la invención, una "urolitina", como se usa en la presente, se refiere a una o combinación de urolitina A, urolitina B, urolitina C, y urolitina D (ver, por ejemplo, **FIG. 1** y **FIG.**
30 **2**). En una modalidad, 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 modalidad, una urolitina es urolitina A, urolitina B, o una combinación de urolitina A y urolitina B. En una modalidad, una urolitina es urolitina A. En una modalidad, una urolitina se proporciona como una urolitina aislada, por ejemplo, aislada de una fuente natural o preparada por síntesis total. Las urolitinas aisladas se pueden sintetizar *de novo*. Ver, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2008/0031862 de Ghosal, los contenidos completos de la cual se incorporan en la presente para referencia.

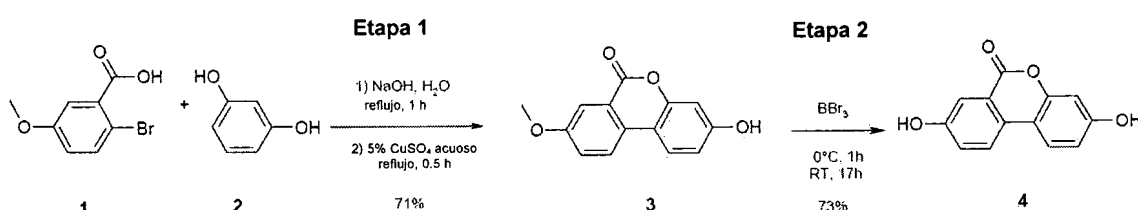
En una modalidad, la urolitina A (3,8-dihidroxidibenzo- α -pirona) se sintetizó en una síntesis de dos etapas como sigue. La Etapa 1 es una reacción catalizada con cobre que ocurre en la presencia de una base (reacción de Hurtley) donde los materiales de partida ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico y resorcinol se hacen reaccionar conjuntamente para generar el andamiaje dihidrodibenzopirona. En la Etapa 2 la desmetilación de la benzopirona con BBr_3 produce 3,8-dihidroxibenzo- α -pirona (urolitina A).

Una mezcla de ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico **1** (27.6 g), resorcinol **2** (26.3 g) e hidróxido de sodio (10.5 g) en agua (120 mL) se calentó bajo reflujo por 1 hora. 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) luego se agregó y la mezcla se sometió a reflujo por 30 minutos adicionales. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y el sólido se filtró en un filtro Büchner. El residuo se lavó con agua fría (50 mL) para

000080

producir un sólido rojo pálido (38.0 g) el cual se trituro en MeOH caliente (200 mL). La suspensión se dejó durante la noche a 4°C. El precipitado rojo claro resultante se filtró y se lavó con MeOH frío (75 mL) para producir el compuesto del título **3** como un sólido café pálido. La ^1H NMR es de conformidad con la estructura de **3**.

A una suspensión de **3** (10.0 g; 41 mmol; 1.0 eq.) en diclorometano seco (100 mL) se agregó 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 por 1 hora y luego se dejó calentar a temperatura ambiente. La solución se agitó a esta temperatura por 17 horas. El precipitado amarillo se filtró y se lavó con agua fría (50 mL) para producir un sólido amarillo el cual se calentó a reflujo en ácido acético (400 mL) por 3 horas. La solución caliente se filtró rápidamente y el precipitado se lavó con ácido acético (50 mL) luego con éter dietílico (100 mL) para producir el compuesto del título **4** como un sólido amarillo. La estructura y pureza se determinaron por ^1H y ^{13}C -NMR.



En una modalidad, una "urolitina" como se usa en la presente es o puede incluir una urolitina glucuronada, metilada, o sulfatada.

De conformidad con este y otros métodos de la invención, un "precursor de urolitina", como se usa en la

000081

presente, se refiere a un elagitanino o un metabolito elagitanino, incluyendo pero no limitado a ácido elágico (EA). En una modalidad, un precursor de urolitina es punicalagina (PA). En una modalidad, un precursor de urolitina es punicalina (PB). Ver, por ejemplo, **FIG. 1**. En una modalidad, un precursor de urolitina es ácido elágico (EA). En una modalidad, un precursor de urolitina se proporciona como un precursor de urolitina aislada, por ejemplo, aislada de una fuente alimenticia natural o preparada por síntesis total. Los precursores de urolitina aislada usualmente se purifican de fuentes naturales o sintetizan *de novo*; algunos precursores de urolitina, incluyendo EA, son comercialmente disponibles de proveedores, tal como Sigma Aldrich.

Además de conformidad con este y otros métodos de la invención, los precursores de urolitinas también incluyen alimentos naturales que contienen elagitaninos y ácido elágico, especialmente alimentos naturales que son ricos en elagitaninos, ácido elágico, o tanto elagitaninos como ácido elágico. Tales alimentos incluyen ciertas bayas, uvas, granadas, escaramujos, y nueces. En una modalidad, el alimento natural es granada.

Adicionalmente, los precursores de urolitina incluyen alimentos procesados y bebidas preparada de tales alimentos naturales. El alimento procesado puede tomar cualquier forma, incluyendo, por ejemplo, mermeladas, jaleas, conservas, pastas, alimentos untables, jugos, vinos, extractos, concentrados, y similares. En una modalidad, el alimento procesado es jugo de granada.

En una modalidad, un precursor de urolitina se

proporciona como un extracto, por ejemplo, un extracto de fruta.

En una modalidad, un precursor de urolitina se proporciona como concentrado, por ejemplo, un concentrado de
5 fruta o concentrado de jugo de fruta.

El método de la invención se puede usar solo o en combinación con cualquier método o compuesto conocido por ser útil para tratar enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, en una modalidad, el método de la invención se puede combinar
10 con el uso de cualquiera o más de inhibidores de acetilcolinesterasa, tales como donezepil (Aricept®), galantamina (Razadyne®), y rivastigmina (Exelon®), y antagonistas del receptor N-metil D-aspartato (NMDA), tal como memantina (Namenda®).

15 Un aspecto de la invención es un método para mejorar la función cognitiva. Como se usa en la presente, "función cognitiva" se refiere a cualquier proceso mental que involucra operaciones simbólicas, por ejemplo, percepción, memoria, atención, comprensión del habla, generación del
20 habla, comprensión de lectura, creación de imágenes, aprendizaje, y razonamiento. En una modalidad, "función cognitiva" se refiere a cualquiera o más de percepción, memoria, atención, y razonamiento. En una modalidad, "función cognitiva" se refiere a memoria.

25 El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de cognición mejorada una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, mejorando la función cognitiva.

Los métodos para medir la función cognitiva son
30 bien conocidos y pueden incluir, por ejemplo, pruebas

000083

individuales o agrupadas para cualquier aspecto de la función cognitiva. Margallo-Lana et al. (2003) *J Intellect Disability Res.* 47:488-492. Otra prueba es el Examen de Estado Mental Mini (MMSE), que se diseñó para valorar la orientación en tiempo y lugar, registro, atención y cálculo, recordatorio, uso de lenguaje y comprensión, repetición, y comandos complejos. Folstein et al. (1975) *J Psych Res.* 12:189-198. Otras pruebas útiles para medir la función cognitiva incluyen la Escala Cognitiva de Valoración de Enfermedad de Alzheimer (ADAS-Cog) (Rosen et al. (1984) *Am J Psychiatry.* 141(11):1356-64) y la Serie Automatizada de Prueba Neuropsicológica de Cambridge (CANTAB) (Robbins et al. (1994) *Demencia.* 5(5):266-81). Tales pruebas se pueden usar para valorar la función cognitiva en una manera objetiva, de modo que los cambios de la función cognitiva, por ejemplo en respuesta al tratamiento de conformidad con los métodos de la invención, se pueden medir y comparar.

El método de la invención se puede usar solo o en combinación con cualquier método o compuesto conocido para mejorar la función cognitiva. Por ejemplo, en una modalidad, el método de la invención se combina con el uso de cafeína o nicotina o ambas.

En una modalidad, el sujeto no tiene un trastorno cognitivo. Por ejemplo, el método se puede usar para mejorar la función cognitiva en un sujeto que tiene función cognitiva normal.

Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno cognitivo. Como se usa en la presente, un trastorno cognitivo se refiere a cualquier afección que deteriora la función cognitiva. En una modalidad, "trastorno

cognitivo" se refiere a cualquiera o más de delirio, demencia, trastorno del aprendizaje, trastorno de déficit de atención (ADD), y trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD). En una modalidad, el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje. En una modalidad, el trastorno cognitivo es trastorno de déficit de atención (ADD). En una modalidad, el trastorno cognitivo es trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD).

El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento de un trastorno cognitivo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno cognitivo.

El método de la invención se puede usar solo o en combinación con cualquier método o compuesto conocido por ser útil para tratar un trastorno cognitivo. Por ejemplo, en una modalidad, el método de la invención se combina con el uso de un estimulante, tal como metilfenidato (por ejemplo, Ritalin®), dextroanfetamina (Dexedrine®), sales de anfetamina mezcladas (Adderall®), dextrometanfetamina (Desoxyn®), y lisdexanfetamina (Vyvanase®).

Un aspecto de la invención es un método para tratar o prevenir una disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés. Como se usa en la presente, una "disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés" se refiere a una alteración en la función cognitiva que se induce o relaciona con el estrés. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento o prevención de una disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para

000085

tratar o prevenir la disfunción cognitiva inducida por estrés o relacionada con estrés.

Trastornos del estado de ánimo

5 El tejido cerebral requiere un alto nivel de energía para su metabolismo, incluyendo el mantenimiento del potencial de transmembrana, transducción de señal y remodelación sináptica. Un incremento de síntomas y trastornos psiquiátricos, en particular depresión, 10 probablemente está presente en pacientes con trastornos mitocondriales.

La función y estructura mitocondrial, medidas por una variedad de diferentes técnicas, se ha mostrado que son anormales en pacientes con trastornos del estado de ánimo, 15 incluyendo depresión mayor así como también en los otros trastornos del espectro afectivo.

Dos estudios revelaron que una probabilidad incrementada varias veces de desarrollar depresión se puede heredar maternalmente junto con el mtADN, lo cual fuertemente 20 argumenta que las variantes de secuencia de mtADN pueden inducir la disfunción mitocondrial que puede predisponer a individuos hacia el desarrollo de depresión (Boles et al., 2005; Burnett et al., 2005).

La relación entre la disfunción mitocondrial y 25 depresión unipolar se ha explorado en varios estudios. En los estudios de cerebro post mórtem de sujetos con depresión mayor probable o diagnosticada, de los cuales la mayoría de los sujetos fueron (probablemente) medicados, ningún incremento de la supresión de mtADN de 5 kb común se podría 30 detectar (Kato et al., 1997; Sabunciyan et al., 2007; Shao et

000086

al., 2008, Stine et al., 1993). Las alteraciones de productos traduccionales vinculadas a la función mitocondrial se encontraron en las cortezas visuales prefrontales y terciarias (Karry et al., 2004; Whatley et al., 1996). Las alteraciones de cuatro proteínas localizadas mitocondriales en la corteza cingulada anterior se han reportado (Beasley et al., 2006). La expresión genética disminuida para 6 de 13 transcriptos codificados por mtADN en el tejido de corteza frontal (áreas de Brodmann (BA) 9 y 46) (Shao et al., 2008), y de mRNA mitocondrial codificado por nADN y proteínas en el cerebelo, también se ha reportado en depresión mayor (Ben-Shachar and Karry, 2008). Los niveles de una subunidad de complejo I de cadena de transporte de electrones (NDUFS7), y actividad de complejo I, en corteza prefrontal post mórtem se encontró que están por debajo o en el rango más bajo de los controles normales en la mitad de los casos de trastorno depresivo mayor en un estudio reciente (Andreazza et al., 2010). En los dos últimos estudios, los autores fueron incapaces de detectar cualquier efecto del medicamento en los resultados.

Las disminuciones de relaciones de enzima de cadena respiratoria y velocidades de producción de ATP, y una prevalencia incrementada de pequeñas supresiones de mtADN (pero no de la supresión común de mtADN de 5 kb), se encontraron en el músculo de pacientes con un diagnóstico de tiempo de vida de depresión unipolar mayor con síntomas físicos concomitantes. El medicamento no parece influir en los resultados (Gardner et al., 2003b). La relevancia clínica fue sugerida por el hallazgo que esencialmente cada sujeto deprimido con grados muy altos de síntomas somáticos demostró

velocidades de producción de ATP bajas en biopsia muscular (Gardner and Boles, 2008a).

Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno del estado de ánimo (también conocido como un trastorno afectivo). Como se usa en la presente, un "trastorno del estado de ánimo" se refiere a una alteración del estado emocional, tal como se describe en el *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, publicado por la American Psychiatric Association. Los trastornos del estado de ánimo incluyen pero no se limitan a depresión mayor, depresión post-parto, distimia, y trastorno bipolar. En una modalidad, el trastorno del estado de ánimo es depresión mayor.

El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento de un trastorno del estado de ánimo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del estado de ánimo.

El método de la invención se puede usar solo o en combinación con cualquier método o compuesto conocido por ser útil para tratar un trastorno del estado de ánimo. Por ejemplo, en una modalidad, el método de la invención se combina con el uso de un agente antidepresivo. Los agentes antidepresivos son bien conocidos en el arte e incluyen inhibidores de reabsorción de serotonina selectiva (SSRIs), inhibidores de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRIs), antidepresivos serotoninérgicos específicos y noradrenérgicos, inhibidores de reabsorción de norepinefrina, inhibidores de reabsorción de norepinefrina-dopamina, inhibidores de reabsorción de serotonina selectiva,

000088

desinhibidores de norepinefrina-dopamina, antidepresivos tricíclicos, e inhibidores de monamina oxidasa.

Un aspecto de la invención es un método para tratar o prevenir un trastorno del estado de ánimo inducido por
5 estrés o relacionado con estrés. Como se usa en la presente, un "trastorno del estado de ánimo inducido por estrés o relacionado con estrés" se refiere a una alteración del estado emocional que se induce o relaciona con el estrés. Tales trastornos del estado de ánimo son algunas veces
10 referidos como trastornos reactivos del estado de ánimo y serán distinguidos de otros trastornos del estado de ánimo, por ejemplo, trastornos orgánicos del estado de ánimo así llamados. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento o prevención de un
15 trastorno del estado de ánimo inducido por estrés o relacionado con estrés una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar o prevenir el trastorno del estado de ánimo inducido por estrés o relacionado con estrés.

20 Un aspecto de la invención es un método para tratar un trastorno de ansiedad. Como se usa en la presente, un "trastorno de ansiedad" se refiere a un estado disfuncional de miedo y ansiedad, por ejemplo, miedo y ansiedad que están fuera de proporción a una situación estresante o la
25 anticipación de una situación estresante. En una modalidad, un trastorno de ansiedad es cualquiera o una combinación de trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo, y trastorno
30 de estrés post-traumático. En una modalidad, un trastorno de

000089

ansiedad es cualquiera o una combinación de trastorno de ansiedad generalizado, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico, trastorno de estrés post-traumático, y trastorno de ansiedad social. En una modalidad, un trastorno de ansiedad es trastorno de estrés generalizado. En una modalidad, un trastorno de ansiedad es trastorno de estrés post-traumático. En una modalidad, un trastorno de ansiedad es un trastorno de ansiedad inducido por estrés.

El método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento de un trastorno de ansiedad una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno de ansiedad.

El método de la invención se puede usar solo o en combinación con cualquier método o compuesto conocido por ser útil para tratar un trastorno de ansiedad. Por ejemplo, en una modalidad, el método de la invención se combina con el uso de cualquiera o una combinación de psicoterapia, benzodiazepinas, buspirona (Buspar®), o beta-bloqueadores. Las benzodiazepinas son bien conocidas en el arte e incluyen, sin limitación, clonazepam (Klonopin®), lorazepam (Ativan®), y alprazolam (Xanax®). Los fármacos adicionales que se pueden usar en combinación con los métodos de la invención incluyen imipramina (Tofranil®) y venlafaxina (Effexor®).

Un aspecto de la invención es un método para tratar o prevenir un trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con estrés. Como se usa en la presente, un "trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con estrés" se refiere a un estado disfuncional de miedo y ansiedad que es inducido o relacionado con el estrés. Tales

trastornos de ansiedad son algunas veces referidos como trastornos reactivos de ansiedad y serán distinguidos de otros trastornos de ansiedad, por ejemplo, trastornos de ansiedad orgánicos así llamados. El método incluye la etapa
5 de administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento o prevención de un trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con estrés una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar o prevenir el trastorno de ansiedad inducido por estrés o relacionado con
10 estrés.

Un aspecto de la invención es un método para promover la excrecencia de neuritas. En una modalidad, el método es un método *in vitro*. En una modalidad, el método es un método *in vivo*. Como se usa en la presente, una "neurita"
15 se refiere a cualquier proyección del cuerpo celular de una neurona. En una modalidad, tal proyección es un axón. En una modalidad, tal proyección es una dendrita. El término se usa frecuentemente cuando se habla de neuronas inmaduras o de desarrollo, especialmente de células en cultivo, debido a que
20 puede ser difícil decirle axones de dendritas antes que la diferencia se complete. Las neuritas con frecuencia se empacan con haces de microtúbulos, el crecimiento de los cuales se estimula por el factor de crecimiento de nervios (NGF), así como también proteínas tau, proteína 1 asociada a
25 microtúbulos (MAP1), y proteína 2 asociada microtúbulos (MAP2). La molécula de adhesión de células neurales N-CAM simultáneamente se combina con otra N-CAM y un receptor de factor de crecimiento de fibroblastos para estimular la actividad de tirosina cinasa de este receptor para inducir el
30 crecimiento de neuritas.

000091

La excrecencia de neuritas se puede medir morfológicamente o funcionalmente. La medición morfológica típicamente implica el examen microscópico con medición de la longitud y/o número de neuritas.

5 Como se usa en la presente, "promoción" se refiere al mejoramiento o inducción. En una modalidad, "promoción" significa inducción. Por ejemplo, la excrecencia de neuritas en una muestra de control negativo puede ser despreciable, mientras que la excrecencia de neuritas en una muestra
10 experimental o de tratamiento puede ser no despreciable. En una modalidad, "promoción" significa mejoramiento. Por ejemplo, la excrecencia de neuritas en una muestra de control negativo puede ser no despreciable, mientras que la excrecencia de neuritas en una muestra experimental o de
15 tratamiento puede ser estadísticamente de manera significativa mayor que el control negativo. Desde luego "promoción" como se usa en la presente puede abarcar tanto mejoramiento como inducción.

 En una modalidad, el método incluye la etapa de
20 poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para promover la excrecencia de neuritas.

 En una modalidad, el método incluye la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad
25 terapéuticamente efectiva de la urolitina o precursor de la misma, para promover la excrecencia de neuritas. Los métodos de la invención se pueden usar solo o en combinación con cualquier método o compuesto conocido por ser útil para promover la excrecencia de neuritas. Por ejemplo, en una
30 modalidad, un método de la invención se puede combinar con el

000092

uso de cualquiera o más de NGF, proteína tau, MAP1, MAP2, N-CAM, o un agente que induce la expresión de cualquiera o más de NGF, proteína tau, MAP1, MAP2, N-CAM, o receptor de factor de crecimiento de fibroblastos.

5

Uso de Células Neuronales in vitro para Seleccionar Compuestos para Actividades Neuroprotectoras

En los procesos de envejecimiento y neurodegeneración, el deterioro progresivo de la función cognitiva es esencialmente debido a la pérdida de entidades que sostienen la comunicación neuronal. Estas entidades están esencialmente compuestas de cuerpos de células neuronales, neuritas y contactos sinápticos que las conectan a células objetivo. Las neuronas exhiben morfologías muy complejas. Los tipos de células neuronales más complejos, tales como neuronas motrices que extienden los procesos axonales hasta un metro de largo o neuronas dopaminérgicas nigrales que hacen más de 150,000 contactos sinápticos, con frecuencia serán los más vulnerables en la enfermedad o envejecimiento normal. Para mantener tal arquitectura compleja y efectivamente transportar señales eléctricas y neuroquímicas, las neuronas fuertemente se basan en el suministro de energía. Por lo tanto, el transporte axonal, actividad sináptica, y el mantenimiento de gradientes de iones altamente dependen de la función mitocondrial. Para portar estas funciones celulares demandantes, las neuronas experimentan con el tiempo dificultades para sostener el equilibrio delicado de la actividad mitocondrial y subsiguiente estrés oxidativo. Tal desequilibrio frecuentemente se considera la causa de la disfunción

000093

neuronal o degeneración prematura.

Por lo tanto, cualquier tratamiento que promueve la supervivencia neuronal, o la formación de los procesos neuronales y contactos sinápticos que construyen la arquitectura de complejo neuronal, se espera que impacte positivamente a las funciones neuronales. La medición de los efectos del compuesto en la función neuronal típicamente se basa en el monitoreo tedioso de los resultados del comportamiento animal, lo cual no es susceptible a la selección de medio o alto funcionamiento de actividades biológicas. Los modelos *in vitro* basados en líneas celulares de neuroblastoma o cultivos neuronales primarios representan un poder aceptado para valorar los efectos del compuesto en parámetros morfológicos cruciales, los cuales reflejarán la capacidad de las neuronas para sostener su función normal en el cerebro de mamífero. Los indicadores tal como el número de procesos, su duración, o complejidad revelarán los efectos del compuesto en las etapas críticas de la señalización intracelular. Aunque se debería mantener en mente que tales parámetros solo reflejan indirectamente el funcionamiento de mayores funciones cerebrales, proporcionan una evaluación valiosa de la eficacia del compuesto que puede traducirse en funciones motrices o cognitivas mejoradas en condiciones normales o enfermas.

Trastornos metabólicos

La función mitocondrial en tejidos metabólicos claves (hígado, músculo, tejido adiposo, páncreas) está involucrada en la patogénesis de enfermedades metabólicas. En cada uno de estos tejidos, la actividad oxidativa

000094

mitocondrial debe ser apropiada para oxidar completamente las cargas de nutrientes, particularmente ácidos grasos. La falla de oxidación completa puede conducir a la acumulación de intermediarios de lípidos, productos de oxidación de ácidos grasos incompletos, y ROS. En total, estos eventos celulares contribuyen a la acumulación de grasa, resistencia a la insulina, secreción de insulina alterada, inflamación de bajo grado, y estrés oxidativo, todos los cuales son componentes de diabetes mellitus tipo II y obesidad.

La importancia de la actividad mitocondrial en la patogénesis de enfermedades metabólicas se ha establecido en varios estudios en humanos. Por ejemplo, la resistencia a la insulina en el músculo esquelético se ha asociado con un defecto en la fosforilación oxidativa mitocondrial, donde un 30% de reducción de la actividad mitocondrial se observa en la descendencia resistente a insulina de pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con los sujetos de control. Petersen KF, et al. (2004) *New Engl J Med*. 350:664-71. También se ha observado que los pacientes obesos exhiben un 20% de disminución de la actividad mitocondrial junto con un 30% de reducción del tamaño mitocondrial en comparación con sujetos delgados saludables. Petersen KF, et al. (2003) *Science* 300:1140-2. Finalmente, la declinación asociada con la edad en la función mitocondrial contribuye a la resistencia a la insulina en los ancianos. Por consiguiente, un 40% de reducción en la actividad de fosforilación y oxidativa mitocondrial se ha reportado en los ancianos en comparación con sujetos jóvenes. Estas observaciones vinculan la alteración de la función mitocondrial con los trastornos metabólicos, especialmente "diabetesidad" (Kelley DE, et al.

(2002) *Diabetes* 51:2944-50).

La actividad oxidativa mitocondrial, también referida como fosforilación oxidativa, se puede considerar como un determinante clave que fundamente el riesgo de enfermedades metabólicas. Las reducciones de la actividad mitocondrial se pueden mediar por factores genéticos (por ejemplo, historial familiar, etnicidad), mecanismos epigenéticos, exposiciones de desarrollo, comportamiento alimentario y envejecimiento.

10 Cuando el exceso energético sostenido (por ejemplo de sobrealimentación o almacenamiento de grasa deteriorado) sobrepasa las demandas energéticas y/o capacidad oxidativa, y/o los mecanismos compensatorios apropiados son insuficientes (por ejemplo, debido a la inactividad o falla
15 de las mitocondrias para adaptarse a mayores demandas oxidativas celulares), existe un riesgo incrementado de trastornos metabólicos. La acumulación de lípidos y estrés oxidativo resultantes pueden alterar las respuestas transcripcionales y dañar las mitocondrias, reduciendo
20 adicionalmente la capacidad de fosforilación oxidativa, agravando los efectos perjudiciales del exceso energético que eleva el riesgo de trastornos metabólicos.

La suficiencia completa para oxidar ácidos grasos reside en el equilibrio entre: (i) la actividad oxidativa
25 mitocondrial neta (determinada por la necesidad de generar energía para cumplir las demandas celulares, por ejemplo, contracción y transporte de iones), y (ii) disponibilidad energética (determinada por la ingesta de alimentos, adiposidad, y capacidad de almacenamiento adiposo). El
30 equilibrio se logra cuando la actividad oxidativa iguala o

excede las cargas energéticas.

Bajo condiciones homeostáticas normales, tanto la actividad oxidativa como la disponibilidad energética celular se pueden alterar para asegurar que la función mitocondrial es apropiada para el ambiente metabólico ambiental. Por ejemplo, la demanda celular de energía se puede incrementar mediante el ejercicio, y la disponibilidad energética se puede reducir mediante la pérdida de peso y/o ingesta reducida de alimento. En este contexto, las variaciones inter-individuos en la actividad y/o capacidad oxidativa, carga energética, o capacidad para modular la actividad mitocondrial (respuesta aguda), incremento de la capacidad mitocondrial (respuesta crónica), o resolución de estrés oxidativo podrían determinar el punto establecido de equilibrio metabólico. Tales diferencias podrían llegar a ser prominentes particularmente en un ambiente obesogénico (uno caracterizado por ambientes que promueven la ingesta de alimento total incrementada, ingesta de alimentos no saludables, e inactividad física). Por lo tanto, los individuos con una alta capacidad oxidativa o respuestas adaptativas tendrían alta tolerancia a grandes cargas energéticas. A la inversa, los individuos con capacidad oxidativa reducida y/o respuestas adaptativas subóptimas serían intolerantes para moderar altas cargas energéticas, conduciendo a la acumulación de lípidos, oxidación incompleta, producción de ROS, y resistencia a la insulina.

Con el tiempo, la compensación insuficiente resultará en resistencia a la insulina crónica y trastornos metabólicos. La insuficiente capacidad oxidativa podría ser resuelta por mecanismos compensatorios que incrementan la

000097

capacidad oxidativa (por ejemplo, ejercicio) o disminuyen la carga energética (pérdida de peso). Sin embargo, estos cambios de estilo de vida usualmente parecen insuficientes o no se pueden lograr para la mayoría de sujetos con
5 sobrepeso/obesos y diabéticos tipo 2 o pre-diabéticos.

Las mitocondrias son particularmente importantes para la función de músculo esquelético, dada las altas demandas oxidativas impuestas en este tejido por contracción intermitente. Las mitocondrias juegan un papel crítico en el
10 aseguramiento de niveles adecuados de ATP necesarios para la contracción por el sarcomero del músculo. Este requerimiento de alto nivel para ATP por sarcomeros probablemente ha contribuido a las distintas poblaciones subsarcolemales o asociadas con el sarcomero de mitocondrias en el músculo.

15 Además, las células de músculos deben mantener la flexibilidad metabólica, la capacidad para modular rápidamente la oxidación de sustrato como una función de las condiciones energéticas y hormonales ambientales. Por ejemplo, el tejido muscular saludable predominantemente oxida
20 los lípidos en el estado en ayuno, como se evidencia por el bajo cociente respiratorio (RQ), con transición subsecuente a oxidación de carbohidratos (RQ incrementado) durante el estado con alimentos. La disponibilidad de combustibles, particularmente lípidos, y la capacidad para oxidarlos dentro
25 de las mitocondrias también son críticas para el ejercicio sostenido. Por consiguiente, la capacidad funcional mitocondrial probablemente es para afectar directamente la función metabólica muscular y, debido a su gran contribución a la masa corporal total, para tener un impacto significativo
30 en el metabolismo del cuerpo completo. Esta posibilidad se

000098

soporta por los hallazgos del contenido mitocondrial incrementado en el músculo esquelético en un individuo con hipermetabolismo y resistencia a la ganancia de peso (síndrome de Luft).

5

Resistencia a la Insulina y Diabetes Mellitus

El músculo esquelético es el órgano sensible a la insulina más grande en humanos, que representa más del 80% de la eliminación de glucosa estimulada con insulina. Por
10 consiguiente, la resistencia a la insulina en este tejido tiene un mayor impacto en la homeostasis de glucosa del cuerpo completo. En efecto, los múltiples defectos metabólicos se han observado en el músculo de sujetos resistentes a la insulina pero normoglicémicos con alto
15 riesgo para desarrollar diabetes, incluyendo: (i) síntesis de glicógeno estimulado por insulina reducida; (ii) alteraciones en la transducción de señal de insulina; y (iii) acumulación incrementada de lípidos en el músculo. Aunque permanece confuso en el presente si cualquiera de estos defectos juega
20 una función causal en la resistencia a la insulina, el exceso de lípido intramiocelular se correlaciona fuertemente con la severidad de la resistencia a la insulina, aún después de la corrección por el grado de obesidad, y se ha observado en músculos de múltiples tipos de fibra. Además, el exceso de
25 lípido se ha vinculado experimentalmente a la inducción de resistencia a la insulina y alteraciones en transducción de la señal de insulina. Por consiguiente, un posible mecanismo por el cual la función mitocondrial dañada podría contribuir a la resistencia a la insulina es vía metabolismo alterado de
30 ácidos grasos. La carga incrementada de lípidos del tejido,

000399

como con obesidad, y/o inactividad sostenida, puede conducir a la acumulación de la acil coenzima A grasosa (CoA), diacilgliceroles, ceramidas, productos de oxidación incompleta, y ROS, todos estos se han vinculado experimentalmente a la acción y señalización de insulina reducida. Los mecanismos adicionales que potencialmente vinculan la función oxidativa mitocondrial dañada con la resistencia a la insulina incluyen: (i) síntesis de ATP reducida para funciones que requieren energía tal como absorción de glucosa estimulada por insulina; (ii) anormalidades en la homeostasis de calcio (necesaria para la absorción de glucosa inducida por ejercicio); y (iii) producción de ATP reducida durante el ejercicio, que contribuye potencialmente a la capacidad aeróbica reducida, fatiga muscular, y ejercicio voluntario disminuido en el tiempo - alimentando adicionalmente un ciclo vicioso de resistencia a la insulina estimulada por inactividad.

La capacidad mitocondrial es central para la función clave de la secreción de insulina regulada por la célula beta(β) pancreática. La secreción tanto rápida (primera fase) como más prolongada (segunda fase) de insulina son dependientes del metabolismo de glucosa y la capacidad oxidativa mitocondrial; la oxidación de glucosa incrementa la relación ATP/ADP, que inhibe los canales de K-ATP de membrana plasmática y permite que los canales de calcio dependientes de voltaje se abran. El calcio citoplásmico incrementado entonces activa la exocitosis de gránulos de insulina acoplados a la membrana del plasma (primera fase). El reclutamiento subsecuente de gránulos a la membrana de plasma (segunda fase) parece depender de metabolitos mitocondriales

000100

producidos por anaplerosis. El metabolismo mitocondrial también es requerido para la producción controlada transitoria de ROS, la cual es requerida para las trayectorias de señalización mitocondrial que activan la
5 exocitosis de los gránulos.

La diabetes mitocondrial solamente se desarrolla con el envejecimiento, con una edad promedio de comienzo entre 35 y 40 años para diabetes maternalmente heredada con sordera (MIDD) y 48 años por 14577 T/C, una mutación sin
10 sentido de ADN mitocondrial en diabetes tipo 2 maternalmente heredado. Esto contrasta con el comienzo de diabetes en la primera infancia en síndromes tales como diabetes al comienzo de la madurez del joven 2 (MODY2), en el cual una mutación en glucocinasa, la primera etapa de glicolisis, resulta en la
15 secreción de insulina y generación de ATP estimulada por glucosa atenuada. Estos datos sugieren que la diabetes mitocondrial es más probable que resulte de un deterioro gradual de la función de la célula β , en lugar de un daño funcional agudo debido a la producción de ATP insuficiente.

20 La función mitocondrial en tejidos involucrada en la patogénesis de diabetes mellitus (hígado, músculo, tejido adiposo, y células β pancreáticas) es crítica por múltiples aspectos del metabolismo celular. En cada uno de estos tejidos, la actividad oxidativa mitocondrial debe ser
25 apropiada para oxidar completamente cargas nutrientes, particularmente ácidos grasos. La falla de oxidación completa puede conducir a la acumulación de intermediarios de lípidos, productos de oxidación de ácidos grasos incompleta, y ROS, que inducen tanto la resistencia a la insulina (músculo,
30 hígado, tejido adiposo) como la secreción alterada (células

β).

Ligeras deficiencias en la actividad mitocondrial, y/o una incapacidad para incrementar la actividad y capacidad en respuesta a la demanda de energía celular, podrían explicar la reducida capacidad de ejercicio observada en individuos con una historia familiar de diabetes mellitus. Con el tiempo, este fenotipo podría contribuir al ejercicio voluntario reducido e incrementar la probabilidad de un desequilibrio entre la actividad mitocondrial y la carga de ácido graso. En segundo lugar, el desequilibrio crónico en el metabolismo de energía debido a la sobrealimentación, obesidad, e inactividad podría contribuir directamente a la producción incrementada de ROS mitocondrial y celular. A su vez, el ROS excesivo puede inducir tanto la disfunción mitocondrial como la resistencia a la insulina. Por ejemplo, una dieta alta en grasa, alta en sucrosa en el ratón C57BL6 propenso a diabetes causa alteraciones mitocondriales en paralelo con la producción de ROS mejorada y sensibilidad de insulina dañada. De igual manera, la exposición de células del músculo *in vitro* a ácidos grasos saturados o alimentación con alta grasa en ratones, resulta en alteraciones en la estructura mitocondrial y resistencia a la insulina, ambas de las cuales son invertidas por antioxidantes. Por consiguiente, el estrés oxidativo puede inducir la disfunción mitocondrial en paralelo con resistencia a la insulina - tal vez una respuesta adaptativa dirigida a limitar el daño oxidativo adicional. De manera importante, la resolución de estrés oxidativa puede invertir la resistencia a la insulina.

En otras modalidades, la invención proporciona métodos para mejorar el funcionamiento muscular administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto, formulación o compuesto activador o mejorador de
5 mitocondrias. Por ejemplo, los extractos que contienen elagitaninos o ácido elágico, o composiciones que contienen elagitaninos, ácido elágico, o urolitinas que conducen a activar mitocondrias y pueden ser útiles para mejorar la resistencia física (por ejemplo, capacidad para realizar una
10 tarea física tal como ejercicio, labor físico, actividades deportivas), que inhiben o retardan la fatiga física, mejoran los niveles de oxígeno en la sangre, mejoran la energía en individuos sanos, mejoran la capacidad de trabajo y resistencia, reducen la fatiga muscular, reducen el estrés,
15 mejoran la función cardíaca y cardiovascular, mejoran la capacidad sexual, incrementan los niveles de ATP de los músculos, y/o reducen el ácido láctico en la sangre. En ciertas modalidades, los métodos involucran administrar una cantidad de un extracto natural que contiene elagitanino o
20 ácido elágico, o composiciones que contienen elagitaninos, ácido elágico o urolitina, que incrementan la actividad mitocondrial, incrementan la biogénesis mitocondrial, y/o incrementan la masa mitocondrial.

El rendimiento deportivo se refiere a la capacidad
25 de los músculos del atleta para rendir cuando participan en actividades deportivas. El rendimiento deportivo, fuerza, velocidad y resistencia mejorados se miden por un incremento en la resistencia de la contracción muscular, incremento en la amplitud de la contracción muscular, o acortamiento del
30 tiempo de reacción del músculo entre la estimulación y la

contracción. Atleta se refiere a un individuo quien participa en deportes a cualquier nivel y quien busca lograr un nivel mejorado de fuerza, velocidad o resistencia en su rendimiento, tal como, por ejemplo, fisicoculturistas, ciclistas, corredores de largas distancias, y corredores de distancia corta. El rendimiento deportivo mejorado se manifiesta por la capacidad de superar la fatiga muscular, la capacidad para mantener la actividad por largos periodos de tiempo, y tienen un entrenamiento más efectivo.

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

Estrés Crónico

El estrés crónico también se ha reportado que tiene un efecto significativo en el funcionamiento cognitivo y de manera más precisa en proceso de aprendizaje y memoria (Sandi 2004; Sandi and Pinelo-Nava 2007). Varios factores son determinantes en el impacto que tendrá el estrés crónico en la función cognitiva. Los niveles de estrés son importantes en la determinación de si el estrés servirá para facilitar la función cognitiva o será perjudicial. Se cree que en la respuesta a situaciones estresantes el cuerpo induce hormonas de estrés, que producen un efecto U invertido en el aprendizaje, memoria, y plasticidad. Baldi et al. (2005)

000104

Nonlinearity Biol Toxicol Med. 3(1) 9-21; Joels (2006) *Trends Pharmacol Sci.* 27(5):244-50. Por consiguiente, el nivel de estrés tiene un gran efecto en la función cognitiva, con altos niveles de estrés que resultan en altos niveles de hormonas de estrés y funcionamiento disminuido.

La duración del estrés, crónico contra agudo, también se ha mostrado que juega una función importante, con distintos efectos en la función cognitiva, así como la función y estructura del cerebro (Sandi and Loscertales 1999; Pinnock and Herbert 2001). También, el estrés actúa en el proceso de formación de la memoria que resulta en diferentes consecuencias, con consolidación (almacenamiento de la memoria) que es facilitada por estrés agudo, y recuperación (evocación de la memoria) que es inhibida (Roozendaal 2003). Además, la previsibilidad del estrés también juega una función en la severidad de los efectos observados en el funcionamiento cognitivo (Maier and Watkins 2005).

Adicionalmente, el contexto en el cual ocurre el estrés crónico, así como también las diferencias individuales en la respuesta al estrés inherente a individuos y género, juegan una función importante en la determinación del impacto cognitivo final del estrés crónico (Bowman, Beck et al. 2003; Shors 2004; Joels, Pu et al. 2006).

Las bases biológicas para los efectos del estrés crónico todavía no están bien definidas. Sin embargo, una característica común observada es la función clave de glucocorticoides en la mediación de tanto las acciones que facilitan y mejoran el estrés, en diferentes fases y procesos de memoria. Aunque el mecanismo de glucocorticoides todavía tiene que ser aclarado, se ha mostrado *in vitro* el daño a la

excrecencia neuronal inducido por el factor de crecimiento del nervio (NGF). Unsicker et al. (1978) *Proc Natl Acad Sci USA*. 75:3498-502. Además, la estructura neuronal y excrecencia de neuritas inducidas por factores tales como NGF se correlacionan fuertemente con su actividad neuroprotectora, que sugiere de nuevo que la estructura neuronal es importante para la cognición.

Estrés y remodelación estructural

10 Inicialmente, el hipocampo fue la región del cerebro que recibió estrecha atención debido a muchos reportes que indican efectos perjudiciales de estrés crónico en tareas de memoria dependiente del hipocampo. Sin embargo, el trabajo intensivo es proporcionar ahora evidencia para un
15 impacto más integral de estrés crónico por todo el cerebro, con mayores cambios que también tienen que ser reportados por la corteza prefrontal y la amígdala. Los cambios en la ramificación dendrítica y sinaptogenesis que ocurren en la amígdala son candidatos creíbles para participar en
20 alteraciones del estado de ánimo inducidas por estrés. También, los cambios que ocurren al nivel del hipocampo y la corteza prefrontal se considera que juegan una función clave en alteraciones del estado de ánimo inducido por estrés.

Hipocampo. El hipocampo es bien conocido por su
25 función crucial en el proceso de memoria. Las tareas dependientes del hipocampo generalmente son afectadas por manipulaciones de estrés tanto agudo como crónico. En humanos, los estudios en neuroimagen han reportado atrofia del hipocampo en asociación con alteraciones
30 neuropsiquiátricas y cognitivas relacionadas con estrés y

glucocorticoides, incluyendo depresión.

En roedores, un efecto duplicado muchas veces y prominente es una atrofia dendrítica en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA3. Esta ramificación dendrítica reducida se ha asociado con (i) una reducción en la densidad sináptica de sinapsis glutamatérgica excitadora; (ii) una disminución del volumen de las espinas dorsales dendríticas complejas llamadas excrecencias dendríticas, que se localizan en la dendrita apical cercana y soma de células piramidales de CA3 y las cuales sirven como objetivos postsinápticos para las entradas sinápticas de fibra musgosa; y (iii) un rearreglo de vesículas sinápticas y mitocondrias en las terminales de fibra musgosa aferente. A su regreso, la evidencia para la remodelación sináptica -- en términos de cambios en características sinápticas - también se ha reportado para la región CA1 del hipocampo.

Corteza Prefrontal. La corteza prefrontal (PFC), y más particularmente su parte media (mPFC), juega funciones clave en los procesos altamente cognitivos (incluyendo la función ejecutiva, memoria de trabajo, atención), así como también en la integración de información emocionalmente relevante y cognitiva. Se debe señalar que la mPFC contiene altos niveles de receptores de glucocorticoides y está involucrada en la regulación de la actividad hipotalámica-pituitaria-adrenal (HPA) inducida por estrés. Como se señaló anteriormente, la evidencia clínica destaca la mPFC como un área que experimenta alteraciones marcadas en una amplia variedad de trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo depresión.

Existe evidencia sustancial de los estudios en

roedores para contracción dendrítica inducida por estrés en la PFC. En particular, la mayor remodelación neuronal se describe que ocurre en la capa II/III de la mPFC como una consecuencia de la exposición repetida al estrés crónico o tratamiento repetido con glucocorticoides. Los principales cambios descritos en esta área son (i) una atrofia dendrítica, incluyendo tanto la disminución de longitud total como el número de dendritas apicales de las neuronas piramidales; y (ii) una disminución en la densidad de la espina dorsal dendrítica apical (aproximadamente se pierde un tercio de todas las sinapsis de axospino en dendritas apicales de neuronas piramidales)

Efectos antidepresivos. El tratamiento con la tianeptina antidepresiva atípica (tricíclica modificada) se mostró que invierte la atrofia dendrítica inducida por estrés crónico en neuronas piramidales CA3 en ratas. Además, los antidepresivos también se reportaron que facilitan el surgimiento dendrítico y axonal. Estos hallazgos sugieren que los antidepresivos pueden tener un mayor impacto en la remodelación neuronal, proporcionando las bases para que los circuitos relevantes sean reorganizados en el curso de recuperación de la depresión.

Estrés a Edad Temprana

Un aspecto de la invención es un método para tratar efectos del estado de ánimo de estrés a edad temprana. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de urolitina o un precursor del mismo, para tratar los efectos de la tensión a edad temprana en estado de ánimo, depresión,

000108

ansiedad, y comportamientos de toma de riesgos.

El estrés a edad temprana se ha reportado que tiene un efecto perjudicial significativo en el funcionamiento cognitivo, incluyendo parámetros fisiológicos tales como velocidades incrementadas de o susceptibilidad a la depresión, ansiedad, y comportamientos anormales de toma de riesgos. Heim C, Nemeroff CB. (2001) *Biol Psychiatry* 49:1023-1039. Las velocidades incrementadas trastorno de déficit de atención/hiperactividad (ADHD), trastorno por estrés post-traumático (PTSD), y mayor depresión se han reportado en individuos que ha experimentado estrés a edad temprana. Famularo R et al. (1992) *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 31:863-867; Pelcovitz D et al. (1994) *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 33:305-312. El estrés a edad temprana es sabido que tiene un impacto en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). Ladd CO et al. (2000) *Prog Brain Res* 122:81-103. El efector clave pensado para controlar la sensibilidad del eje HPA al estrés son los factores de liberación de la corticotropina central (CRF).

El CRF es un péptido de 41 aminoácidos el cual se distribuye en todo el CNS. Este incluye los cuerpos de células de la región pervocelular media del núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico, un componente central del eje HPA. En estrés, el CRF es liberado de las terminales nerviosas de eminencia mediana en la circulación portal del hipotálamo-hipofisiario y transportado a la pituitaria anterior donde se enlaza a receptores de CRF (CRF1 y CRF2). El CRF que enlaza al receptor CRF1 produce efectos que son reminiscentes de estrés, depresión, y ansiedad. El CRF que enlaza al receptor CRF2 estimula la producción y liberación

de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la cual a su vez estimula la producción de glucocorticoides involucrados en la respuesta al estrés.

En modelos de estrés a edad temprana provocado por separación maternal, se observa un nivel elevado a largo plazo consistente de mRNA de CRF. Plotsky PM et al. (2005) *Neuropsychopharmacology* 30:2192-2204. Tales incrementos en CRF se han mostrado que tienen efectos al nivel de las amígdalas en la respuesta a la ansiedad incrementada. Se cree que una sensibilización persistente de los neurocircuitos de CRF es responsable de la ansiedad, depresión y comportamiento de toma de riesgos anormalmente elevados, observados en ratones expuestos a estrés a edad temprana.

15 *Estrategias Actuales que Emplean Antidepresivos para Mejorar Trastornos Psicológicos Debido al Estrés a Edad Temprana*

Un número de estudios han mostrado que los antidepresivos disminuyen la actividad de CRF en el eje de HPA en roedores y primates, incluyendo humanos. Banki CM et al. (1992) *J Affect Disord* 25:39-45; Brady LS et al. (1992) *Brain Res* 572:117-125; Brady LS et al. (1991) *J Clin Invest* 87:831-837; De Bellis MD et al. (1993) *Am J Psychiatry* 150:656-657; Veith RC et al. (1993) *Psychiatry Res* 46:1-8. Varias clases de fármacos antidepresivos parecen producir una disminución en la actividad de uno o más sistemas neurales de CRF. Estos incluyen inhibidores de reabsorción de 5-HT selectivos (SSRI), que han mostrado ser efectivos en el tratamiento de varios trastornos psiquiátricos que se han asociado con estrés a edad temprana (por ejemplo, depresión y PTSD). Hidalgo RB et al. (2000) *J Psychopharmacol* 14:70-76.

Notablemente, en un ensayo controlado por placebo aleatorizado, sujetos que han padecido estrés a edad temprana y que sufren de PTSD fueron sensibles a fluoxetina. van der Kolk BA et al. (1994) *J Clin Psychiatry* 55:517-522. Además, 5 SSRIs, que incluye fluoxetina y paroxetina, muestran eficacia significativa contra placebo en el tratamiento de depresión que comienza tempranamente en niños y adolescentes. Martin A et al. (2000) *Child Adolesc Psychiatry Clin N Am* 9:135-157. Los antidepresivos tricíclicos también han encontrado que 10 invierten la reactividad incrementada del eje de HPA al estrés en primates adultos expuestos a privación maternal. Suomi SJ. (1991) *Ciba Found Symp* 156:171-183. Parece que varios fármacos disponibles, incluyendo los SSRIs, pueden ser benéficos en el tratamiento de niños y adultos expuestos a 15 estrés a edad temprana. Fisher PA et al. (2000) *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39:1356-1364.

Indicaciones Adicionales

La invención también encontrará uso en el 20 tratamiento de cualquier variedad de enfermedades y condiciones adicionales en las cuales la actividad mitocondrial deficiente o disminuida participa en la patofisiología de la enfermedad o condición, o en la cual la función mitocondrial incrementada producirá un efecto 25 benéfico deseado. Como un ejemplo, la invención además incluye métodos y compuestos que se pueden usar para tratar infertilidad en machos asociada con la motilidad de espermatozoides disminuida. Nakada et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:15148-53. Como otro ejemplo, la invención además incluye 30 métodos y compuestos que pueden ser usados para tratar

degeneración macular y algunos otros trastornos oculares relacionados con la edad y heredados. Khandhadia et al. (2010) *Expert Rev Mol Med.* 12:e34; Jarrett et al. (2010) *Ophthalmic Res.* 44:179-90. Otro ejemplo es un método para
5 tratar pérdida de la audición, incluyendo pero sin limitarse a pérdida de la audición relacionada con la edad. En cada una de estas y otras indicaciones, el método involucra administrar a un sujeto con necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de una urolitina o precursor de la misma,
10 como se describe en la presente, para tratar la indicación.

Formulaciones y Uso Clínico

Un "sujeto" como se usa en la presente se refiere a un vertebrado vivo. En una modalidad, un sujeto es un
15 mamífero. En una modalidad, un sujeto es un humano.

Como se usa en la presente, el término "tratar" como se usa con respecto a una enfermedad, trastorno, o condición de un sujeto, significa reducir por una cantidad detectable al menos una manifestación clínica u objetiva de
20 la enfermedad, trastorno, o condición de un sujeto. En una modalidad, el término "tratar" usado con respecto a una enfermedad, trastorno, o condición de un sujeto, significa curar la enfermedad, trastorno, o condición de un sujeto.

La urolitina o precursor de la misma se puede
25 administrar, sola o conjuntamente con otro agente, a un sujeto (por ejemplo, mamífero) en una variedad de formas. Por ejemplo, la urolitina o precursor del mismo se puede administrar oral o parenteralmente. Parenteralmente incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal,
30 subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intraocular,

intratecal, tópicamente, o por inhalación. Tal como, la forma de la dosis de urolitina o precursor de la misma puede estar en una variedad de formas, incluyendo alimentos naturales, alimentos procesados jugos naturales, concentrados y
5 extractos, soluciones inyectables, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, yesos, formas para inhalación, aerosoles nasales, gotas nasales, gotas oculares, tabletas sublinguales, y preparaciones de liberación prolongada.

Los compuestos de esta invención se pueden
10 proporcionar en forma aislada. Como se usa en la presente, el término "aislado" significa sustancialmente removido de otros compuestos o componentes con los cuales el compuesto de interés puede encontrarse de otra forma, por ejemplo, cuando se encuentra en la naturaleza. En una modalidad, un compuesto
15 es aislado cuando esencialmente se remueve completamente de otros compuestos o componentes con los cuales el compuesto de interés se puede encontrar de otra forma. En una modalidad, un compuesto se aísla cuando es puro.

Los compuestos de esta invención se pueden
20 incorporar en una variedad de formulaciones para la administración terapéutica. De manera más particular, los compuestos de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas por combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y se
25 pueden formular en preparaciones en formas sólida, semisólida, o formas gaseosas, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, y aerosoles. Tal como, la administración de los compuestos se pueden
30 lograr en varias formas, incluyendo administración oral,

bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, e intratraqueal. El agente activo puede ser sistémico después de la administración o se puede localizar por el uso de la administración regional, administración
5 intramural, o uso de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de implantación.

Los compuestos de la invención también se pueden formular como aditivos alimenticios, ingredientes de alimentos, alimentos funcionales, suplementos dietéticos,
10 alimentos médicos, nutraceuticos, o suplementos alimenticios.

En las formas farmacéuticas, los compuestos se pueden administrar en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los mismos también se pueden usar en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los
15 siguientes métodos y excipientes son solamente ejemplares y están de manera no limitativa.

Para preparaciones orales, los compuestos se pueden usar solos o en combinación con aditivos apropiados para hacer tabletas, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con
20 aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de papa; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegradores, tales como almidón de maíz, almidón de papa o carboximetilcelulosa de sodio; con
25 lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; si se desea, con diluyentes, agentes amortiguadores, agentes humectantes, conservadores y agentes saborizantes.

Los compuestos se pueden formular en preparaciones para inyecciones por disolución, suspensión o emulsionarlos
30 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 solubilizantes, agentes isotónicos, agentes
5 formadores de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservadores.

Los compuestos se pueden utilizar en formulación para aerosol para administrarse vía inhalación. Los compuestos de la presente invención se pueden formular en
10 propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, los compuestos se pueden hacer en supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos
15 de la presente invención se pueden administrar rectalmente vía un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilenglicoles, los cuales se derriten a temperatura corporal, pero se solidifican a temperatura ambiente.

20 Las formas farmacéuticas unitarias para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires, y suspensiones se pueden proporcionar en donde cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharaditas, cucharada sopera, tableta o supositorio, contiene una cantidad predeterminada
25 de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención. De manera similar, las formas farmacéuticas unitarias para administración por inyección o intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición como una solución en agua
30 estéril, salina normal u otro portador farmacéuticamente

aceptable, en donde cada unidad de dosificación, por ejemplo, ml o l, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención.

5 Los implantes para formulaciones de liberación prolongada son bien conocidos en la técnica. Los implantes son formulados como microesferas; placas, etc., con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un
10 polímero erosionable que es bien tolerado por el huésped. El implante que contiene los compuestos inhibidores se pueden colocar en proximidad a un sitio de interés, de modo que la concentración local de agente activo se incrementa con relación al resto del cuerpo.

15 El término "forma farmacéutica unitaria", como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos o animales, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de los compuestos de la presente
20 invención calculados en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas farmacéuticas unitarias nuevas de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el
25 efecto a, ser logrado, y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el huésped.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están fácilmente disponibles al público. Además, las sustancias
30 auxiliares farmacéuticamente disponibles, tales como agentes

7-000116

amortiguadores y ajustadores de pH, agentes ajustadores de tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

Para uso clínico, la urolitina o precursor de urolitina se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. Como se usa en la presente, una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que es suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para realizar, en una dosis única o dosis múltiple, un efecto terapéuticamente deseado. Un experto puede determinar cantidades terapéuticamente efectivas basadas en estudios preclínicos o clínicos *in vitro*, o cualquier combinación de los mismos.

La dosificación generalmente será diaria a semanal. En una modalidad, la dosificación es al menos semanal. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una dosis una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana o diario. En una modalidad, la dosificación es al menos diaria. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una o más dosis diarias.

Para uso clínico, una urolitina generalmente se administrará en una cantidad que varía desde aproximadamente 0.2 - 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto. En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 2 - 120 mg de urolitina por kg de peso corporal del sujeto. En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis igual o equivalente a 4 - 90 mg de urolitina por kg de peso corporal del sujeto. En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra

000117

en una dosis igual o equivalente a 8 - 30 mg de urolitina por kg de peso corporal del sujeto. Donde un precursor de urolitina será administrado en lugar de urolitina, se administra en una cantidad que es equivalente a las
5 cantidades de urolitina establecidas anteriormente.

Cualquier dosis proporcionada puede ser dada como una dosis única o como dosis dividida.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un
10 nivel de suero pico de al menos 0.001 micromolar (μM). En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero pico de al menos 0.01 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr
15 un nivel de suero pico de al menos 0.1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero pico de al menos 1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un
20 nivel de suero pico de al menos 5 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero pico de al menos 10 μM .

En una modalidad, la urolitina o precursor de la
25 misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero mantenido de al menos 0.001 micromolar (μM). En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero sostenido de al menos 0.01 μM . En una modalidad, la
30 urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis

suficiente para lograr un nivel de suero sostenido de al menos 0.1 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero sostenido de al menos 1 μM . En una modalidad, 5 la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero sostenido de al menos 5 μM . En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel de suero sostenido de al menos 10 μM . El nivel de suero 10 sostenido se puede medir usando cualquier método adecuado, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o HPLC-MS.

En una modalidad, la urolitina o precursor de la misma se administra como jugo de granada en la cantidad de 25 15 ml a 5 ml, o una dosis equivalente de elagitaninos, ácido elágico, urolitinas, o cualquier combinación de los mismos. La Tabla 4 muestra el consumo de diferentes compuestos de granada para diferentes niveles de jugo de granada. El intervalo cubre diferencias en la concentración del compuesto 20 entre diferentes variedades de granada. Para los cálculos de equivalente de ácido elágico, se asumió que el metabolismo de cada mol de punicalagina resulta en la liberación de 1 mol de ácido elágico, y que esta conversión sucedió con 100% de eficacia. Los niveles de urolitina se determinaron asumiendo 25 que todo el ácido elágico presente, incluyendo aquel derivado de punicalagina, se convierte a urolitina con 100% de eficiencia. No se tomaron en consideración otras fuentes de ácido elágico además de punicalagina y ácido elágico.

Tabla 4.

Equivalente de Jugo (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 modalidad, el sujeto no está tomando una urolitina o precursor de la misma para cualquier propuesta distinta para el tratamiento de una condición de acuerdo con los métodos de la invención. En una modalidad, el sujeto no está tomando una urolitina o precursor de la misma para el tratamiento de aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección o inflamación.

EJEMPLOS

La invención ahora será descrita generalmente, será más fácil entender con referencia a lo siguiente, que se incluye solamente para propósitos de ilustración de ciertos aspectos y modalidades de la presente invención, y no se

pretende limitar la invención.

Ejemplo 1

5 *Preparación de Extractos Funcionales de Compuestos de Granada*

Los extractos de granada descritos en esta solicitud que contienen moléculas específicas fueron preparadas usando un procedimiento de extracción basado en adsorción de polifenoles en una columna a base de absorción de polímero estándar como se describe. Para la preparación de los extractos 31008 y 1108 derivados del jugo de granada, las granadas fueron sometidas a extracción de jugo usando un proceso de manufactura y extracción de jugo estándar y es absorbido en una resina cromatográfica polimérica como jugo puro. La resina Amberlite XAD-16 (Rohm & Haas) fue empacada en columnas semipreparativas y cargada con el jugo extraído. La columna se lavó con agua para remover los azúcares hasta la terminación (Niveles Brix estuvieron por debajo de 0.1%). Los polifenoles fueron eluidos con 100% de etanol. El etanol remanente se evaporó bajo vacío para producir un extracto concentrado que contiene 4.5 g de polifenol total por litro como se determina usando el ensayo de Folin para el contenido de polifenol total. El extracto 1011 fue preparado de una manera similar como extracto 31008 y 1108, pero el extracto líquido después se seco por pulverización utilizando un secador por pulverización para producir un extracto de polvo final. Utilizando HPLC-MS para la identificación de compuestos, los extracto 31008, 1108 y 1011 fueron encontrados para contener las moléculas de punicalagina, punicalina, telimagrandina, y pedunculagina.

000121

El extracto 71109 derivado de la cáscara de granada separando manualmente la cáscara de la pulpa de arilos de granada, seguido por presión con una prensa para fruta manual. Para extraer la cantidad máxima de polifenoles, la
5 torta/pupa de partes de granada prensada fueron lavadas en agua de manera consecutiva por varios periodos de tiempo (5 minutos) para incrementar la eficiencia de extracción. La solución de granada extraída se aclaró por centrifugación antes de ser adsorbida en la resina Amberlite XAD-16
10 cromatográfica polimérica (Rohm & Haas), empacada en columnas semipreparativas, y cargadas con el agua extraída de la cáscara de granada. La columna se lavó con agua para remover los azúcares hasta la terminación (los niveles Brix fueron inferiores a 0.1%). Los polifenoles se eluyeron con 100% de
15 etanol. El remanente de etanol se evaporó bajo vacío para producir un extracto concentrado que contiene 17.1 g de polifenol total por litro como se determinó usando el ensayo de Folin para el contenido total de polifenol. Esta técnica es una modificación de métodos conocidos en la técnica como
20 se describe por varios métodos publicados para la purificación de polifenoles de varias plantas y bayas. Tuck, K. L. and P. J. Hayball (2002) "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects." *J Nutr Biochem* 13(11):636-644; y Schieber, A., P. Hilt, et al. (2003) "A new
25 process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace." *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 4:99-107.

Para la preparación del Extracto 61109, un extracto acuoso de la granada se fraccionó utilizando cromatografía de
30 partición centrífuga. Las fracciones aisladas se liofilizaron

para producir el extracto 61109, altamente enriquecida en punicalagina (>90%).

Purificación de Punicalagina

5 *Preparación de Extracto*

El extracto de granada se disolvió en 16 ml de la mezcla orgánica/fase acuosa (1:1) y se filtró en un filtro de Teflón (0.45 µM).

Separación de Punicalagina del Extracto Usando

10 *Cromatografía de Partición Centrífuga*

La separación de punicalagina del extracto de granada se logró utilizando Cromatografía de Partición Centrífuga CPC. El aparato de CPC fue un aparato FCPC® 1000 provisto por Kromaton Technologies (Angers, Francia) que se
15 filtra con un rotor de 1000 ml de capacidad. Los solventes se bombearon por una bomba de gradiente de alta presión binario de 4 vías. Las muestras se introdujeron en la columna de CPC vía una válvula de inyección de alta presión (Rheodyne) equipada con un circuito de muestra de 20 ml. El efluente se
20 monitoreo con un detector de detección de arreglo de diodos (DAD) equipado con una celda de flujo preparativa. Las fracciones se colectaron por un colector de fracción. Las etapas de separación se condujeron a temperatura ambiente.

Para lograr la extracción, la fase estacionaria se
25 introdujo primero en la columna en el modo ascendente sin rotación, y la fase móvil se bombea entonces a través de la fase estacionaria hasta que se alcanza una etapa de equilibrio. Luego, la velocidad de rotación se incrementó desde 0 a 1000 rpm y la fase móvil se bombeo en la columna a
30 una velocidad de flujo de 20 ml/min. Después de la inyección

de 10 g de extracto de granada, las fracciones de 20 ml se colectaron cada minuto. El contenido de la fase orgánica saliente se monitoreó por medición de absorbancia de UV en línea a $\lambda = 260$ nm.

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

 Para determinar el nivel de purificación, la
15 muestra purificada se examinó usando HPLC-DAD a una longitud de onda de detección de 260 nm. La muestra se realizó sobre una columna Prosontil C18, 5 μ m, 250 x 4 mm. Los solventes usados fueron H2O mQ +9.1% TFA/Acetonitrilo + 0.1% TFA a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

20

Ejemplo 2

Ensayos de Selección In Vitro para Compuestos que Promueven el Mejoramiento de la Expresión de Genes de Mitocondriales en una Línea Celular del Músculo Esquelético Prototípica

25

(Miotubos C2C12)

 Los músculos esqueléticos tienen un papel fundamental en la regulación de homeostasis metabólica puesto que los mismos se involucran en funciones metabólicas tales como gastos de energía y mantenimiento de sensibilidad a la
30 insulina. Estas funciones están estrechamente vinculadas a la

actividad mitocondrial, y el deterioro de la función mitocondrial tiene una función causal en la homeostasis metabólica defectuosa y desarrollo de trastornos metabólicos tales como diabetes tipo 2, obesidad, y dislipidemia. El perfil de expresión del gen de genes involucrados en la actividad mitocondrial en células C2C12 diferenciadas (miotubos) es un modelo apropiado para evaluar el impacto de compuestos en la actividad mitocondrial evaluando numerosas trayectorias que reflejan la actividad mitocondrial, por ejemplo, biogénesis mitocondrial, glicolisis, β -oxidación de ácidos grasos, cadena de transporte de electrones (ETC), dinámica mitocondrial.

Para evaluar los efectos de los compuestos en la expresión del gen mitocondrial, los mioblastos C2C12 fueron diferenciados en miotubos por privación de suero por 4 días (Cantó et al. (2009) *Nature*, 458:1056-60). Los miotubos se incubaron por 48 horas con ácido elágico o urolitina A a una concentración final de 1, 10 o 50 μ M (todo se disuelve en DMSO, concentración final 0.1%). DMSO se utilizó como un control (concentración final 0.1%). Al final del tratamiento, las células se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y mRNA se extrajo inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Trizol Reagent, Invitrogen) adicionando 1 ml de reactivo Trizol. Después de la extracción, el cADN se produjo por la transcripción inversa de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La evaluación de los niveles de expresión de genes (PGC-1 α , Tfam, PFKFB3, CPT1b, MCAD, LCAD, Ndufa2, Cyt c, y Mfn2) que controla la función mitocondrial se realizó por PCR cuantitativo en tiempo real (Watanabe et al. (2004) *J Clin*

Invest. 113:1408-18) usando el siguiente conjunto de cebadores (Fwd: cebador directo; Rev: cebador inverso):

PGC-1 α : (Fwd) AAGTGTGGAAGCTCTCTGGAAGT (SEC ID NO:1)

(Rev) GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG (SEC ID NO:2)

5 Tfam: (Fwd) AAGTGTTTTTCCAGCATGGG (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)

10 (Rev) CCTTGAAGAAGCGACCTTTG (SEC ID NO:8)

LCAD: (Fwd) GTAGCTTATGAATGTGTGCAACTC (SEC ID NO:11)

(Rev) GTCTTGCGATCAGCTCTTTCATTA (SEC ID NO:12)

Ndufa2: (Fwd) GCACACATTTCCCCACACTG (SEC ID NO:13)

(Rev) CCCAACCTGCCATTCTGAT (SEC ID NO:14)

15 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 de
 20 transcripción mitocondrial A) son reguladores principales de
 la función mitocondrial, principalmente de biogénesis
 mitocondrial y oxidación fosforilativa mitocondrial
 (mOXPHOS). Un incremento en sus niveles de expresión revela
 un mejoramiento total de la actividad mitocondrial. La
 25 valoración de otros genes objetivo involucrados en funciones
 clave de las mitocondrias permite la identificación de las
 trayectorias mejoradas. PFKFB3 (6-fosfofructo-2-
 cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3) es una enzima clave de
 glicólisis, es decir, el uso de glucosa para producir
 30 energía. En condiciones aeróbicas (es decir, cuando existen

suministros de oxígeno), piruvato producido de glucosa vía glicolisis se usa por mitocondrias para producir energía (ATP) a través del ciclo de Krebs. CPT1b (carnitina O-palmitoiltransferasa 1b), MCAD (acil CoA deshidrogenasa de cadena media), y LCAD (acil CoA deshidrogenasa de cadena larga) juegan un papel fundamental en la absorción de ácido graso mitocondrial y β -oxidación, dos etapas críticas para la producción de energía de ácidos grasos. Ndufa2 (subunidad 2 de subcomplejo alfa 1 de NADH deshidrogenasa [ubiquinona]) y Cyt c (citocromo c) son subunidades de complejo I y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondriales, respectivamente. Estas proteínas tienen una función esencial en la cadena respiratoria mitocondrial y producción de energía del equivalente reducido producido por el ciclo de Krebs. Mfn2 (Mitofusina 2) está involucrada en la dinámica mitocondrial y proceso de fusión. Su expresión se incrementa en el contexto de remodelación mitocondrial incrementada y/o biogénesis mitocondrial (número incrementado de mitocondrias por célula).

Los datos mostrados en la Figura 3 claramente indican que el ácido elágico y urolitina A incrementan la actividad mitocondrial en una manera dependiente de la dosis modulando la expresión de genes numerosos involucrados en varias trayectorias del metabolismo mitocondrial.

Ejemplo 3

Ensayo de Selección In Vitro para Compuestos que Promueven el Mejoramiento de la Actividad Mitocondrial en una Línea Celular del Músculo Esquelético Prototípica (Miotubos C2C12)

La citrato sintasa es la enzima inicial del ciclo

de ácido tricarboxílico (TCA) y la etapa de limitación de la velocidad para entrar al ciclo de TCA. El ciclo de TCA producirá NADH₂ y FADH₂, los cuales son usados entonces para alimentar la cadena de transporte de electrones que generarán un gradiente de protones (energía), que serán usados en la generación de ATP. Como tal, la citrato sintasa es un marcador exclusivo del número mitocondrial y de la actividad mitocondrial. Midiendo los efectos de compuestos o formulaciones en la actividad de la enzima citrato sintasa, es posible evaluar la capacidad de los compuestos para estimular la actividad mitocondrial (es decir, producción de ATP y OXPHOS).

La enzima citrato sintasa cataliza la reacción entre la acetil coenzima A (acetil CoA) y ácido oxaloacético para formar el ácido cítrico. El acetil CoA contribuye 2 carbonos para los 4 carbonos de oxaloacetato, 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 citrato sintasa se mide vía la reacción entre el tiol de CoA-SH con el DTNB en la mezcla para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Este producto amarillo (TNB) se observa espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 412 nm (Citrate Synthase Assay Kit, Cat Number CS0720, Sigma Aldrich).

Los mioblastos C2C12 se diferenciaron en miotubos por privación de suero por 4 días (Cantó et al. (2009) *Nature*. 458:1056-60). Los miotubos se incubaron por 48 horas con punicalagina a una concentración final de 1 o 10 μ M o con ácido elágico o urolitino a una concentración final de 1, 10 o 50 μ M (todos disueltos en DMSO, concentración final 0.1%).

DMSO se utilizó como un control (concentración final 0.1%). Al final del tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron a ensayo por actividad de citrato sintasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Citrate Synthase Assay Kit, Cat Number CS0720, Sigma Aldrich).

Como se muestra en la Figura 4, punicalagina, ácido elágico, y urolitina incrementan la actividad de citrato sintasa en una manera dependiente de la dosis, ilustrando un incremento total en la actividad mitocondrial y/o densidad mitocondrial (número de mitocondrias por células). Estos resultados confirman los resultados obtenidos por el perfil de expresión del gen de genes mitocondriales (Ejemplo 1) que muestran un mejoramiento de la actividad mitocondrial y biogénesis mitocondrial en C2C12 diferenciados tratados.

Estadística: ANOVA de una vía * $p < 0.05$.

Ejemplo 4

Ensayo de Selección In Vitro para Compuestos que Promueven la Actividad de la Proteína Cinasa Activada por AMP (AMPK) en una Línea celular del Músculo Esquelético Prototípico (Miotubos C2C12)

La AMPK actúa como un interruptor principal metabólico que regula varios sistemas intracelulares que incluyen la absorción celular de glucosa, la β -oxidación de ácidos grasos, y la biogénesis del transportador de glucosa 4 (GLUT4) y mitocondrias. La capacidad de detección de energía de AMPK se puede atribuir a su capacidad para detectar y reaccionar a fluctuaciones en la relación AMP:ATP que ocurre durante el descanso y el ejercicio (estimulación del músculo). Como un ejemplo, durante una serie de ejercicios,

la actividad de AMPK se incrementa (fosforilación de AMPK, P-AMPK) mientras que la célula del músculo experimenta estrés metabólico provocado por una demanda celular extrema por ATP. En la activación (fosforilación de AMPK, P-AMPK), AMPK incrementa los niveles de energía celular inhibiendo trayectorias de consumo de energía (síntesis de ácido graso, síntesis de proteína, etc.) y estimula la producción de energía, trayectorias catabólicas (oxidación de ácidos grasos, transporte de glucosa, etc.). Por consiguiente, la activación de AMPK conduce a un aumento de la función mitocondrial, incluyendo OXPHOS incrementado y biogénesis mitocondrial.

Los mioblastos C2C12 fueron diferenciados a miotubos por privación de suero por 4 días (Cantó et al. (2009) *Nature*. 458:1056-60). Los miotubos se incubaron por 1 hora con resveratrol (RSV), los cuales sirvieron como un control positivo, o ácido elágico (EA) o urolitina A (UL) a una concentración final de 50 μ M (todos se disolvieron en DMSO, concentración final 0.1%). DMSO se utilizó como un control (concentración final de DMSO: 0.1%). Al final del tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS, y proteína cinasa activada por AMP (AMPK) se evaluaron por análisis Western blot. Seguido del tratamiento del compuesto, las células C2C12 se lisaron en el amortiguador que contiene inhibidores de fosfatasa, y la concentración de proteína se determinó usando un ensayo de Bradford estándar. El equivalente de 25 μ g de proteína se utilizó para la separación en un gel de SDS-PAGE al 10% y se transfirió subsecuentemente por procedimientos de análisis Western blot estándar. Los anticuerpos dirigidos a AMPK (Señalización

Celular) y AMPK fosforilada (P-AMPK, Señalización Celular) fueron usados para la detección.

Como se muestra en la Figura 5, el análisis Western blot para la forma fosforilada, y por consiguiente activada de AMPK - es decir, P-AMPK, indica que los niveles de fosforilación de AMPK (P-AMPK) y por consiguiente la activación de la proteína cinasa activada con AMP (AMPK) se incrementaron efectivamente en células tratadas con ácido elágico o urolitina con relación a las células tratadas con control. Estos datos indican que el ácido elágico y urolitina A son ambos activadores de AMPK. Esto además soporta las observaciones de que el ácido elágico y urolitinas inducen un incremento en la función de las mitocondrias.

15

Ejemplo 5

Ensayo de Selección para Compuestos que Promueven la Excrecencia de Neuritas en Células PC-12

La excrecencia de neuritas y el número medio de procesos por célula en cultivo neuronal se ha mostrado que corresponden a la función neuronal. El estrés crónico se ha mostrado que da lugar a reducciones de longitud dendrítica y número de ramificación, un efecto el cual se invirtió en la remoción de estrés. Además, se ha mostrado que esta reversibilidad llega a ser inhibida con la edad (Bloss, Janssen et al. 2010). También existe evidencia adicional de que las experiencias sensoriales nuevas y de aprendizaje están asociadas con incrementos en la formación de la espina dorsal y eliminación de procesos prolongados. Por consiguiente, la plasticidad estructural sináptica juega una función importante en el aprendizaje y memoria (Yang, Pan et

al. 2009). En efecto, el nivel de excrecencia de neuritas y número de procesos inducidos por compuestos tales como factor de crecimiento del nervio (NGF) se correlaciona fuertemente con sus habilidades neuroprotectoras. Con la edad esta plasticidad sináptica llega a comprometerse y existe una pérdida incrementada de espinas dorsales y una densidad disminuida de sinapsis (Dumitriu, Hao et al. 2010). Las enfermedades neurodegenerativas también tienen un efecto en la excrecencia de neuritas. Un péptido A-beta ($A\beta$), el cual juega una función importante en la enfermedad de Alzheimer, inhibe la excrecencia de neuritas en células de neuroblastoma de ratón. Por lo tanto, sometiendo a ensayo los efectos en la excrecencia de neuritas *in vitro*, se pueden identificar compuestos y formulaciones con efectos neuroprotectores en neuronas bajo estrés crónico, neuronas que experimentan envejecimiento, y neuronas presentes en enfermedades neurodegenerativas.

Los efectos *in vitro* en la excrecencia de neuritas de los diferentes elagitánicos y sus metabolitos punicalagina (PA), punicalina (PB), telimagrandina (TL), ácido elágico (EA), y urolitina (UA), fueron analizados en células de una línea celular de feocromocitoma de rata noradrenérgica (células PC-12), que se han mostrado para se diferencian en respuesta al factor de crecimiento del nervio (NGF) (Greene and Tischler 1976). La excrecencia neurítica en estas células PC-12 diferenciadas ha mostrado que son fuertemente promovidas por dibutiril cíclico AMP (dbcAMP) (Gunning, Landreth et al. 1981), y este compuesto se utilizó como un control positivo. Como un control positivo, se utilizó el inhibidor de cinasa N-terminal Janus (JNK)

específico SP600125, que se ha mostrado que disminuye diferentes parámetros de excrecencia de neuritas (Xiao, Pradhan et al. 2006). Los elagitaninos y sus metabolitos analizados en los ensayos se sintetizaron o compraron de proveedores que incluyen Funakoshi, Sigma, and Chemos. Las soluciones madre se dividieron en alícuotas y almacenaron a -20°C.

Las células PC-12 (ATCC CRL-1721) se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ en matraces de cultivo revestidos con L-lisina en medio de cultivo completo (RPMI 1640 + 10% de suero de caballo inactivado con calor + 5% de suero fetal bovino).

La diferenciación celular se realizó en matraces de cultivo 24 h después de la colocación en placas, en medio completo suplementado con 100 ng/mL NGF (2.5 S NGF, Invitrogen). El medio suplementado con NGF se renovó cada tercer día, y la diferenciación se indujo durante un período de 8 días.

Todos los compuestos a ser analizados se prepararon justo antes del experimento como una solución madre 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración de DMSO final fue 0.1% en el medio de todos los grupos experimentales.

Para las mediciones de excrecencia de neuritas, las células diferenciadas se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS), se colectaron después de la separación y se volvieron a colocar en placas a una densidad de 5,000 células/cavidad (placa de 96 cavidades de imágenes biocoat) en medio completo suplementado con 100 ng/mL de NGF, con o sin 10 µM SP600125 (control negativo), 1 mM dbcAMP (control positivo), o compuesto de prueba a 5×10^{-7} M. En el grupo de control no diferenciado, no se agregó NGF después de

la recolocación en placas.

Después de 72 h en cultivo, las células PC-12 se lavaron con PBS y se fijaron en 1% solución de paraformaldehído por 20 minutos. Después de 3 lavados con PBS, el etiquetado por inmunofluorescencia se realizó con sonda de Maleimida Texas Red, la cual reacciona con los grupos tiol de residuos cisteína de proteínas, permitiendo la visualización de la morfología celular completa, incluyendo neuritas.

El análisis de inmunofluorescencia se realizó en microscopia confocal automatizada. Las imágenes se adquirieron con un sistema de trayectoria 855 BD, bajo objetivo X20 con montaje de campo 8X8. La excrecencia de neuritas luego se midió de las imágenes adquiridas con el módulo de neuritas de software Metamorph®. Se analizaron la excrecencia total y media, número total y medio de procesos por célula, y total y porcentaje de células con excrecencia extensa (definida como excrecencia más larga de 20 μm).

Todos los compuestos, excepto PA y PB, incrementaron el número de células PC-12 en las cavidades por 30%, como se muestra en la **FIG. 6**, indicando un efecto trófico para este compuesto a una concentración de 0.5 μM ($p < 0.001$ para UA, EA, y TL versus control diferenciado (ctrl)).

Promoción de Excrecencia de Neuritas

Como se muestra en la FIG. 7 y FIG. 8, todos los compuestos analizados (PA, PB, TL, EA y UA) fueron capaces de inducir la excrecencia de neuritas robusta de células PC-12 diferenciadas. La excrecencia media (**FIG. 7**) mostró un

incremento de >30% sobre el control diferenciado para todos los compuestos analizados. El porcentaje de células que muestran excrecencia significativa (**FIG. 8**) fue significativamente mayor que aquel observado para las células diferenciadas para todos los compuestos analizados ($p < 0.05$ para UA y PB (26% de incremento), $p < 0.01$ para PA (>26% de incremento), $p < 0.001$ para EA y TL, (>37% de incremento)).

Promoción de la Formación de Proceso y Ramificación

Los compuestos PA, PB, UA, EA, y TL, todos indujeron un incremento del número de procesos cuando se aplicaron a células PC-12 diferenciadas. Los compuestos (UA, $p < 0.05$ (15.7% de incremento); PA, $p < 0.01$ (26.3% de incremento); EA y TL, $p < 0.001$ (>31% de incremento) fueron ya sea tan efectivos como o más efectivos que dbcAMP, el control positivo, en la promoción de la formación de proceso (**FIG. 9**).

La ramificación de neuritas fue significativamente mayor que la observada en el control diferenciado, con la mayoría de los compuestos induciendo un incremento de dos veces en la ramificación.

Ejemplo 6

Ensayo de Selección para Compuestos Que Promueven la Excrecencia de Neuritas en Neuronas Primarias Positivas a TH Dopaminérgica

Las neuronas primarias debido a su estado no transformado, sirven como un buen modelo *in vitro* para los efectos de compuestos en marcadores de diferenciación y plasticidad neuronal, tal como excrecencia neuronal, y

formación de dendritas y procesos. Los efectos de diferentes metabolitos de elagitanino punicalagina (PA), urolitina (UA), ácido elágico (EA), y telimagrandina (TL) en este proceso se examinaron. Los compuestos analizados en los ensayos se
5 compraron de proveedores los cuales incluyeron Funakoshi y Sigma, o se sintetizaron químicamente. Las soluciones madre se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

Los cultivos mesencefálicos primarios se prepararon de embriones de rata E14. El mesencéfalo ventral se
10 diseccionó cuidadosamente y se disoció. Las células luego se colocaron en placas en medio DMEM F12 que contiene 10% suero de caballo inactivado con calor a la densidad de 100,000 células/cavidad (placa de 96 cavidades), con o sin el inhibidor específico de JNK SP600125 (10 µM) (el cual sirvió
15 como un control negativo) o dbcAMP (1 mM) (el cual sirvió como un control positivo), o los compuestos analizados cada uno a la dosis de 0.1 µM.

72 h después de la colocación en placa, los efectos en la excrecencia de neuritas de neuronas positivas a
20 tirosina hidroxilasa (TH) dopaminérgica se midieron a partir de las imágenes adquiridas por microscopía confocal automatizada (objetivo X4, montaje 4X4) y cubriendo la superficie de cavidad completa, y se cuantificaron usando el módulo de excrecencia de neuritas del software Metamorph®.
25 Varios parámetros representativos de excrecencia de neuritas por consiguiente se generaron: se analizaron la excrecencia total y media, número total y medio de procesos por célula, y total y porcentaje de células con excrecencia extensa (definida como excrecencia más larga que 20 µm). Todos los
30 experimentos se realizaron por cuadruplicado.

Promoción de Excrecencia de Neuritas

Como se muestra en las FIGs. 10-16, los compuestos seleccionados en el ensayo de selección de PC-12 anterior también fueron capaces de inducir la excrecencia de neuritas en neuronas mesencefálicas primarias a una concentración de 0.1 μ M. La mayoría de los compuestos fue tan efectivo como dbcAMP en la promoción de la excrecencia por célula ($> 25\%$ de incremento en la excrecencia) como se mide por la excrecencia media por célula mostrada en la **FIG. 10** ($p < 0.001$ para UA, GA, EA, TL vs control). Todos los compuestos analizados se desempeñaron tan bien o mejor que dbcAMP (**FIG. 11**).

Incremento en la Ramificación y Procesos de Neuritas

Todos los compuestos analizados mostraron incrementos significativos en los procesos medios por célula ($> 10\%$) (**FIG. 12**), así como también en la duración de proceso máxima ($> 10\%$) (**FIG. 13**).

Las células primarias mostraron un incremento en la ramificación en la presencia del control positivo (dbcAMP). Sin embargo, el inhibidor de JNK SP600125 no inhibe la ramificación de célula primaria, como en las células PC12, sino fue capaz de promover la ramificación aunque no al mismo nivel como dbcAMP (60% vs 86% de incremento visto para dbcAMP). Los compuestos UA, EA, y TL fueron capaces de promover la ramificación a los mismos niveles como dbcAMP ($> 111\%$ de incremento en la ramificación, **FIG. 14**).

Incrementos en Dendritas por Célula y Longitud de Dendritas

El número de dendritas se incrementó

significativamente para UA, EA, y TL, a niveles arriba de aquellos de dbcAMP, con todos los compuestos mostrando un incremento >18% (**FIG. 15**).

El ácido elágico, urolitina A, y telimagrandina todos produjeron incrementos de longitud dendrítica > 26%, mayores que aquellos observados para dbcAMP (**FIG. 16**).

Ejemplo 7

El Extracto de Granada, Punicalagina, Ácido Elágico, y Urolitina A Reducen la Ganancia de Peso y Masa de Grasa en Ratones Alimentados con una Dieta de Alta Grasa

Se compraron ratones macho C57BL6/J de Charles River Laboratory (L'Arbresle, Francia) a la edad de 7 semanas y se aclimataron a la instalación de animales por 2 semanas antes de la iniciación de los experimentos. Los ratones se alojaron en grupos de 5 en condiciones de alojamiento estándares, con un ciclo de 12 hr de luz y oscuridad y acceso libre a alimento y agua. Comenzando a las 9 semanas de edad, los ratones se alimentaron con una dieta de alta grasa (HFD) (60% kcal de grasa; D12492; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) por catorce semanas. El peso corporal se monitoreó semanalmente.

Los ratones en diferentes grupos de tratamiento se administraron con (i) urolitina A mezclada con alimento (aditivo alimenticio) para alcanzar una dosificación de 55 mg/kg de peso corporal/día (mkd); (ii) ácido elágico mezclado con alimento (aditivo alimenticio) para alcanzar una dosificación de 75 mkd; (iii) punicalagina (sonda) para alcanzar una dosificación de 90 mkd; o (iv) extracto de granada (PE) (sonda) para alcanzar una dosificación de 140

mkd de polifenoles totales. Un extracto de granada típico usado en estos experimentos tuvo la siguiente composición: polifenoles, 140 mkd; punicalagina, 13.1 mkd; y ácido elágico, 13.2 mkd. Para los animales tratados por sonda, la sonda se realizó diariamente (7 días/semana) entre 8:00 y 10:00 a.m.; los compuestos se mezclaron con solución salina (0.9% NaCl) y se proporcionaron a un volumen final de 5 mL/kg de peso corporal. Los ratones en los grupos de control de alta grasa se alimentaron con la misma dieta como los animales experimentales. Los ratones en diferentes grupos de control correspondientes se administraron ya sea con dieta de alta grasa sola o dieta de alta grasa más sonda diaria con vehículo (solución salina). Otro grupo de control de ratones se alimentaron con dieta chow estándar sola.

La composición corporal se monitoreó por EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA) 5 semanas después de la iniciación del tratamiento para ratones alimentados con dieta de alta grasa y 2 semanas después de la iniciación del tratamiento para ratones alimentados con dieta chow. Los animales se colocaron individualmente en un cilindro de plástico y luego se introdujeron en un sistema EchoMRI por aproximadamente 2 min para exploración de composición corporal (masa magra y de grasa).

Los resultados se muestran en las **FIGs. 17 y 18.**

Los ratones alimentados con una dieta de alta grasa (HFD) desarrollaron una severa obesidad en comparación con los ratones de control alimentados con una dieta chow estándar (CD) (**FIG. 17A**). La ganancia de peso corporal en ratones alimentados con alta grasa no tratados estuvo asociada con un incremento en el porcentaje de masa de grasa

(**FIG. 17B**) y una disminución del porcentaje de masa muscular (masa magra) (**FIG. 17C**), ambos medidos por EchoMRI después de 5 semanas de tratamiento. En ratones alimentados con una dieta de alta grasa, el tratamiento con urolitina A (administrada por aditivo alimenticio) o con punicalagina o extracto de granada (PE) (ambos administrados por sonda) previno el comienzo de la obesidad con una fuerte reducción de la ganancia de peso corporal en ratones alimentados con HFD tratados en comparación con los ratones alimentados con HFD de control (**FIG. 17A**). A lo largo de esto, la masa de grasa se redujo significativamente en ratones alimentados con HFD tratados con urolitina A, punicalagina, o PE en comparación con los ratones alimentados con HFD no tratados (**FIG. 17B**).

Los ratones alimentados con una dieta chow estándar y tratados ya sea con ácido elágico o urolitina A también vieron una reducción en la masa de grasa con un incremento concomitante en el músculo (masa magra), ilustrando que estos tratamientos favorecen el manejo del peso y un físico magro o muscular (**FIG. 18B**).

Ejemplo 8

El Extracto de Granada, Punicalagina, Ácido Elágico, y Urolitina A Incrementan la Masa Muscular en Ratones Normales y Obesos

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

Tanto en los ratones alimentados con dieta chow estándar como los ratones alimentados con HFD, el tratamiento con PE, punicalagina, ácido elágico o urolitina A resultó en

un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de masa magra. Los ratones alimentados con una dieta de alta grasa y tratados con urolitina A, punicalagina, o PE vieron una reducción en la masa de grasa con un incremento
 5 concomitante en el músculo (masa magra) (**FIGs. 17B y 17C**). Los ratones alimentados con una dieta chow y tratados ya sea con ácido elágico o urolitina A también vieron una reducción en la masa de grasa con un incremento concomitante en el músculo (masa magra), ilustrando que estos tratamientos
 10 favorecen el manejo de peso y un físico magro o muscular (**FIGs. 18A y 18B**). Puesto que la masa magra es predominantemente representada por la masa muscular, estos resultados ilustran cómo los tratamientos ya sea con PE, punicalagina, ácido elágico o urolitina A resultan en un
 15 incremento en la proporción de la masa muscular tanto en ratones normales como obesos con respecto a la masa corporal total. Esto se observó después tan poco como dos semanas de tratamiento.

20

Ejemplo 9

El Extracto de Granada, Punicalagina, Ácido Elágico, y Urolitina A Incrementan el Gasto de Energía en Ratones

Normales y Obesos

Ratones macho C57BL6/J se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7. Además, sin embargo, el gasto de
 25 energía basal de los ratones se midió por consumo de oxígeno por calorimetría indirecta, producción de dióxido de carbono, y relación de intercambio respiratorio), 8 semanas después de la iniciación del tratamiento para los ratones alimentados
 30 con HFD y 2 semanas después de la iniciación del tratamiento

000141

para ratones alimentados con dieta chow estándar, usando el Sistema de Monitoreo Comprensivo de Animales de Laboratorio (CLAMS; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Los animales primero se aclimataron por 22 h en jaulas de CLAMS (temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) iniciando entre las 11 a 12 am. Luego la medición se realizó por al menos 20 h en la misma condición. La medición incluyó un ciclo de oscuridad completo. Los parámetros medidos durante el CLAMS fueron los siguientes: (i) Consumo de oxígeno (VO_2 en mL/kg/h): VO_2 directamente está correlacionado con el gasto de energía; (ii) producción de dióxido de carbono (VCO_2) en mL/kg/h ; y (iii) Relación de Intercambio Respiratorio (RER): VCO_2/VO_2 : RER es un indicador del uso de sustrato de energía. En un estado estable, la RER es equivalente al Cociente Respiratorio (RQ). El uso de carbohidrato puro produce $\text{RER}=1$, mientras que el quemado de grasa pura produce una $\text{RER}=0.7$. Una dieta mezclada produce una $\text{RER}=0.85$.

Los resultados se muestran en las **FIGs. 19 y 20**.

El consumo de oxígeno es un marcador fisiológico de la actividad mitocondrial y gasto de energía. Los tratamientos ya sea con PE, punicalagina, ácido elágico, o urolitina A redujo significativamente el consumo de oxígeno en ratones. El ácido elágico y urolitina A incrementaron el gasto de energía en ratones alimentados con chow estándar (**FIGs. 19A y 19B**). Este efecto se observó después tan poco como 2 semanas de tratamiento. El tratamiento con extracto de granada (PE), punicalagina, y urolitina A incrementó el gasto de energía en ratones alimentados con HFD (**FIGs. 20A y 20B**).

Ejemplo 10

El Extracto de Granada, Punicalagina, Ácido Elágico, y Urolitina A Incrementan el Uso de Ácidos Grasos Como

5 *Sustratos de Energía en Ratones Normales y Obesos*

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

Como se estableció anteriormente, además del consumo de oxígeno, la calorimetría indirecta también
10 monitorea la producción de dióxido de carbono. La relación entre la producción de dióxido de carbono (VCO_2) y consumo de oxígeno (VO_2) se llama Relación de Intercambio Respiratorio (RER). RER es un excelente indicador del uso de sustratos de energía. En un estado estable, RER es equivalente al Cociente
15 Respiratorio (RQ). Un uso preferencial de los carbohidratos como sustrato de energía produce una RER cercana a 1, mientras que un uso de grasa como sustrato de energía (quema de grasa) produce una RER inferior la cual es cercana a 0.7 cuando se usan preferentemente ácidos grasos.

20 Como se representa en la **FIG. 21** y **FIG. 22**, el tratamiento con PE, punicalagina, ácido elágico, y urolitina A significativamente disminuyó la RER en ratones tanto alimentados con dieta chow como alimentados con HFD. Este efecto fue dramático en los ratones alimentados con dieta
25 chow tratados con ácido elágico y urolitina A (**FIG. 21**).

Estos resultados soportan los cambios de la composición corporal observados después del consumo de PE, punicalagina, ácido elágico o urolitina A los cuales favorecen un físico más muscular (magro) con composición de
30 grasa reducida.

000143

Ejemplo 11

*El Extracto de Granada, Punicalagina, y Urolitina A
Disminuyen los Niveles en Plasma de Triglicéridos y Ácidos
Grasos Libres en Ratones Obesos*

Ratones macho C57BL6/J se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7. Además, la bioquímica de plasma se realizó 14 semanas después de la iniciación del tratamiento usando un analizador de química clínica automatizado estándar (Dimension Xpand, SIEMENS). Los animales estuvieron en ayuno por 12 h (desde las 8pm a 8 am) antes de la recolección de sangre. Aproximadamente 50 µL de sangre se recolectaron de la vena cava en animales anestesiados bajo anestesia con isofluorano. La sangre se recolectó en tubos heparinizados e inmediatamente se colocaron en hielo húmedo. El plasma se preparó por centrifugación (1500 x g, 15 min, 4°C). Las muestras de plasma luego se transfirieron en microtubos de 1.5 mL limpios y se almacenaron a -80°C hasta que se realizaron las mediciones bioquímicas en un analizador de química clínica automatizado estándar (Dimension Xpand, SIEMENS) usando kits correspondientes.

Los niveles circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres se midieron por bioquímica estándar en la sangre de ratones alimentados con HFD de control y tratados (FIG. 23). El tratamiento con PE, punicalagina y urolitina A condujo a un mejoramiento estadísticamente significativo de niveles en plasma de triglicéridos y ácidos grasos libres. Estos resultados indican que el PE, punicalagina, y urolitina A son efectivos en el tratamiento de dislipidemia en ratones

obesos y en consecuencia pueden actuar para mejorar la función cardiovascular y prevenir la enfermedad cardiovascular.

5

Ejemplo 12

La Punicalagina, Ácido Elágico, y Urolitina A Mejoran la Tolerancia a la Glucosa en Ratones Obesos

Ratones macho C57BL6/J se agruparon y trataron como se describe en el Ejemplo 7. Además, la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) se realizó para ratones alimentados con HFD los cuales desarrollaron intolerancia a la glucosa. La prueba de tolerancia a la glucosa se monitoreó 10 semanas después de la iniciación del tratamiento por prueba oral de tolerancia a la glucosa (oGTT). Los animales estuvieron en ayuno por 12h (desde las 8pm a 8am) antes de la oGTT. El día de la oGTT, una pequeña gota de sangre ($< 2 \mu\text{L}$) se recolectó de la vena de la cola lateral y la glucemia se monitoreó usando un glucómetro (AccuCheck Aviva, Roche Diagnosis). Cada animal luego recibió, en el tiempo 0, una dosis oral de D-glucosa a una dosificación de 2 g/kg de peso corporal. La glucemia luego se monitoreó en los tiempos 15, 30, 45, 60, 90, 120, y 150 min después de la carga de glucosa oral.

Como en los humanos, la alimentación de dieta de alta grasa en ratones resultó en el comienzo de la obesidad y diabetes tipo 2 la cual se caracteriza por una severa intolerancia a la glucosa como se valoró por el seguimiento de la glucemia inmediatamente después de una exposición a glucosa (2 g/kg de peso corporal) (Prueba de tolerancia a la glucosa) (**FIG. 24**). Como se representa en la **FIG. 24**, el tratamiento con punicalagina, ácido elágico, y urolitina A

mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con HFD. En consecuencia, estos tratamientos también pueden ser procedimientos terapéuticos efectivos para el tratamiento de diabetes tipo 2.

5

Ejemplo 13

La Urolitina A Incrementa la Función Mitocondrial en C. elegans Envejecidos

Cepas de *C. elegans* se cultivaron a 20°C en placas de agar de medio de crecimiento de nematodos (NGM) sembradas con cepa OP50 de *E. coli*. La cepa usada fue Bristol N2 tipo silvestres proporcionada por el Caenorhabditis Genetics Center (Universidad de Minnesota). La urolitina A se disolvió en DMSO. Los animales se expusieron a compuestos de huevos en placas sembradas con bacterias OP50 vivas. Las placas de control se prepararon con la concentración correspondiente de DMSO (0.1%).

La medición del consumo de oxígeno es un indicador directo de la actividad mitocondrial. El efecto de la urolitina A en la actividad mitocondrial en *C. elegans* envejecidos (10 días de edad) se valoró tratando los *C. elegans* con urolitina A por 10 días de edad adulta, en este tiempo el consumo de oxígeno se midió usando el equipo Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience Inc., North Billerica, MA). 250 *C. elegans* de diez días de edad se utilizaron por condición. Los *C. elegans* se recuperaron de las placas de NGM con medio M9, se lavaron tres veces en 2 mL de M9 para eliminar las bacterias residuales, y se resuspendieron en 500 mL de medio M9. Los gusanos se transfirieron en placas Seahorse estándares de 24 cavidades (#100777-004) (50 gusanos

000146

por cavidad) y el consumo de oxígeno se midió. El consumo de oxígeno basal de los gusanos primero se midió durante 30 minutos a intervalos de 5 minutos (0 min, 5 min, 15 min, 20 min, 25 min y 30 min) con 5 duplicados por intervalo. Las

5 velocidades de respiración se normalizaron al número exacto de gusanos por cavidad determinado después de la terminación del experimento usando un estereomicroscopio. Después de determinar el consumo de oxígeno basal, el consumo de oxígeno no acoplado se midió agregando carbonilcianuro-*p*-

10 (trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP) en el punto de tiempo de 30 minutos al medio para valorar la capacidad máxima de consumo de oxígeno y capacidad máxima mitocondrial. El consumo de oxígeno no acoplado se midió a intervalos de 5 minutos (35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min y 60 min)

15 para permitir la medición de la función mitocondrial con el tiempo. La FCCP es un agente de no acoplamiento químico que suprime el enlace obligatorio entre la cadena respiratoria y el sistema de fosforilación el cual se observa con mitocondrias intactas. El efecto es debido a las propiedades

20 anfipáticas de la molécula la cual se disuelve en bicapas de fosfolípidos mitocondriales. Esto incrementa dramáticamente la permeabilidad iónica de la membrana mitocondrial y genera fuga de protones dramática que conduce al incremento del consumo de oxígeno debido al enfriamiento por oxígeno de los

25 electrones bombeados en la cadena respiratoria en paralelo con la fuga de protones. Puesto que este consumo de oxígeno se disocia (no acoplado) a la producción de ATP (fosforilación oxidativa), la FCCP incrementa el consumo de oxígeno mientras disminuye la generación de energía (ATP) por

30 las mitocondrias. Las mitocondrias completamente no

acopladas, como se logra con FCCP, exhiben la capacidad máxima de su cadena respiratoria mitocondrial (consumo máximo de oxígeno) sin la "rotura" que la fosforilación oxidativa y producción de energía representa).

5 Los resultados representado en la **FIG. 25** ilustran que la urolitina A incrementa la capacidad máxima mitocondrial de *C. elegans* envejecidos, como se representa por un efecto prolongado en la respiración no acoplada incrementada en gusanos tratados con urolitina A versus
10 gusanos tratados con control (DMSO). Los gusanos no tratados de control mostraron un breve incremento en la respiración no acoplada la cual rápidamente regresó a los niveles basales del consumo de oxígeno. Los gusanos tratados con urolitina A mostraron una elevación más prolongada de consumo de oxígeno.
15 El grado de actividad mitocondrial mejorada se muestra comparando el área bajo las curvas (AUC) durante el período de desacoplamiento con la respiración acoplada promedio empleada como el valor basal. Se observó que la urolitina A incrementó significativamente la respiración no acoplada en
20 gusanos envejecidos en comparación con los gusanos no tratados de control durante el período de 30 minutos evaluado.

Ejemplo 14

25 *La Urolitina A Incrementa la Actividad Mitocondrial en C. elegans*

Cepas de *C. elegans* se cultivaron a 20°C en placas de agar de medio de crecimiento de nematodos sembradas con bacterias HT115 y que contienen 50 µM urolitina A o una
30 concentración correspondiente de DMSO como un control. Los

gusanos se trataron por 24 horas. Las cepas utilizadas fueron la SJ4103 (zcIs14[myo-3::GFP(mit)]), la cual es una línea transgénica estable que expresa una proteína fluorescente verde (GFP) mitocondrialmente localizada con un péptido señal de importación mitocondrial escindible bajo el control del promotor *myo-3* de músculo de pared corporal específico. La cuantificación y expresión de GFP se realizó de acuerdo con el protocolo previamente descrito (Durieux et al., 2011). Los gusanos se trataron con 50 μ M urolitina A de huevos, y la GFP se monitoreó después de un día de edad adulta. Los ensayos fluorimétricos se realizaron usando un lector de placa de etiquetas múltiples Victor X4 (Perkin-Elmer Life Science). Ochenta gusanos se eligieron al azar (20 gusanos por cavidad de una placa de 96 cavidades de pared negra) y cada cavidad 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 reportero de GFP mitocondrial impulsada por el promotor *myo-3* específico de músculo en *C. elegans*. Este impresionante incremento de la expresión de GFP proporciona evidencia clara que la capacidad mitocondrial incrementó debido a la urolitina A. Para permitir tal incremento en la señal de GFP observada, las mitocondrias en el músculo ya sea deben ser alargadas o más numerosas en estos gusanos.

25

Ejemplo 15

Efectos de los Compuestos Derivados de Granada en el Estado de Ánimo y Cognición en Respuesta al Estrés Crónico

Ratones macho tipo silvestre C57BL/6J de 7 semanas de edad se expusieron a estrés no predecible crónico por un

30

período de cuatro semanas. Diversos experimentos de comportamiento se realizaron antes, durante, y después del período de estrés crónico para determinar el impacto en el estado de ánimo y cognición. Como previamente se ha reportado, el estrés crónico impacta negativamente en el estado de ánimo y cognición. Los compuestos naturales derivados de granada se administraron a estos ratones para determinar qué impacto tendrían estos compuestos en el alivio de este impacto negativo en el estado de ánimo y cognición.

Los ratones fueron habituados a la instalación de animales por 9 días antes del comienzo de los experimentos. Todos los ratones fueron alojados en grupos de tres en jaulas de plástico estándares, y se mantuvieron bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (7:00 a.m. - 7:00 p.m.) con acceso *ad libitum* a alimento y agua. Todos los procedimientos realizados se llevaron a cabo de conformidad con las Pautas Institucionales Nacionales Suizas sobre Experimentación en Animales y se aprobaron por el Comité Oficial de Veterinaria Cantonal Suizo para Experimentación en Animales.

Caracterización de Animales

Después de la adaptación a la instalación de animales, todos los ratones se caracterizaron en términos de peso corporal, comportamiento tipo ansiedad, en el laberinto en cero elevado (EZM), y locomoción y exploración en los ensayos de nuevo objeto y campo abierto. El objetivo de estos experimentos fue igualar los animales de acuerdo con su ansiedad y velocidades de exploración para establecer los grupos experimentales y de control que son equivalentes de acuerdo con estos rasgos.

Laberinto En Cero Elevado

La ansiedad se midió en un laberinto en cero elevado (EZM). Los ratones se observaron por 5 min en el EZM (un camino anular de 5.5 cm de ancho con un diámetro de 46 cm y elevado 46 cm arriba del suelo) bajo condiciones de luz tenue y dispersa. Dos sectores de 90° opuestos se protegieron por paredes interna y externa de 13.5 cm de alto. Por consiguiente, tres zonas fueron definidas como sigue: una zona intermedia que comprende cuatro segmentos de 30° en los extremos de las paredes de protección separados por las dos zonas anchas cerradas/protegidas de 50° y las dos zonas de exploración anchas abiertas/no protegidas de 70°. Con estos límites, las entradas en los sectores abiertos se detectaron solamente cuando el animal entró en ellos con todas las cuatro patas. Las trayectorias de cada ratón se registraron automáticamente por seguimiento por vídeo (Ethovision 3.0, Noldus, Wageningen, Países Bajos). El número total de entradas en todos los sectores sirvió como un indicador de la actividad locomotora espontánea, mientras que las diferencias en el número de entradas y el tiempo consumido en los sectores abiertos se tomaron como indicadores de ansiedad. Entre las sesiones el laberinto se limpió con 4% etanol/agua.

25 Campo Abierto y Nuevo Objeto

La locomoción y reactividad a un campo abierto (OF) se valoraron en una caja cuadrática blanca (50 x 50 x 37 cm) bajo condiciones de luz tenue y dispersa. El ratón se colocó en el centro del campo y se dejó moverse libremente durante 10 min. La distancia total movida, frecuencia de entradas al

centro, tiempo y porcentaje de tiempo en el centro del OF se analizaron. La evitación del área interior o "no protegida" del campo se interpreta como un comportamiento tipo ansiedad. Las mediciones de la distancia total se usan como un índice de actividad. El comportamiento exploratorio se valoró usando la prueba de nuevo objeto (NO). La prueba de NO se realizó inmediatamente después de la prueba de OF. Un objeto metálico pequeño (3 x 1.5 x 5 cm) se colocó en el centro del campo abierto mientras el ratón estuvo adentro. Luego a los ratones se les dieron 5 min para explorar libremente el nuevo objeto. El tiempo consumido en el centro y la periferia del compartimiento, número y latencia de entradas al centro, y distancia total movida en el centro y compartimiento completo se analizaron. El porcentaje de tiempo y distancia que el ratón consumió en el centro, explorando el nuevo objeto, se consideraron como indicadores de actividad exploratoria "enfocada".

Tratamiento con Extracto Derivado de Granada

Tres semanas antes de la iniciación del protocolo de estrés crónico los ratones se separaron en cuatro grupos diferentes. Un grupo recibió dieta chow de ratón estándar (Control), mientras que los tres grupos restantes recibieron dosis variadas de extracto 1011, un extracto derivado de jugo de granada. La dosis baja correspondió a una dosis de extracto de 21 mg/kg/d de equivalentes de ácido gálico de polifenoles (GAE PPE), la dosis media correspondió a una dosis de extracto de 43 mg/kg/d de GAE PPE, la dosis alta correspondió a una dosis de extracto de 86 mg/kg/d de GAE PPE (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Extracto de Granada en Polvo 1011.

Extracto 1011	Polifenoles	Punicalagina	Punicalina	Ácido Elágico
Dosis Baja	21 mg/kg/d	2.1 mg/kg/d	5.2 mg/kg/d	2.0 mg/kg/d
Dosis Media	43 mg/kg/d	4.2 mg/kg/d	10.5 mg/kg/d	3.9 mg/kg/d
Dosis Alta	86 mg/kg/d	8.5 mg/kg/d	21 mg/kg/d	7.8 mg/kg/d

El tratamiento con la dieta comenzó tres semanas antes de la iniciación del 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 la iniciación del protocolo de estrés crónico, los ratones se separaron en dos grupos. Un grupo recibió dieta chow de ratón estándar (Control), mientras que el otro grupo recibió una dieta que contiene urolitina A, suministrada a una dosis de 25 mg/kg/d.

Estrés Crónico No Predecible

El protocolo de estrés crónico no predecible involucró la exposición de animales a una situación estresante diaria en un momento no predecible por 4 semanas (entre las 8 am y 4 pm, y se distribuyeron aleatoriamente durante los 28 días). Los estímulos de estrés usados fueron cualquiera de: 6 min de suspensión de la cola; descarga en la pata ineludible 3 x 0.4 mA; 4 h de exposición a aserrín húmedo sucio; 2 h de exposición en una plataforma elevada; 1 h de inmovilización en un tubo de plástico; 30 min de

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

10

Ensayos de Comportamiento

Prueba de suspensión de cola

La prueba de suspensión de cola (TST) se utilizó como un modelo para valorar la actividad tipo antidepresiva en ratones. La prueba se basa en el hecho que los animales sometidos al estrés ineludible de corto plazo (6 min.) de ser suspendidos por su cola, desarrollarán una postura inmóvil. El ratón se colgó en una barra metálica por una cinta adhesiva colocada 20 mm desde la extremidad de su cola. La distancia entre el piso y la barra fue aproximadamente 25 cm. La inmovilidad se define como la ausencia de movimientos iniciados e incluye balanceo pasivo. El tiempo de investigación, el cual incluyó inmovilidad, lucha y escalada, se registró de la cinta de vídeo.

Como se muestra en la **FIG. 27**, el estrés crónico resultó en una inmovilidad incrementada en la TST, un indicador del sentido de impotencia y depresión incrementada. Sin embargo, los ratones tratados con dosis incrementadas de extracto de granada demostraron una inversión en este patrón y una restauración de movilidad y lucha a niveles observados

en ratones no estresados. Por consiguiente el extracto de granada previene la respuesta de depresión observada en ratones no tratados crónicamente estresados.

5 *Reconocimiento Contextual*

El acondicionamiento a miedo contextual es una medición de una capacidad del animal para recordar un contexto particular. En este ensayo, los ratones se colocaron en una caja y luego recibieron dos descargas leves un minuto
10 aparte. En la reacción a las descargas los ratones se inmovilizaron. La capacidad de los ratones para reconocer el contexto en el cual recibieron la descarga se probó colocándolos de nuevo en la caja en un punto de tiempo más tarde. Si reconocen el contexto, los ratones se inmovilizarán
15 con anticipación a la recepción de una descarga.

En ratones normales, la capacidad de reconocer el contexto en la ausencia de cualquier descarga es una medición de la memoria contextual. Los ratones con mejor memoria contextual reconocen mejor el contexto inicial y por
20 consiguiente tienen un mayor nivel de inmovilización.

Este ensayo también se puede usar para medir la ansiedad en ratones estresados. En ratones estresados, la ansiedad incrementada se podría observar en el tiempo de reacción de inmovilización incrementada en respuesta a las
25 descargas iniciales, así como también un período de extinción más largo para la memoria del contexto.

La extinción de la memoria contextual se midió colocando el ratón en el mismo contexto una vez al día por varios días en la ausencia del estímulo adverso inicial. Con
30 el tiempo los ratones desaprendieron la asociación del

contexto con el estímulo adverso, que es evidenciada por una disminución gradual en la inmovilización. En ratones estresados que están ansiosos esta extinción de la memoria adversa toma más tiempo.

5 El acondicionamiento de miedo contextual se utilizó para probar el efecto del extracto de granada en la inducción de ansiedad (es decir, ansiedad aprendida) en ratones en respuesta al reconocimiento contextual. El entrenamiento y prueba toman lugar en una cámara de acondicionamiento de
10 roedores (20 x 20 x 28 cm), colocada en una caja de plexiglás y se iluminó por un foco de 20 W. Las paredes laterales de la cámara de acondicionamiento se construyeron de metacrilato blanco, y la puerta y la cubierta superior se construyeron de plexiglás. El piso consistió de 20 barras de acero a través
15 de las cuales una descarga desordenada de un generador de descargas se podría suministrar. Los ventiladores de ventilación proporcionan un ruido de fondo de 68 dB (sistema completo: Panlab, S.L., Barcelona, España). El acondicionamiento de miedo al contexto se realizó durante la
20 tercera semana del protocolo de estrés crónico en el grupo estresado. En el día del acondicionamiento de miedo, los ratones se transportaron desde el cuarto de la colonia al laboratorio de comportamiento adyacente y se colocaron en la cámara de acondicionamiento. El entrenamiento consistió de
25 exposición de los ratones a un contexto de acondicionamiento por 3 min seguido por tres descargas eléctricas en las patas (2 seg, 0.4 mA) suministradas después de cada min. Después de la última descarga en la pata el animal permaneció por 30 s en la cámara. La cámara de acondicionamiento de miedo se
30 limpió completamente con 0.5% ácido acético antes de que cada

ratón se colocará en la caja. Para determinar el efecto del estrés crónico y las diversas dosis de extracto de granada en el nivel de ansiedad inducida por esta memoria contextual, se midió el nivel de comportamiento inducido por ansiedad en respuesta a este contexto. Las siguientes respuestas de comportamiento, conocidas por ser sensibles a los niveles de ansiedad, se examinaron: % de inmovilización, % de erguido, y % de acicalamiento. Estas mediciones de comportamiento se realizaron 48 h más tarde después de la re-exposición de los ratones al contexto de acondicionamiento por 8 min. Después de las sesiones de prueba y entrenamiento, los animales fueron inmediatamente regresados a sus jaulas domésticas. El comportamiento de los animales se registró y más tarde se clasificó con software de observación de comportamiento hecho en casa por un observador ciego al tratamiento de los animales.

La inmovilización, definida como una falta de movimiento excepto de la respiración y latidos del corazón, se registró y utilizó como un índice de ansiedad. El tiempo de inmovilización se transformó a porcentaje de niveles de inmovilización. El extracto de granada mostró una respuesta dependiente de la dosis, con una reducción significativa en el % de inmovilización a la dosis más alta (**FIG. 28**), indicando una protección contra la ansiedad. La reducción similar en el comportamiento de ansiedad se ve en el erguido, con una protección dependiente de la dosis y significativa del comportamiento de erguido en la administración del extracto de granada (**FIG. 29**). La terminación de estas observaciones es la fuerte supresión de inhibición inducida por ansiedad de acicalamiento por la dosis más alta de

extracto de granada (**FIG. 30**).

Estos resultados demuestran que el extracto de granada y compuestos reducen la ansiedad inducida por experiencia en ratones.

5 Esta disminución de la ansiedad inducida por experiencia en ratones crónicamente estresados también se observó para la urolitina A, un metabolito de punicalagina. En este estudio, los niveles de ansiedad se midieron por la extinción de memoria del contexto adverso proporcionado en el
10 ensayo de miedo contextual descrito anteriormente. En este estudio los ratones que han sufrido entrenamiento usando el paradigma de miedo contextual se exponen a este contexto diariamente por cuatro días pero en la ausencia de cualquier estímulo adverso. La capacidad de reconocer el contexto se
15 mide por inmovilización durante un período de 3 minutos de observación. Se ha mostrado que los niveles incrementados de ansiedad conducen a un período más largo para extinción para la memoria de un contexto adverso. Como se muestra en la **FIG. 31**, los ratones que han sufrido estrés crónico mostraron un
20 período menor de extinción que los ratones normales. Sin embargo, en el tratamiento con urolitina A a una dosis de 25 mg/kg/d, los ratones que han sufrido estrés crónico mostraron un mejoramiento significativo en la extinción de memoria adversa, demostrando que la urolitina A, como punicalagina,
25 es capaz de reducir la ansiedad en ratones que han sufrido de estrés crónico.

Laberinto de Agua de Morris

La memoria espacial y aprendizaje se afectan por el
30 estrés crónico. El aparato de laberinto de agua de Morris

consistió de una piscina circular blanca grande (140 cm de diámetro) llenada con agua de color opaco ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y con una plataforma ($10 \times 10 \text{ cm}^2$) sumergida 1 cm bajo la superficie del agua. El laberinto de agua se rodea por
5 cortinas grises (25 cm desde la periferia de la piscina) que contienen diversas pistas visuales prominentes. Antes de la prueba el ratón se entrenó para aprender la ubicación de la plataforma. Utilizando las pistas visuales prominentes, el ratón aprende a ubicar la plataforma. La fase de aprendizaje
10 comienza con una fase de habituación en la cual los ratones se introducen al cuarto, aparato, y el agua dándoles un ensayo de nado libre de 2 min sin la plataforma presente. Los datos se colectaron usando una cámara de vídeo fijada al techo, conectada a un sistema de seguimiento de vídeo
15 (Ethovision 3.0, Noldus, Wageningen, Países Bajos).

Después de una sesión de habituación (día 0), los ratones se sometieron a diferentes protocolos para valorar consecutivamente sus capacidades de aprendizaje espacial (días 1-3). Las sesiones de aprendizaje espacial se
20 condujeron en tres días consecutivos (días 1-3), realizando cuatro ensayos por día con un intervalo inter-ensayo (ITI) de 6 min entre cada ensayo.

Cada ensayo inició introduciendo el ratón en el laberinto con la ayuda de una taza, enfrentando la pared de
25 la piscina, y en una de cuatro posiciones posibles que fueron equilibradas aleatoriamente entre los ensayos y días. La distancia entre el ratón y la plataforma se midió en cada tiempo de muestreo, con 25 tiempos de muestreo colectados por segundo. Estas distancias luego se sumaron para el período de
30 60 segundos, para producir una medición de la distancia a la

plataforma (cm) para cada ensayo. Si un ratón no encuentra la plataforma dentro de 60 seg, se guió poco a poco hacia ella. Cada ratón tuvo que permanecer en la plataforma por 20 seg antes que regresara a su jaula de espera.

5 Los resultados de este ejemplo demostraron que el estrés crónico tuvo un impacto negativo significativo en el aprendizaje y memoria espacial. Durante la sesión de entrenamiento hubo un incremento significativo en la distancia viajada para alcanzar la plataforma en comparación
10 con el control no estresado, mostrando que el estrés crónico deteriora la memoria normal que forma durante el aprendizaje (**FIG. 32**). El tratamiento de los ratones con extracto de granada fue capaz de proteger contra estos efectos negativos de estrés crónico en el aprendizaje y memoria asociada. Un
15 efecto dependiente de la dosis se observó en ratones que recibieron el extracto de granada, y los ratones crónicamente estresados tratados fueron capaces de realizarlo a los mismos niveles de controles no estresados (**FIG. 33**).

Un efecto similar se observó para ratones tratados
20 con urolitina A, como se muestra en la **FIG. 34**. Los ratones que han sufrido el protocolo de estrés crónico mostraron aprendizaje errático, como se evidencia por la alta variabilidad entre los ensayos secuenciales. El tratamiento de ratones crónicamente estresados con urolitina A a una
25 dosis de 25 mg/kg/d mostró una estabilización de esta variabilidad. Esto resalta el hecho que la urolitina A, un metabolito cadena abajo de punicalagina, también es capaz de proteger contra estos efectos negativos de estrés crónico en cognición, incluyendo aprendizaje y memoria.

30 En resumen, estos resultados conjuntamente

demuestran que el extracto de granada y compuestos derivados tal como urolitina A son capaces de actuar para reducir los impactos negativos de estrés crónico en cognición, incluyendo memoria y aprendizaje. Adicionalmente, el extracto de granada y compuestos derivados tienen actividad anti-depresiva como se ve en la prueba de suspensión de cola, y disminuyen la ansiedad causada por el estrés crónico. Los resultados también demuestran que el extracto de granada previene el deterioro del funcionamiento de memoria y aprendizaje y reconocimiento espacial normalmente observado después del estrés crónico.

Ejemplo 16

Efecto en la Memoria y Cognición en el Modelo de Rata Envejecida

Durante el envejecimiento hubo diversos efectos en la cognición y memoria, que se pueden recapitular en el modelo de rata de envejecimiento. Para una revisión ver Gallagher and Rapp (1977) *Annu Rev Psychol.* 48:339-70. El modelo de rata envejecida se ha usado extensamente para caracterizar los efectos del envejecimiento de la memoria y cognición. En los experimentos presentados aquí, se observó funcionamiento mejorado en la presencia de extracto de granada.

Ratas Sprague-Dawley envejecidas (comenzando en 19 meses de edad) recibieron extracto de granada (1108) en su agua para beber, a una concentración de 0.34 mg/mL de polifenoles (PPE). El contenido de polifenoles se midió usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, con el contenido fenólico expresado como equivalentes de ácido

gálico. El tratamiento de control consistió de 1.36% sacarosa, 0.12% D-glucosa, y 0.12% D-fructosa disuelta en agua. Las ratas en promedio consumieron 30 mL/día tanto de control como tratamientos 1108 (ver **Tabla 6**), con un peso promedio 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 animales que recibieron el extracto 1108.

Tabla 6. Extracto de granada líquido.

	Extracto 1108
Dosis de polifenoles suministrada	15 mg/kg/d
Dosis de punicalagina suministrada	1.11 mg/kg/d

Después de 2.5 meses de tratamiento, la memoria de trabajo de corto plazo se evaluó usando una tarea de reconocimiento social, una prueba estándar que involucra la cognición social. Thor and Halloway (1981) *Animal Learning Behavior*. 9:561-5. En esta tarea, cada rata envejecida se colocó en su jaula doméstica conjuntamente con una rata Sprague-Dawley macho juvenil (<5 semanas de edad) por 5 minutos. Treinta minutos más tarde, el mismo procedimiento exacto se repitió con el mismo juvenil para determinar una segunda vez el grado de interacción entre los dos animales. Se espera menos contacto en la segunda interacción, cuando los dos animales han tenido una interacción previa. Esta disminución de contacto entre los animales es una medición del funcionamiento cognitivo y retención de memoria. Treinta minutos más tarde, una nueva rata juvenil se colocó por 5 minutos junto con la rata envejecida, para medir si el animal

puede discriminar entre los dos individuos juveniles diferentes. Durante cada período de contacto entre los dos animales, el tiempo total de contacto se midió para valorar la intensidad de interacción social.

5 Los resultados se muestran en la **FIG. 35**. Los animales envejecidos tratados con control no mostraron preferencia para el objeto familiar y consumieron tiempo igual explorando ambos objetos, un efecto que se ha mostrado previamente en ratas envejecidas y se piensa que refleja una
10 declinación de la memoria de orden temporal durante el envejecimiento. Hauser et al. (2009) *Behav Neurosci.* 123:1339-45. Sin embargo, las ratas tratadas con extracto 1108 mostraron una disminución en el consumo de tiempo con el mismo juvenil durante el segundo período de exposición, así
15 como también un incremento en el tiempo de interacción con una nueva rata juvenil. Esta diferencia observada ilustra el beneficio protector del extracto 1108 en la retención y desarrollo de memoria.

20

Ejemplo 17

Efecto en la Memoria Espacial en Modelo de Rata Envejecida

También se ha reportado que la memoria espacial es afectada por el envejecimiento, con una declinación del
25 funcionamiento resultante del envejecimiento. Bergado et al. (e-pub Octubre 29, 2010) *Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral analysis. Neuroscience*. Para examinar los efectos del extracto de granada en la declinación de memoria espacial durante el envejecimiento, ratas Sprague-Dawley
30 envejecidas (comenzando a 19 meses de edad) se trataron con

000163

extracto de granada 1108 o control en su agua para beber como se describe para el Ejemplo 16.

Las ratas envejecidas se trataron con el extracto 1108 o un control isocalórico por tres meses, después de lo cual su funcionamiento de memoria y aprendizaje se evaluaron usando la tarea de laberinto de agua de Morris, descrita en el Ejemplo 15.

Las capacidades de aprendizaje de cada animal se evaluaron mediante su funcionamiento en las diversas tareas (tres ensayos). En esta tarea primero se les enseñó a los animales la ubicación de la plataforma en cuadrante (OESTE) mediante tres ensayos de entrenamiento. La ubicación de la plataforma luego se cambió y se colocó en el cuadrante opuesto (ESTE). Los animales sufrieron tres nuevas sesiones de entrenamiento para aprender la nueva ubicación de la plataforma. El esfuerzo para determinar la nueva ubicación de la plataforma, como se midió por la distancia viajada antes de la ubicación de la plataforma, se midió. Los resultados se muestran en la **FIG. 36**. Los animales tratados con el extracto fueron significativamente más eficientes en la localización de la plataforma en la prueba inversa (ANOVA de una vía, $P < 0.02$; control N=11; PJ: N=13; extracto: N=14), demostrando un beneficio terapéutico del extracto administrado para este aspecto de memoria espacial.

Ejemplo 18

Efectos de los Compuestos Derivados de Granada en la Memoria Espacial y de Trabajo en Enfermedad de Alzheimer

Se ha mostrado que la enfermedad de Alzheimer (AD) tiene efectos perjudiciales en la memoria espacial, un efecto

000164

que también se observó en modelos de ratón con AD de la enfermedad. Para determinar los efectos de los compuestos derivados de granada en el alivio de la memoria espacial y de trabajo en AD, varios extractos de granada y punicalagina se probaron en dos ensayos de comportamiento de memoria espacial, el laberinto en Y y el laberinto de agua de Morris.

Laberinto en Y

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

Para determinar el efecto de los compuestos derivados de granada, un extracto de granada (PE) derivado de granada completa se suministró por sonda a una dosis de 60 mg/kg/d de polifenoles, la cual incluye aproximadamente 5.6 mg/kg/d de punicalagina. Los ratones fueron alimentados por sonda 3 veces a la semana comenzando en 3 meses de edad hasta el final del tratamiento. Los ratones se analizaron después de 7 meses de edad para los efectos de PE en la memoria de trabajo en el laberinto en Y. Los ratones se colocaron en el laberinto en Y por 15 minutos y se les permitió explorar dos brazos, el tercer brazo estando cerrado. Cuatro horas más tardes, el animal se colocó de nuevo en el laberinto por cinco minutos, este tiempo con el tercer brazo abierto, permitiendo que el ratón tenga la posibilidad de explorar

libremente todos los tres brazos. La actividad de exploración en el nuevo brazo valoró la capacidad del animal para reconocer que esta zona particular no se ha explorado aún, de acuerdo con las pistas espaciales. Los ratones se registraron como haciendo una alteración correcta durante la exploración si exploraron cada uno de los tres brazos, y no solo los primeros dos presentados.

Como se muestra en la **FIG. 37**, un mejoramiento significativo en el funcionamiento de memoria de trabajo como se mide por el número de alteraciones correctas, se observó en ratones 5XFAD tratados con PE.

Laberinto de Agua de Morris

Los extractos de granada 31008, 61109 y 71109 se analizaron en un segundo modelo de animal transgénico de enfermedad de Alzheimer que expresa tanto mutaciones de mutante London amiloides como la mutación humana de prenililina-1. Los animales en este modelo desarrollan placas por 4 meses de edad y déficits de memoria por 6 meses. La carga de placa densa es visible después de 7 meses.

En un conjunto de experimentos, ratones transgénicos APP-PS1 de cuatro meses de edad se alimentaron con una dosis fija de aproximadamente 97 mg de polifenoles totales/kg/día, la cual incluye aproximadamente 15 mg/kg/d de punicalagina del extracto 31008, el cual se deriva de granada completa, vía su agua para beber. En un conjunto de experimentos, ratones transgénicos APP-PS1 de cuatro meses de edad se alimentaron con una dosis fija de aproximadamente 468 mg de mg total/kg/día del extracto 61109, el cual se enriqueció altamente para punicalagina (>91%), vía el agua.

para beber. En un conjunto de experimentos, ratones transgénicos APP-PS1 de cuatro meses de edad se alimentaron con una dosis fija de aproximadamente 180 mg de polifenoles totales/kg/día del extracto 71109, el cual se derivó de cáscara de granada, vía agua para beber. Después de 3 meses de alimentación, los ratones (luego de 7 meses de edad) se analizaron en la prueba espacial de laberinto de agua de Morris.

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

Veinticuatro horas más tarde del final del entrenamiento, cada animal se sometió a un ensayo de sonda con la plataforma removida. Se dejó que los ratones buscaran la plataforma ausente por 60 segundos y se midió el tiempo de búsqueda consumido en cada cuadrante de la piscina, así como

también el número de cruces de la posición original de la plataforma. Como se muestra en la **FIG. 38**, los ratones alimentados con el Extracto 31008 mostraron un funcionamiento incrementado en la prueba de sonda como se demuestra por la frecuencia incrementada de cruces del área donde la plataforma se ubicó formalmente.

Los ratones alimentados con los extractos 61109 y 71109 aún tuvieron mejor funcionamiento.

Las composiciones del extracto 61109 usado en este experimento se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7.

	Extracto 61109
Punicalagina	91.3 % (p/p)
Dosis de punicalagina suministrada	295 mg/kg/d

Ejemplo 19

Efectos de los Compuestos Derivados de Granada en la Depresión, Ansiedad y Cognición en Respuesta al Estrés a Edad Temprana

Los compuestos derivados de granada se valoraron por su capacidad de mejorar las funciones cerebrales, incluyendo cognición, depresión y ansiedad, en un modelo de estrés a edad temprana asociado con separación maternal.

El estrés a edad temprana tiene un impacto significativo en el funcionamiento cognitivo en la vida adulta más tarde, incluyendo (i) incremento de la toma anormal de decisiones y excesiva toma de riesgos; (ii) susceptibilidad a las tasas incrementadas de depresión y ansiedad; y (iii) memoria y aprendizaje deteriorado.

Todos los procedimientos realizados fueron llevados

a cabo de conformidad con las Pautas Institucionales Nacionales de Suiza en Experimentación en Animales y se aprobaron por el Comité Oficial de Veterinaria Cantonal Suizo para Experimentación en Animales.

5

Estrés a edad temprana producido por separación maternal

En el día 1 postnatal, los cachorros fueron sacrificados para tener 6 cachorros por madre. Desde el día postnatal 1 a 14, se realizó la separación material (MS) no predecible de un período de 3 horas al día. La separación maternal se realizó en tiempos aleatorios (desde las 8 am a 2 pm) para evitar la habituación de la madre al procedimiento. El protocolo consistió de remover cachorros de su madre a otra jaula a temperatura ambiente por un período de 3 horas, después de esto los cachorros se regresaron a su nido original. Estos grupos se denotaron como estrés a edad temprana en las figuras. Un grupo de control de madre/cachorros se dejó sin interrumpir y se denoto en las figuras como normal.

20

Tratamiento con punicalagina aislada de la granada

Una semana después de la separación material los ratones se separaron en dos grupos. Un grupo de control recibió la dieta chow de ratón estándar (No tratado), mientras que el otro grupo recibió el elagitanino punicalagina mezclada en el alimento y se diseñó para administrar una dosis de 90 mg/kg/día a los ratones. El tratamiento con la dieta comenzó 1 semana después de la terminación del tratamiento de separación maternal.

30

000169

Ensayos de Comportamiento

Los efectos del estrés a edad temprana en la depresión, ansiedad y cognición se examinaron utilizando los siguientes ensayos de comportamiento los cuales se realizaron 166 días después de la terminación del protocolo de separación material. Los ratones normalmente criados se compararon contra los ratones maternalmente separados (estrés a edad temprana) y los ratones maternalmente separados tratados con punicalagina.

Prueba de Caja con Oscuridad/Luz

En este ensayo los ratones se colocaron en una caja de PVC la cual se separó en dos compartimientos: un compartimiento oscuro (15 x 20 x 25 cm, PVC negro, y cubierto arriba) y un compartimiento iluminado (30 x 20 x 25 cm, PVC blanco e iluminado a 200 lux), ambos enlazados por una puerta de interconexión (5 x 5 cm) (Ligna, Paris, Francia). El experimento se inició colocando el animal en el compartimiento oscuro, después de lo cual una cámara graba por un período de 5 minutos la cantidad de tiempo que el ratón consume en el área iluminada, el número de transiciones del área oscura a iluminada, y la latencia para escapar del área oscura a iluminada.

Normalmente, los ratones evitarán el área iluminada en la caja. Los ratones maternalmente separados consumieron un tiempo anormalmente largo en el compartimiento iluminado en comparación con sus camadas no maternalmente separadas como una consecuencia de su estrés a edad temprana (**FIG. 39**).

Este incremento en el tiempo consumido explorando el área iluminada refleja un comportamiento deteriorado de

toma de decisiones caracterizado por la toma de riesgos anormal y excesiva.

El tratamiento con punicalagina de ratones maternalmente separados invirtió y normalizó el comportamiento de toma de riesgos excesiva observado y restauró el proceso de toma de decisiones a normal (**FIG. 39**).

Laberinto en O Elevado (EOM)

Otro ensayo de comportamiento que mide la toma de riesgos animal es el laberinto en O elevado (EOM). En este ensayo un aparato que consiste de un anillo con un diámetro de 41.5/46.5 cm (diámetro interno/externo) se divide en cuatro partes iguales. Dos partes del anillo, opuestas entre sí, se encierran por paredes que son de 5 cm de alto. Las dos partes restantes del anillo no tienen paredes. El laberinto se eleva 1 m arriba del piso. La tendencia natural de los ratones es evitar superficies abiertas y consumir más tiempo en las regiones cerradas del anillo que tienen las paredes de 5 cm, como lo opuesto a las regiones abiertas del anillo.

Para examinar el efecto del estrés a edad temprana, los ratones se colocaron en la entrada de una de las áreas del laberinto con las paredes de 5 cm, con la nariz enfrentando el brazo cerrado, y se dejó que exploraran el EOM por 5 min. Durante este período el comportamiento animal se grabó en vídeo. El tiempo consumido en cada brazo (cerrado versus abierto) se calculó, con una entrada en el brazo solo siendo considerado que ha ocurrido cuando el animal colocó todas las cuatro patas en el brazo.

Normalmente, los ratones colocados en el laberinto en O elevado evitarán las regiones abiertas del anillo y

000171

consumirán tiempo limitado explorando esta área. Los ratones estresados por separación material consumieron un tiempo anormalmente largo en las secciones abiertas del laberinto en 0 en comparación con sus camadas no estresadas (**FIG. 40**).

5 Como también se observó en la prueba de caja con oscuridad/luz, esta refleja un comportamiento deteriorado de toma de decisiones en ratones estresados a edad temprana que se caracteriza por toma de riesgos anormal y excesiva.

10 El tratamiento con punicalagina de ratones maternalmente separados invirtió y normalizó su comportamiento de toma de riesgos excesivo anormal debido al estrés a edad temprana (**FIG. 40**).

Prueba de Nado Forzado

15 La Prueba de Nado Forzado o de Porsolt comúnmente se usa para probar los tratamientos antidepresivos (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b). Para esta prueba de comportamiento, un ratón se colocó en un cilindro de 5 L (11 cm de diámetro y 25 cm de altura) llenado dos tercios
20 completos con agua a 23°C. Se considera que los animales participan en la natación y son móviles si hay un claro desplazamiento del cuerpo. Los animales que flotan con mínimo movimiento durante el período de análisis se consideran inmóviles. El comportamiento animal se registró durante un
25 período de prueba de 6 minutos usando una cámara y un espejo detrás del cilindro. Los primeros 2 minutos y los últimos 4 minutos de la natación se analizaron separadamente para la actividad de natación del ratón. El nivel incrementado de depresión se correlaciona con un incremento en la inmovilidad
30 del ratón, particularmente durante los últimos 4 minutos. Los

animales que han sufrido estrés a edad temprana mostraron un incremento significativo en la inmovilidad en comparación con sus camadas no estresadas, indicando un nivel elevado de depresión (**FIG. 41**). El tratamiento con punicalagina de ratones estresados a edad temprana invirtió este comportamiento anormal (inmovilidad incrementada) y actividad de natación incrementada a niveles vistos en ratones no estresados. Este efecto de comportamiento de punicalagina demuestra su actividad como un antidepresivo (**FIG. 41**).

10

Acondicionamiento de Miedo Contextual

El acondicionamiento de miedo contextual se utilizó para determinar los efectos del elagitanino punicalagina en la susceptibilidad de animales adultos, sometidos a estrés a edad temprana, a ansiedad. Los animales se entrenaron en una cámara de acondicionamiento de miedo (Contexto A, W x L x H: 30 cm x 24 cm x 26 cm) (PanLab) que contuvo un piso de rejilla con barras de acero inoxidable y se conectó a un generador de descargas desarrollado por Panlab. Durante el entrenamiento, los animales se colocaron en la cámara uno a la vez. Después de cuatro minutos de exploración dentro de la cámara, se administró una descarga en la pata (2 segundos y 0.4 mA), seguida por una segunda descarga en la pata (2 segundos y 0.4 mA) un minuto más tarde. Treinta segundos después de la segunda descarga en la pata, el ratón se colocó de nuevo en su jaula doméstica. El comportamiento animal se monitoreó cada 2 segundos durante toda la duración del experimento. El período que los ratones permanecieron inmóviles en la cámara se consideró como "inmovilización" y se registró en todos estos períodos. El tiempo que los

ratones permanecieron inmóviles después de la primera descarga se registró por un período de 60 segundos y se expresó como un porcentaje.

El comportamiento de los ratones para reposar
5 inmóviles y "paralizados" en respuesta a una descarga en la pata es una medida de su nivel de ansiedad. Tanto más tiempo perdura la duración de "inmovilización" durante esta prueba de comportamiento, cuanto mayor el nivel de ansiedad de los animales.

10 Las diferencias en la inmovilización entre los grupos analizados (no estresados normales, estrés a edad temprana, y estrés a edad temprana + punicalagina) se observaron después de la primera descarga (**FIG. 42**). El
15 estrés a edad temprana condujo a ansiedad incrementada en ratones como se evidenció por el tiempo incrementado consumido de inmovilización después de la descarga en la pata, en comparación con sus camadas no estresadas (**FIG. 42**). El tratamiento con punicalagina disminuyó y normalizó estos
20 niveles de ansiedad elevados resultantes del estrés a edad temprana, como se muestra por un tiempo de inmovilización reducido después de 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
25 animales expuestos a estrés a edad temprana también se observó en la extinción (es decir, desaparición) de la memoria contextual (es decir, la memoria que asocia el contexto del ambiente con la descarga) inducida por este ensayo. Para examinar la fuerza de la ansiedad desarrollada
30 durante el acondicionamiento de miedo contextual (como se

describió anteriormente), los animales se colocaron en la misma cámara y contexto por 3 min diariamente (misma hora del día, sin embargo sin descarga a esta hora) por los 12 días que siguieron a la prueba inicial. El comportamiento de inmovilización inducido por el reconocimiento simple por los animales de la cámara, donde recibieron la descarga inicial, se midió durante cada uno de estos períodos de 3 minutos diarios.

Los grupos de animales (no estresados normales, estrés a edad temprana, y estrés a edad temprana + punicalagina) mostraron diferencias en la declinación de su recordatorio contextual de la descarga durante los 12 días subsecuentes (**FIG. 43**). En esta gráfica, la duración de inmovilización se presenta como el porcentaje de tiempo consumido inmóvil en el día 1 (por ejemplo, si un ratón estuvo inmóvil por 60 segundos en el día 1 y 30 segundos en el día 8, el porcentaje de inmovilidad es 100% en el día 1 y es 50% en el día 8).

Los ratones no estresados normales mostraron una declinación predecible en el recordatorio contextual durante el período de 12 días (**FIG. 43**). Los ratones estresados a edad temprana tuvieron un recordatorio contextual realzado, el cual se ilustra por un mayor nivel de inmovilización que sus camadas no estresadas (**FIG. 43**). Esto muestra un nivel elevado prolongado de ansiedad en estos ratones maternalmente separados.

El tratamiento con punicalagina de ratones estresados a edad temprana tuvo un impacto claro en la reducción de ansiedad como se ve por la extinción del recordatorio contextual. Los ratones estresados a edad

temprana tratados mostraron una extinción más rápida que los ratones estresados a edad temprana no tratados, caracterizada por el período reducido de tiempo consumido inmovilizado entre los días 8 y 12 (**FIG. 43**).

5

Barra Giratoria

Para medir los efectos de los compuestos derivados de granada en los impactos cognitivos negativos de separación maternal, los efectos en el aprendizaje motriz se sometieron a ensayo usando el ensayo de comportamiento con barra giratoria. El aparato de barra giratoria consiste de una barra de 2 cm de diámetro. Un ratón se colocó en una barra giratoria la cual se inició a una velocidad inicial de 5 rpm. La velocidad de la barra se aceleró gradualmente a una velocidad de 8 rpm/min hasta que alcanzó una velocidad de 45 rpm. La latencia a la caída se midió con un tiempo de cierre de 300 seg. Como se muestra en la **FIG. 44**, los ratones que han sufrido estrés a edad temprana sufrieron de aprendizaje motriz deteriorado. Los ratones maternalmente separados cayeron de la barra giratoria más rápido que los ratones no estresados normales. El tratamiento con punicalagina restauró las habilidades de aprendizaje motriz en animales estresados a edad temprana a niveles de funcionamiento observados en camadas no estresadas normales.

25

Laberinto de Agua de Morris

El ensayo de comportamiento en laberinto de agua de Morris se empleó para evaluar el impacto cognitivo de la separación maternal. En este ensayo, el aprendizaje cognitivo es medido por la capacidad del ratón para localizar una

30

plataforma oculta en una piscina de agua opaca. El aparato consiste de una piscina (140 cm de diámetro) llenado con agua a 22°C. Los ratones escapan del agua nadando a una plataforma circular oculta (15 cm de diámetro) colocada 1 cm debajo de la superficie del agua. Usando pistas visuales localizadas fuera del laberinto, los ratones son capaces de localizar la plataforma y recordar su ubicación durante los ensayos subsecuentes. Durante la fase de entrenamiento, los ratones se colocaron en dos posiciones de partida (alternativamente) cada hora. La tarea en laberinto de agua de Morris se realizó con 8 ensayos en T1, 6 ensayos en T2, y 4 ensayos en T3 (en el día 1, 2 y 3). Los ratones tuvieron un máximo de 60 seg para alcanzar la plataforma. La latencia de escape para alcanzar la plataforma se midió por un sistema de rastreo por vídeo. Como se puede observar en la Figura 45, la tensión a edad temprana tiene un impacto significativo en el aprendizaje cognitivo, con ratones que toman un largo periodo de tiempo para aprender la ubicación de la plataforma oculta, como se muestra por la latencia de escape incrementada contra ratones normales no estresados. El tratamiento de estos ratones maternalmente separados con punicalagina invirtió este impacto negativo de estrés a edad temprana, reduciendo el tiempo para aprender la ubicación de la plataforma oculta a niveles observados en ratones normales no estresados. Estos resultados demostraron la capacidad de punicalagina para invertir los impactos negativos a largo plazo de estrés a edad temprana en el aprendizaje y formación de la memoria.

Compuestos Derivados de Granada

Tomando conjuntamente los datos anteriores se

000177

demuestra que los compuestos derivados de elagitaninos son capaces de revertir el impacto negativo a largo plazo de la separación a edad temprana en la depresión, ansiedad, y cognición.

5

Ejemplo 20

Efectos de los Compuestos Derivados de Granada en la Memoria y Cognición en Ratones Normales

Tratamiento con Compuestos Derivados de Granada

10 Comenzando a los 3 meses de edad, los ratones fueron alimentados ya sea con (i) una dieta de control estándar tal como AIN-93G; (ii) una dieta que contiene punicalagina a una concentración de 0.87 mg/kg, con el fin de suministrar una dosis aproximada de 90 mg/kg/días (por un
15 periodo de 3 meses); o (iii) una dieta que contiene urolitina A a una concentración de 0.57 mg/kg, para suministrar una dosis aproximada de 55 mg/kg/día (por un periodo de 2.5 meses). La dosis actual varía ligeramente dependiendo del consumo de alimentos de cada ratón individual, así como
20 también el peso del ratón. La evaluación del comportamiento de cognición se midió después de este periodo.

Ensayo de Comportamiento para medir los efectos de los compuestos derivados de granada en cognición

25 Para examinar el efecto de los compuestos derivados de granada en la memoria y cognición, los ratones se examinaron para mejoramientos en la memoria contextual utilizando el ensayo de acondicionamiento de miedo contextual. Los ratones se entrenaron en una cámara de
30 acondicionamiento de miedo como se describe en el Ejemplo 19.

000178

Durante el entrenamiento, los animales se colocaron en la cámara uno a la vez. Después de cuatro minutos de exploración dentro de la cámara, se administró una descarga en el pie (2 segundos y 0.4 mA), seguido por una segunda 5 descarga al pie (2 segundos y 0.4 mA) un minuto más tarde. Treinta segundos después de la segunda descarga en el pie, el ratón se colocó de nuevo en su jaula.

Un día después, los animales entrenados se regresaron a la cámara por un periodo de tres minutos. 10 Durante este periodo los ratones se monitorearon por su movimiento. La cantidad de tiempo agotado inmóvil o "paralizado" se registró como un porcentaje del tiempo total (3 minutos) bajo observación. El tiempo agotado inmóvil es una medida de la fuerza de la memoria de los ratones para 15 recordar el contexto en el cual los mismos fueron entrenados. El tratamiento con tanto la elagitanino punicalagina derivada de granada y el metabolito de ácido elágico urolitina A conduce a mejoras significantes en la memoria contextual sobre ratones de control no tratados como se determina por su 20 memoria contextual de 24 horas seguida por el periodo de entrenamiento (Figura 46).

Para determinar el efecto de estos compuestos derivados de granada en la retención de memoria, los ratones normales alimentados con ya sea (i) una dieta de control; 25 (ii) punicalagina (por un periodo de 3 meses) o (iii) urolitina A (por un periodo de 2.5 meses) se estudiaron por su recuperación de la memoria en los días 1, 2, 3, 4 y 5 después del entrenamiento de miedo contextual inicial.

Los animales se colocaron en la misma cámara y 30 contexto por 3 minutos diarios (el mismo tiempo de día, sin

embargo no hubo descarga en este tiempo) por los 5 días posteriores a la prueba inicial. El comportamiento de paralización inducido por el reconocimiento contextual simple por los animales de la cámara, donde los mismos recibieron la
5 descarga inicial, se midió durante cada uno de estos periodos de 3 minutos diarios. La capacidad de reconocer este entorno en la ausencia del estímulo es una medida de la memoria contextual.

Con cada día que pasa los ratones de control no
10 tratados comienzan a tener una extinción de su memoria para este estímulo contextual, que se evidencia por una disminución en la extensión de la paralización (Figura 47). Los ratones tratados con ya sea punicalagina o urolitina A demostraron una retención de memoria mejorada cuando se
15 comparan con ratones de control no tratados. Esto es ilustrado por una capacidad de recordar el contexto inicial por un periodo más largo, evidenciado por un periodo significativamente más largo para la extinción de la memoria contextual (Figura 47).

20 Estos resultados demuestran que el tratamiento con ya sea punicalagina o urolitina A conduce a la cognición mejorada, como se evidencia por un incremento significativo en el reconocimiento del contexto y retención de la memoria mejorada.

25

Ejemplo 21

*Efectos de los Compuestos Derivados de Granada en el
Funcionamiento Muscular Mejorado en Ratones Normales*

Los compuestos derivados de elagitaninos
30 punicalagina y urolitina A se evaluaron por su capacidad para

000180

mejorar el funcionamiento muscular. Para examinar los beneficios de punicalagina y urolitina A en la mejora del funcionamiento muscular, sus efectos se examinaron usando dos ensayos de comportamiento: (i) el ensayo de cilindro giratorio, el cual mide el funcionamiento muscular y habilidades motoras, incluyendo coordinación, y (ii) la prueba de resistencia en caminadora, los cuales miden el funcionamiento muscular y resistencia.

10 ***Ensayos de Comportamiento para Medir los Efectos de los Compuestos Derivados de Granada en el Funcionamiento Muscular***
Ensayo de Cilindro Giratorio

Comenzando a los 3 meses de edad, los ratones se alimentaron con una dieta de control estándar tal como AIN-15 93G o una dieta que contiene punicalagina para suministrar una dosis de 90 mg/kg/día por un periodo de 3 meses.

Para examinar el efecto de los compuestos derivados de granada en el funcionamiento muscular y habilidades motoras, los ratones fueron probados en el ensayo de comportamiento en cilindro giratorio. El aparato de cilindro giratorio consiste de un cilindro con un diámetro de 2 cm con 5 compartimientos, 5 cm de ancho. Un ratón se coloca en un cilindro giratorio el cual se inicia a una velocidad inicial de 5 rpm. La velocidad del cilindro es acelerada gradualmente a una velocidad de 8 rpm/min. La latencia a la caída se medirá con un tiempo de corte de 300 segundos. Los ratones se probaron por cuatro ensayos. La latencia a la caída es una medida del funcionamiento muscular y habilidades motoras en los ratones, con un mejor funcionamiento reflejado por una latencia a la caída más larga. Tanto los ratones de control

000181

no tratados como los tratados con punicalagina fueron probados. La elagitanino punicalagina fue capaz de mejorar significativamente el funcionamiento muscular y habilidades motoras cuando se compara con los ratones no tratados. Los
5 ratones tratados con punicalagina fueron capaces de permanecer en el cilindro giratorio por un tiempo más grande y a velocidades más altas comparadas con ratones no tratados durante periodos de ensayos secuenciales (Figura 48).

Prueba de Resistencia

10 Los ratones de 8 semanas de edad normales se aclimataron por 2 semanas previas al inicio del estudio. Los ratones se alimentaron con una dieta de roedor estándar (dieta chow) o una dieta que contiene urolitina A mezclada con el alimento para alcanzar una dosificación de 55
15 mg/kg/día proporcionados a los ratones. Después de 6 semanas de tratamiento, los ratones fueron probados para su funcionamiento muscular por medio de una prueba de resistencia.

Una prueba de resistencia se realizó usando una
20 banda caminadora de velocidad variable puesta en una cámara de plexiglás con un dispositivo de estímulos que consiste de una rejilla de choque unida a la parte trasera de la banda (Panlab, Barcelona, España). Los ratones corrieron a 10 cm/seg y 0° de inclinación por 5 min. La velocidad se
25 incrementó entonces por 2cm/seg cada 5 min, hasta que los ratones se agotaron. La distancia corrida y el número de choques obtenidos por intervalos de 5 min se registraron. Los ratones se consideraron agotados y se retiraron del experimento cuando recibieron aproximadamente 20 choques en
30 un periodo de 1 min. Los ratones de control tratados con

urolitina A y no tratados fueron probados y comparados por su rendimiento.

El rendimiento y resistencia mejorados de los músculos se refleja por una capacidad para correr a altas
5 velocidades en la banda caminadora. Los ratones buscaron evitar el choque y corrieron a pesar de la velocidad incrementada. A un cierto punto los ratones son incapaces de mantener la velocidad de la caminadora y se conmocionan. Después de alcanzar los niveles de umbral de conmoción, los
10 ratones son retirados de la caminadora. Los ratones que tienen mejor funcionamiento muscular y resistencia mejorada serán capaces de mantener la velocidad incrementada de la caminadora y experimentarán alguna conmoción a una velocidad particular. Los ratones tratados con urolitina A corrieron a
15 altas velocidades que los ratones de control no tratados en este ensayo conductual, que ilustra que la urolitina A mejora el funcionamiento muscular y resistencia en este contexto (Figura 49).

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

EQUIVALENTES

25 La invención se ha descrito ampliamente y de forma genérica en la presente. Aquellos de experiencia ordinaria en la técnica preverán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en la
30 misma, y cada una de las variaciones y/o modificaciones se

considera que están dentro del alcance de la presente invención. De manera más general, aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales, y configuraciones descritas en la presente se entiende que son ejemplares y que los parámetros, dimensiones, materiales, y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las cuales las enseñanzas de la presente invención son usadas. Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de comprobar usando nada más la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descritas en la presente. Por lo tanto, se entiende que las modalidades precedentes están presentes en calidad de ejemplo solamente y que, dentro del alcance de las reivindicaciones anexadas y equivalentes a estas, la invención puede ser practicada de otra forma a la descrita y reivindicada específicamente. La presente invención está dirigida a cada característica individual, sistema, artículo, material, kit, y/o método descrito en la presente. Además, cualquier combinación de dos o más características, sistemas, artículos, materiales, kits, y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales, kits, y/o métodos no son mutuamente inconsistentes, se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Además, cada una de las especies más reducidas y agrupamientos subgenéricos que caen dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una afección o limitación negativa que remueve cualquier tema del género, independiente de si o no el material suprimido en la presente se cita específicamente.

INCORPORACIÓN PARA REFERENCIA

Los contenidos de los artículos, patentes, y solicitudes de patentes, y otros documentos e información disponible electrónicamente mencionada o citada en la presente, se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si cada publicación individual fue indicada específica e individualmente para ser incorporada por referencia. Los solicitantes se reservan el derecho físico para incorporar en esta solicitud cualesquiera y todos los materiales e información de cualquiera de tales artículos, patentes, solicitudes de patente, u otros documentos electrónicos y físicos.

15 **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 microflora 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. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(7): 2424-8.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Maier, S. F. and L. R. Watkins (2005). "Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and
- 30

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. and 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.

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.

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. and 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.

Sandi, C. and 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."
 5 *Biol Pharm Bull* 16(8): 787-90.

Schriner, 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.

10 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, Punicacorteins A, B, C, and
 15 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) Isolation and Characterization of
 Novel Ellagitannins, Punicacorteins A, B, C, and
 20 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
 25 Characterization of 2-O-Galloylpunicalin from the
 Bark of *Punica granatum* L." *Chem. Pharm. Bull* 34(2):
 650-655.

Trifunovic, A., A. Wredenberg, et al. (2004). "Premature
 ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA
 30 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.

5 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 neuritogenesis of PC12-N1 cells." *Neurosci Lett* 10 392(3): 231-4.

Yang, G., F. Pan, et al. (2009). "Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories." *Nature* 462(7275): 920-4.

REIVINDICACIONES

1. Un producto alimenticio o suplemento nutricional
caracterizado porque comprende una cantidad efectiva de
5 extracto de granada: para el tratamiento o prevención de una
afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad,
velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes
mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia,
enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno
10 del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el
manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular
o funcionamiento mental.

2. Un producto alimenticio o suplemento nutricional
caracterizado porque comprende una cantidad efectiva de un
15 elagitanino: para el tratamiento o prevención de una afección
seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad
metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus,
enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad
neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado
20 de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de
peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o
funcionamiento mental.

3. Un producto alimenticio o suplemento nutricional
caracterizado porque comprende una cantidad efectiva de
25 punicalagina: para el tratamiento o prevención de una
afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad,
velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes
mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia,
enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno
30 del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el

manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

4. Un producto alimenticio o suplemento nutricional caracterizado porque comprende una cantidad efectiva de ácido eláico: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

5. Un producto alimenticio o suplemento nutricional caracterizado porque comprende una cantidad efectiva de una urolitina: para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada del grupo que consiste de obesidad, velocidad metabólica reducida, síndrome metabólico, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno cognitivo, trastorno del estado de ánimo, estrés, y trastorno de ansiedad; para el manejo de peso; o para incrementar el funcionamiento muscular o funcionamiento mental.

6. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es la obesidad.

7. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es la velocidad metabólica reducida.

8. El producto alimenticio o suplemento nutricional

de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es el síndrome metabólico.

9. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es la diabetes mellitus.

10. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es la enfermedad cardiovascular.

11. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es hiperlipidemia.

12. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es la enfermedad neurodegenerativa.

13. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es el trastorno cognitivo.

14. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es el trastorno del estado de ánimo.

15. El producto alimenticio o suplemento nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es el estrés.

16. El producto alimenticio o suplemento

nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la afección es el trastorno de ansiedad.

17. El producto alimenticio o suplemento
5 nutricional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque controla el peso.

18. El producto alimenticio o suplemento
nutricional de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1-5, caracterizado porque incrementa el
10 funcionamiento muscular.

19. El producto alimenticio o suplemento
nutricional de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1-5, caracterizado porque incrementa el
funcionamiento mental.

15 20. El producto alimenticio o suplemento
nutricional de conformidad con la reivindicación 5,
caracterizado porque la urolitina es urolitina A.

21. Un método para incrementar o mantener la
función mitocondrial, caracterizado porque comprende:

20 poner en contacto las células con una cantidad
efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para
incrementar la función de las mitocondrias.

22. Un método para tratar, prevenir, o controlar
una afección o enfermedad relacionada con mitocondrias
25 asociada con la función mitocondrial alterada o una densidad
mitocondrial reducida, caracterizado porque comprende:

administrar a un sujeto en necesidad del mismo una
cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un
precursor de la misma, para tratar la enfermedad o afección
30 asociada con la función mitocondrial alterada o densidad

mitocondrial reducida.

23. Un método para incrementar la velocidad metabólica, caracterizada porque comprende:

5 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar la velocidad metabólica.

24. Un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico, caracterizado porque comprende:

10 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

25. Un método para prevenir o tratar la obesidad, caracterizado porque comprende:

15 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar la obesidad.

26. Un método para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular, caracterizado porque comprende:

20 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular.

27. Un método para tratar hiperlipidemia, caracterizado porque comprende:

25 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la hiperlipidemia.

28. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la hiperlipidemia es la hipertrigliceridemia.

30 29. El método de conformidad con la reivindicación

27, caracterizado porque la hiperlipidemia es ácidos grasos libres elevados.

30. Un método para tratar un trastorno metabólico, caracterizado porque comprende:

5 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno metabólico.

31. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el trastorno metabólico es diabetes
10 mellitus.

32. El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el trastorno metabólico es la obesidad.

33. Un método para tratar una enfermedad
15 neurodegenerativa, caracterizado porque comprende:

 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar la enfermedad neurodegenerativa.

20 34. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste de complejo de demencia por SIDA, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander,
25 enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, encefalopatía espongiforme bovina (BSE), enfermedad de Canavan, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia con cuerpos de Lewy, insomnio familiar fatal, degeneración lobular frontotemporal,
30 enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, enfermedad

de Krabbe, enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, atrofia de sistemas múltiples, neuroacantocitosis, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, esclerosis mielinoclástica difusa, ataxia espinocerebelar, degeneración combinada subaguda de la médula espinal, tabes dorsal, enfermedad de Tay-Sachs, encefalopatía tóxica, encefalopatía espongiiforme transmisible, and síndrome del erizo tambaleante.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste de Enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, y enfermedad de Parkinson.

36. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

37. Un método para mejorar la función cognitiva, caracterizado porque comprende:

administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para mejorar la función cognitiva.

38. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque la función cognitiva se selecciona del grupo que consiste de percepción, memoria, atención, comprensión del habla, generación del habla, comprensión de lectura, creación de imágenes, aprendizaje, y razonamiento.

39. El método de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque la función cognitiva se selecciona

del grupo que consiste de percepción, memoria, atención, y razonamiento.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque la función cognitiva es la memoria.

5 41. Un método para tratar un trastorno cognitivo, caracterizado porque comprende:

 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno cognitivo.

10 42. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque el trastorno cognitivo se selecciona del grupo que consiste de delirio, demencia, trastorno del aprendizaje, trastorno de déficit de atención (ADD), y trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD).

15 43. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el trastorno cognitivo es un trastorno del aprendizaje.

 44. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el trastorno cognitivo es el
20 trastorno de déficit de atención (ADD).

 45. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el trastorno cognitivo es el trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD).

 46. Un método para tratar un trastorno del estado
25 de ánimo, caracterizado porque comprende:

 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno del estado de ánimo.

30 47. El método de conformidad con la reivindicación

46, caracterizado porque el trastorno del estado de ánimo se selecciona del grupo que consiste de depresión, depresión post-parto, distimia, and trastorno bipolar.

48. El método de conformidad con la reivindicación
5 47, caracterizado porque el trastorno del estado de ánimo es la depresión.

49. Un método para tratar un trastorno de ansiedad, caracterizado porque comprende:

10 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para tratar el trastorno de ansiedad.

50. El método de conformidad con la reivindicación
49, caracterizado porque el trastorno de ansiedad se selecciona del grupo que consiste de trastorno de ansiedad
15 generalizado, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, agorafobia, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo, y trastorno de estrés post-traumático.

51. El método de conformidad con la reivindicación
20 50, caracterizado porque el trastorno de ansiedad es el trastorno de ansiedad generalizado.

52. El método de conformidad con la reivindicación
50, caracterizado porque el trastorno de ansiedad es el trastorno de estrés post-traumático.

25 53. Un método para tratar un trastorno musculoesquelético, caracterizado porque comprende:

administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para mejorar la función muscular.

30 54. Un método para mejorar el funcionamiento

muscular, caracterizado porque comprende:

5 administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para incrementar el funcionamiento muscular.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el funcionamiento muscular se selecciona del grupo que consiste de fuerza, velocidad, y resistencia.

10 56. Un método para promover la excrecencia de neuritas, caracterizado porque comprende:

poner en contacto una célula nerviosa con una cantidad efectiva de una urolitina o un precursor de la misma, para promover la excrecencia de neuritas.

15 57. El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque la puesta en contacto comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de la urolitina o precursor de la misma, para promover la excrecencia de neuritas.

20 58. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma es una urolitina aislada.

25 59. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma es un precursor de urolitina aislada.

60. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina se selecciona del grupo que consiste de urolitina A, urolitina B, y una combinación de urolitina A y urolitina B.

30 61. El método de conformidad con cualquiera de las

000200

reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina es un metabolito de una urolitina seleccionado del grupo que consiste de urolitinas glucuronizadas, urolitinas metiladas, y urolitinas sulfatadas.

5 62. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como un alimento natural seleccionado del grupo que consiste de bayas, uvas, granadas, escaramujos, y nueces.

10 63. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como un producto alimenticio procesado con base en un alimento natural seleccionado del grupo que consiste de bayas, uvas, granadas,
15 escaramujos, y nueces.

64. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como jugo de granada.

20 65. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como extracto de granada.

66. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como un elagitanino.

25 67. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como punicalagina.

30 68. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como ácido elágico.

000201

69. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra como una urolitina.

70. El método de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra oralmente.

71. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra parenteralmente.

10 72. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra al menos semanalmente.

73. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma
15 se administra en una dosis igual o equivalente a 0.1 - 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal.

74. El método de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma
20 se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero pico de al menos 0.1 micromolar (μM).

75. El método de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en
25 suero sostenido de al menos 0.1 micromolar (μM).

76. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra al menos diariamente.

77. El método de conformidad con la reivindicación
30 76, caracterizado porque la urolitina o precursora de la

misma se administra en una dosis igual o equivalente a 0.1 - 150 miligramos (mg) de urolitina por kilogramo (kg) de peso corporal.

78. El método de conformidad con la reivindicación 5 77, caracterizado porque la urolitina o precursor de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero pico de al menos 0.1 micromolar (μM).

79. El método de conformidad con la reivindicación 10 77, caracterizado porque la urolitina o precursora de la misma se administra en una dosis suficiente para lograr un nivel en suero sostenido de al menos 0.1 micromolar (μM).

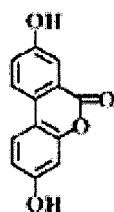
80. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-57, caracterizado porque el sujeto no está recibiendo una urolitina o un precursor de la misma, 15 para tratar otra afección que requiere la administración de una urolitina o un precursor o metabolito de la misma, dicha condición se selecciona del grupo que consiste de aterosclerosis, trombosis, cáncer, angiogénesis no deseada, infección, e inflamación.

RESUMEN DE LA INVENCION

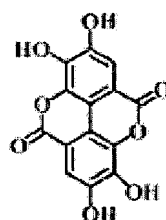
Se proporcionan composiciones que comprenden compuestos o precursores para compuestos las cuales se pueden usar para una variedad de aplicaciones terapéuticas
5 incluyendo, por ejemplo, tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la actividad mitocondrial reducida o inadecuada, incluyendo envejecimiento o estrés, diabetes, obesidad, y enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos se relacionan generalmente una urolitinas y precursores de
10 las mismas, incluyendo pero no limitado a elagitaninas y urolitina. En ciertas modalidades, las composiciones se presentan en o como productos alimenticios o suplementos nutricionales. Estos mismos compuestos y composiciones también se pueden usar ventajosamente generalmente en
15 individuos saludables para incrementar o mantener la velocidad metabólica, disminuir el porcentaje de grasa corporal, incrementar o mantener la masa muscular, controlar el peso corporal, mejorar o mantener el desempeño mental (incluyendo memoria), mejorar o mantener el desempeño
20 muscular, mejorar o mantener el humor, y manejar el estrés.

000204

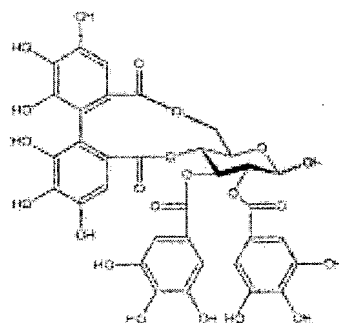
Figura 1



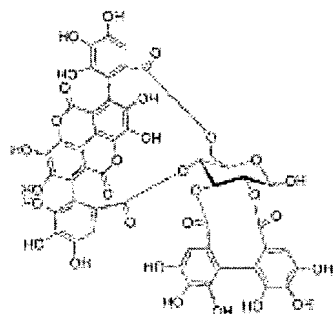
Urolitina A (UA)



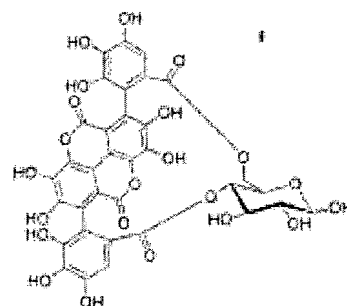
Ácido Elágico (EA)



Telimagrandina (TL)



Punicalagina (PA)



Punicalina (PB)

Figura 2

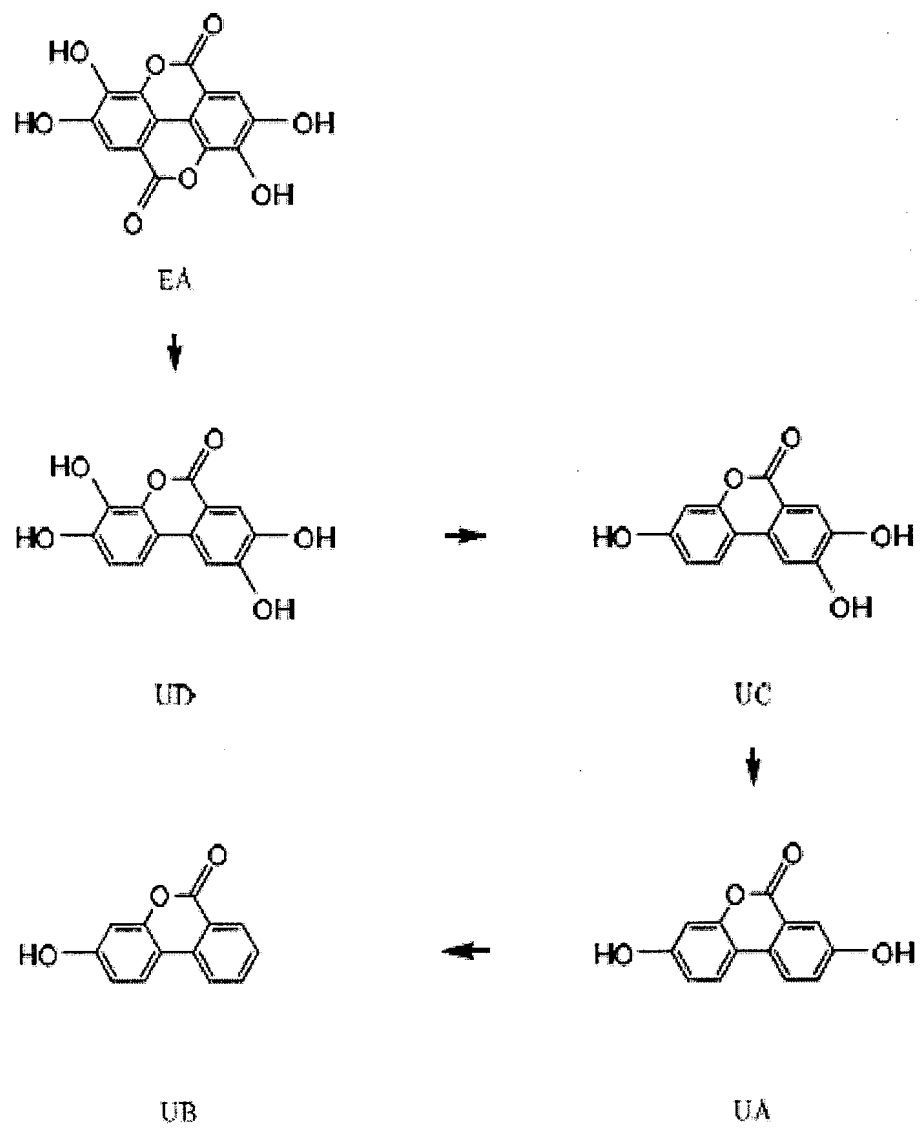


Figura 3

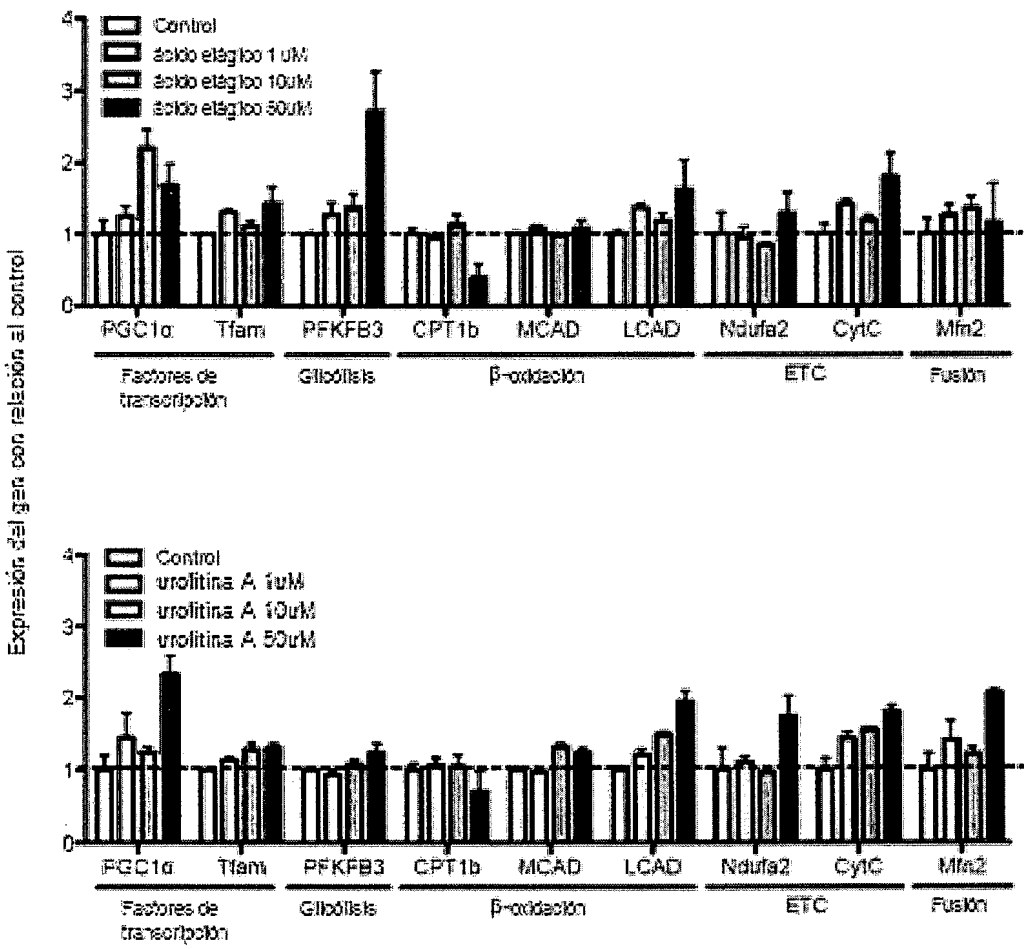
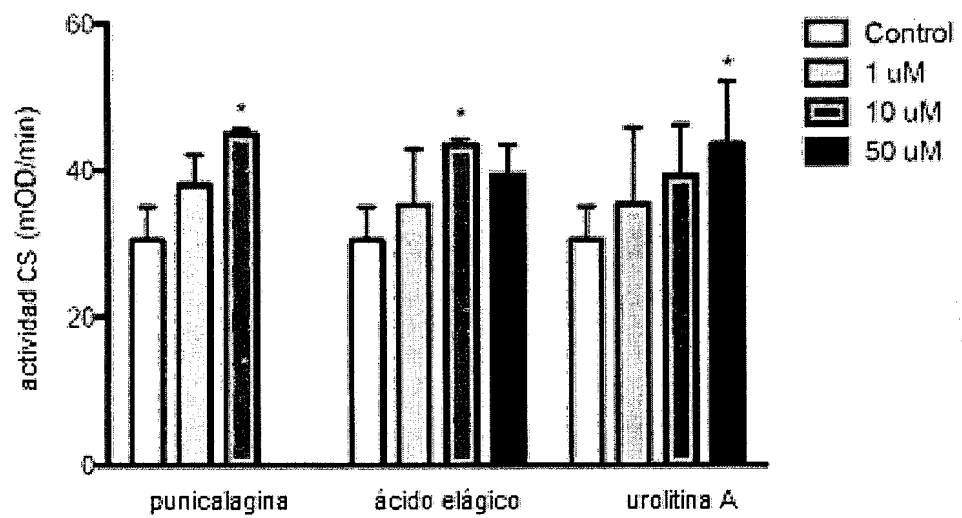


Figura 4



000208

Figura 5

A

IB : P-AMPK



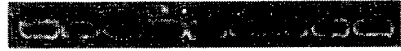
B

IB : AMPK



Control RSV EA 50 μ M

IB : P-AMPK



IB : AMPK



Control RSV UA 50 μ M

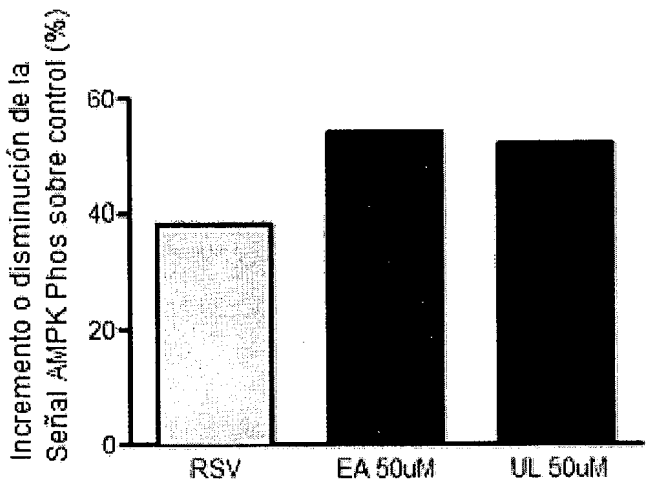
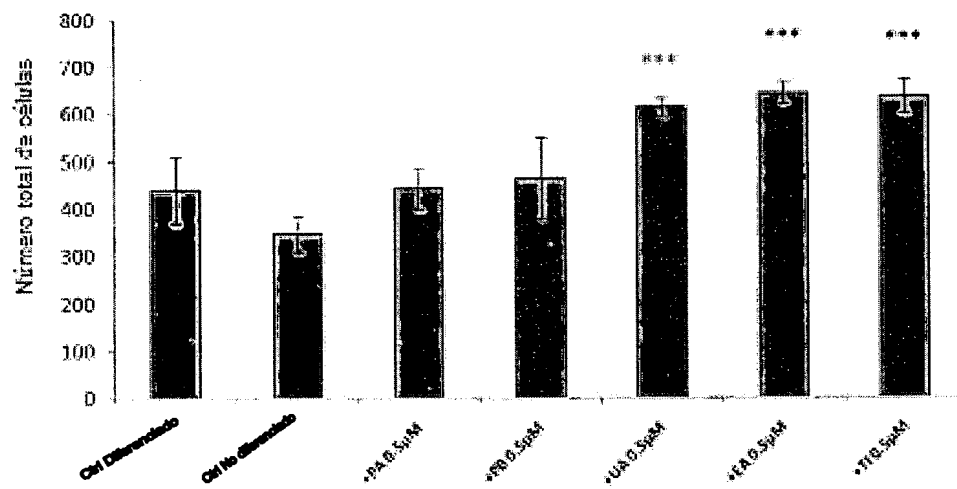
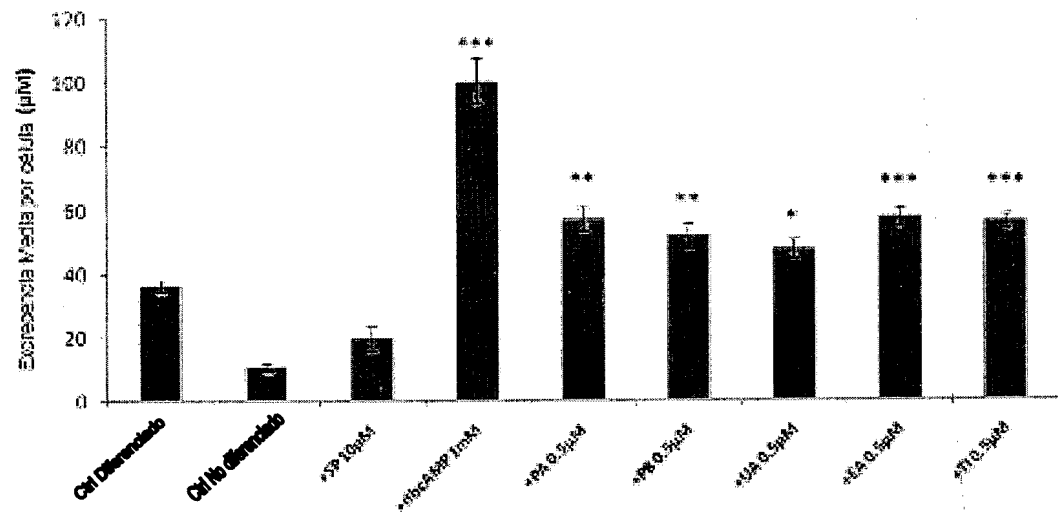


Figura 6



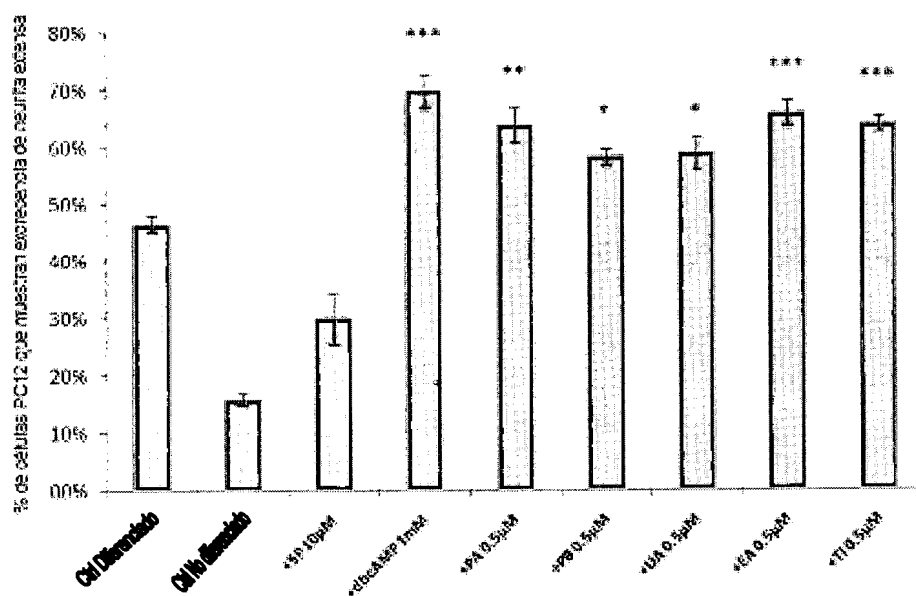
*** $p < 0.001$ cuando se compara con las células de control diferenciadas

Figura 7



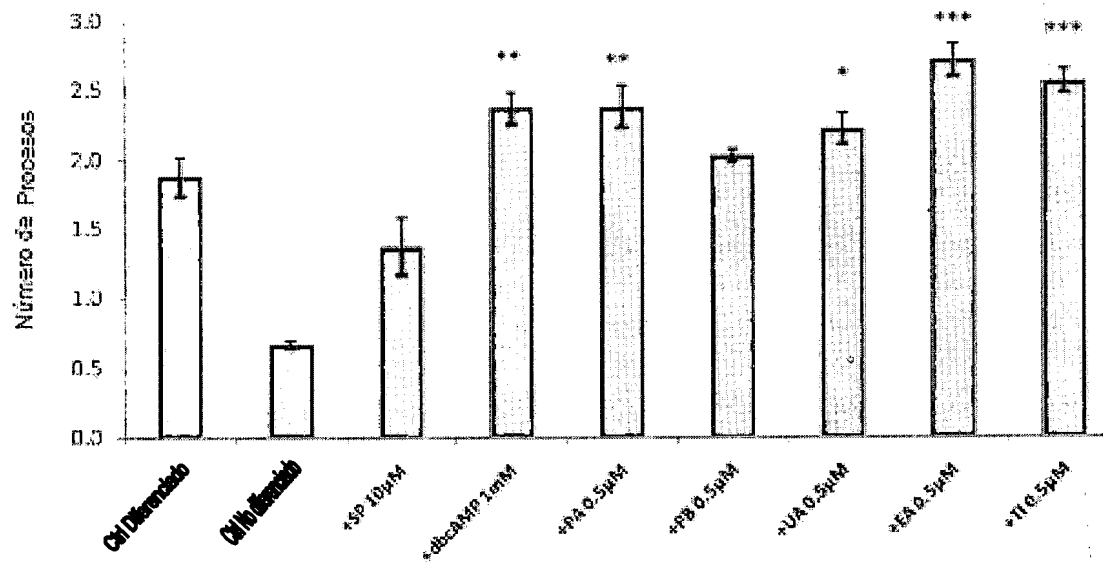
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando se compara con células de control diferenciadas

Figura 8



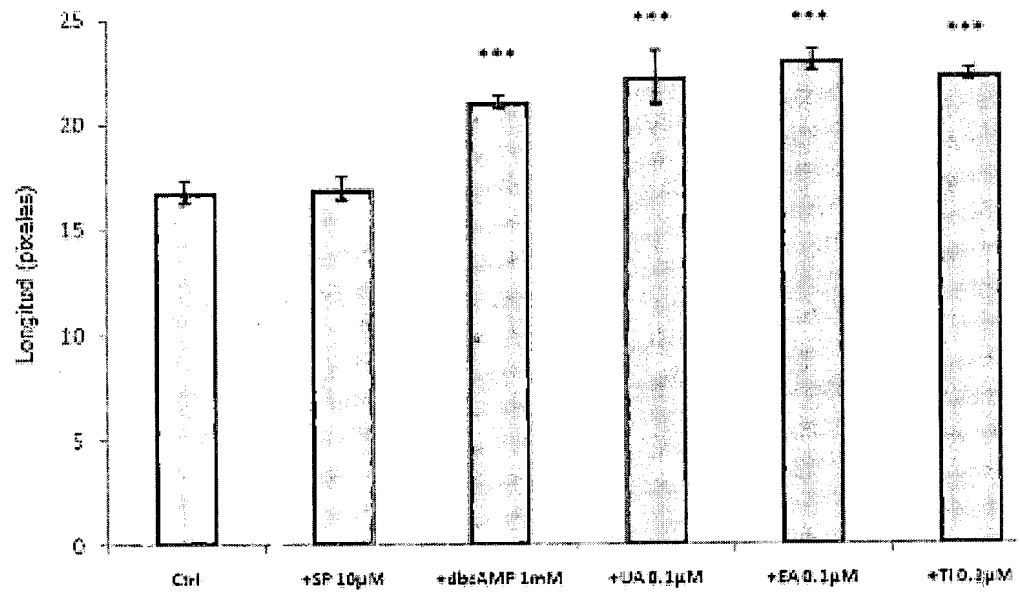
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando se compara con las células de control diferenciadas

Figura 9



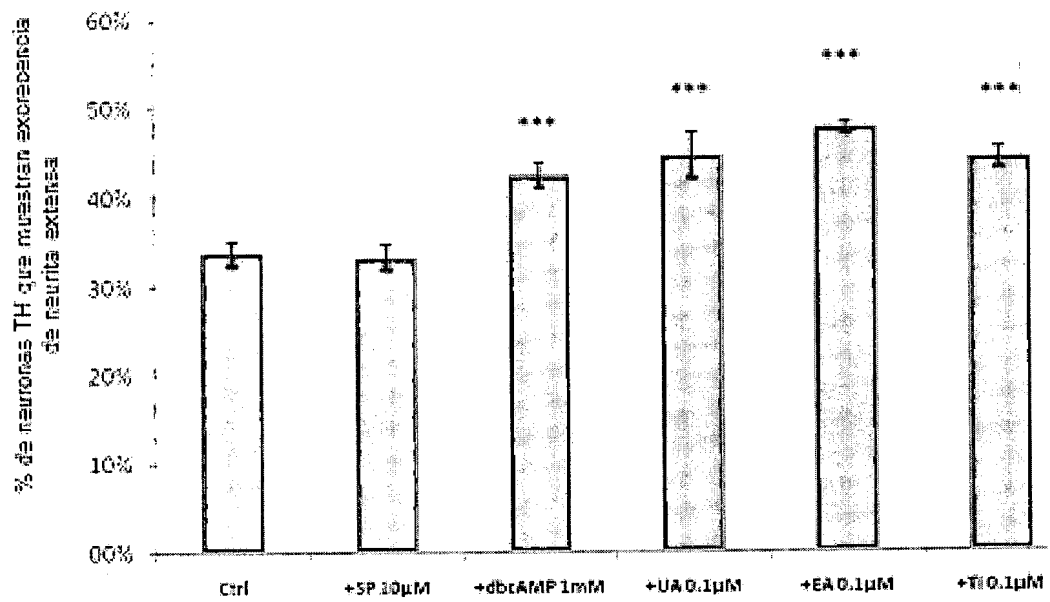
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando se compara con células de control diferenciadas

Figura 10



*** $p < 0.001$ cuando se compara con las células de control diferenciadas

Figura 11



*** $p < 0.001$ cuando se compara con las células de control diferenciadas

Figura 12

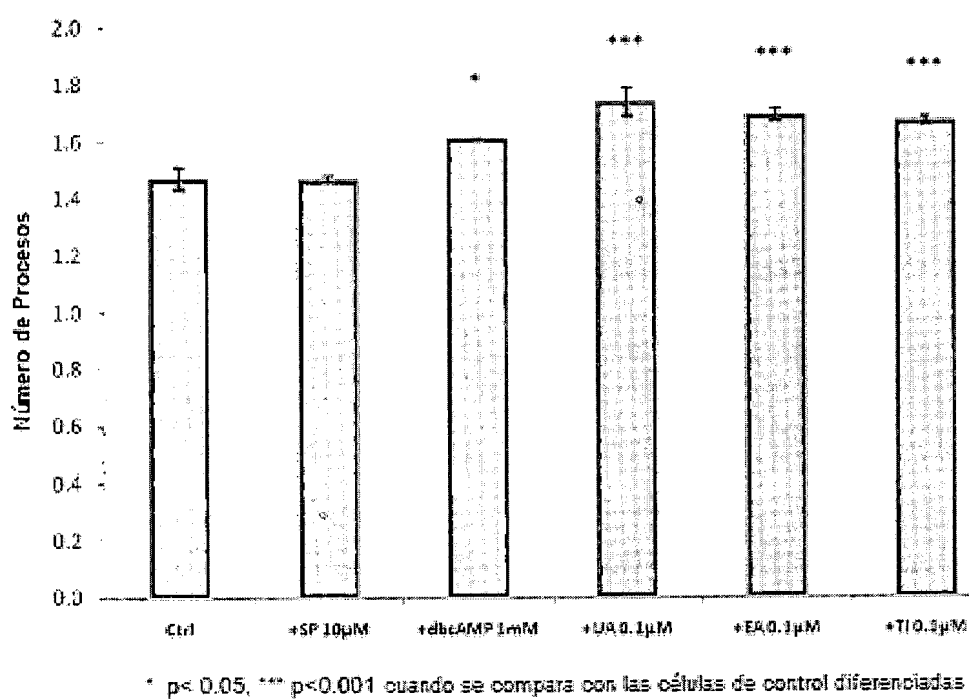
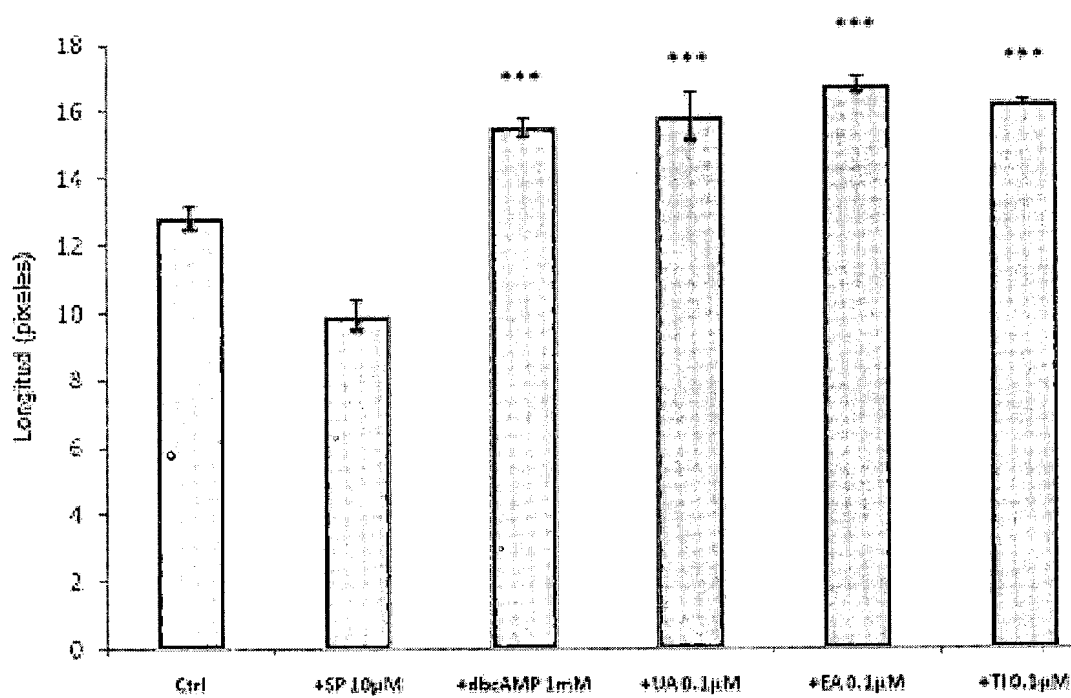
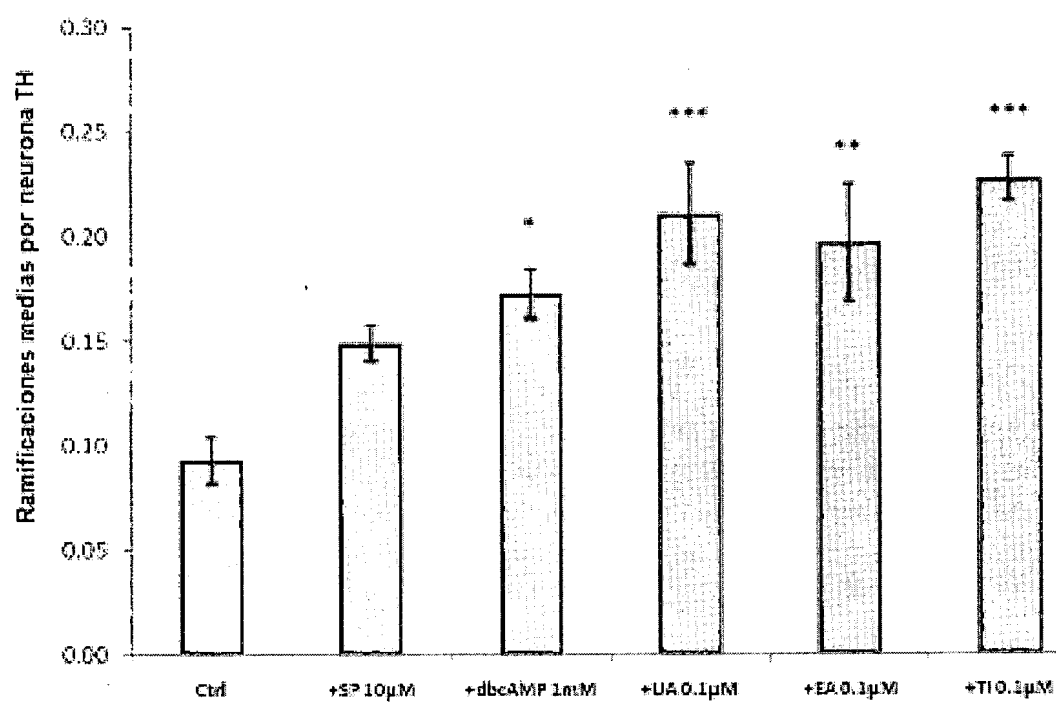


Figura 13



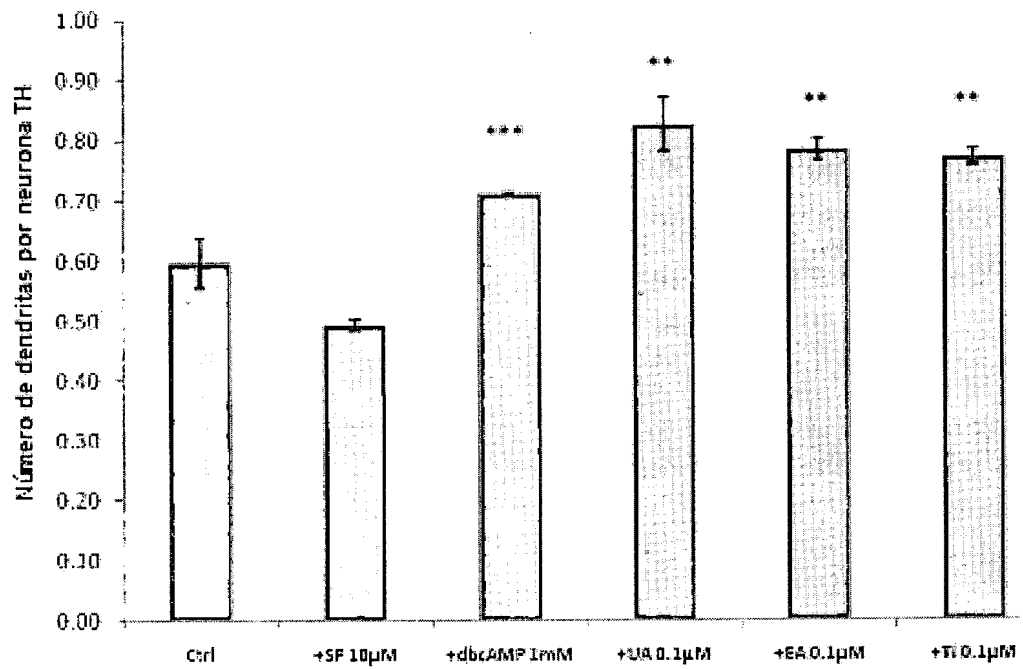
*** $p < 0.001$ cuando se compara con las células de control diferenciadas

Figura 14



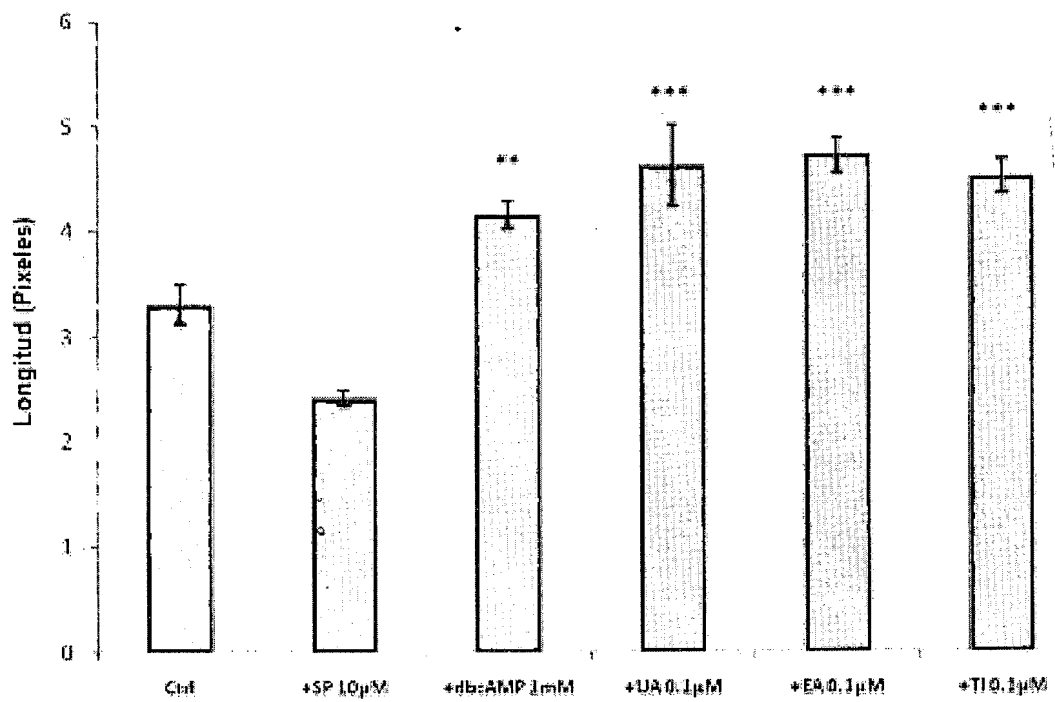
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando se compara con las células de control diferenciadas

Figura 15



** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ cuando se comparan con células de control diferenciadas

Figura 16



** p<0.01, *** p<0.001 cuando se compara con células de control diferenciadas

Figura 17A

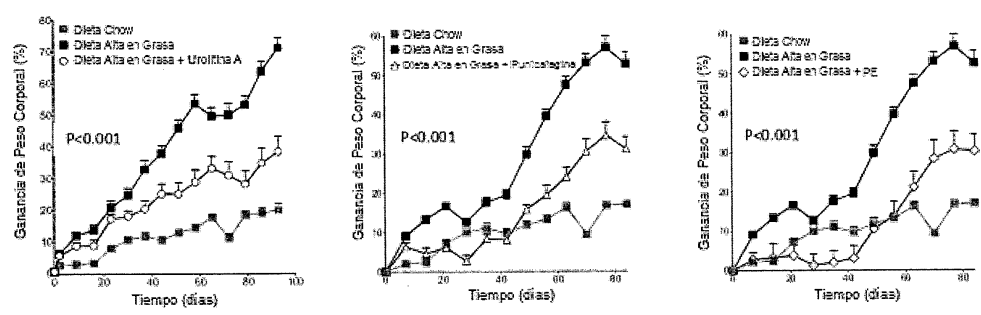


Figura 17B

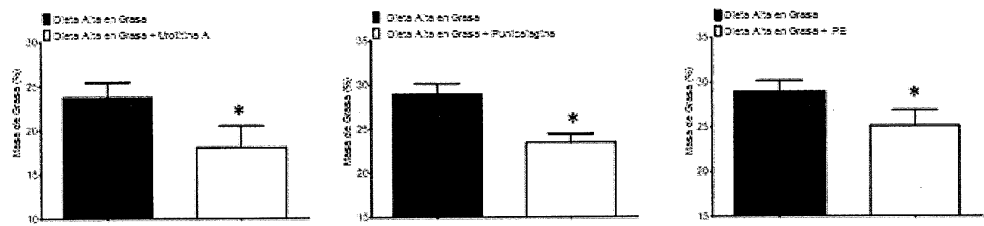


Figura 17C

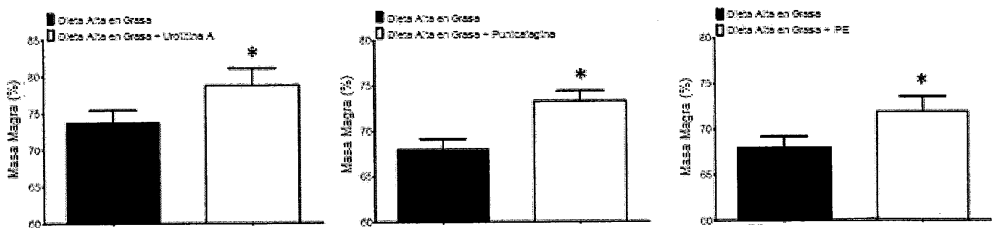


Figura 18

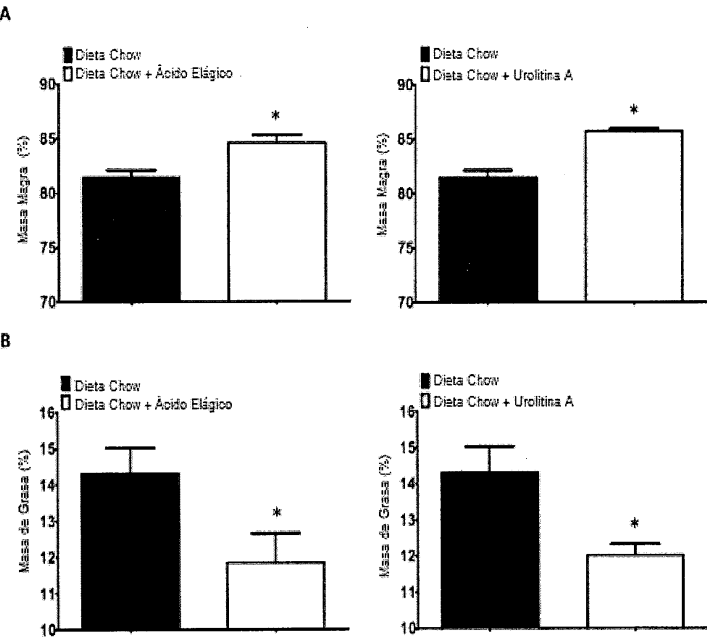
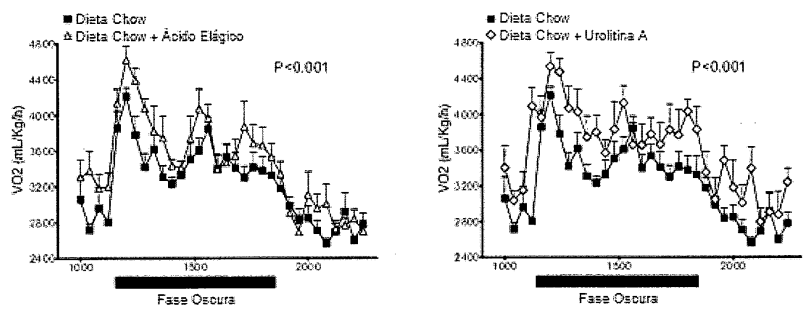


Figura 19

A



B

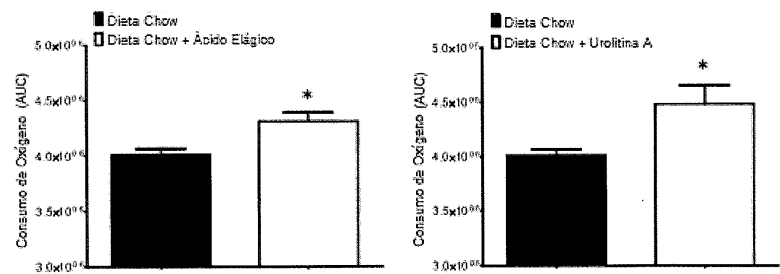


Figura 20

Dieta Alta en Grasa
Dieta Alta en Grasa + Punicagolina

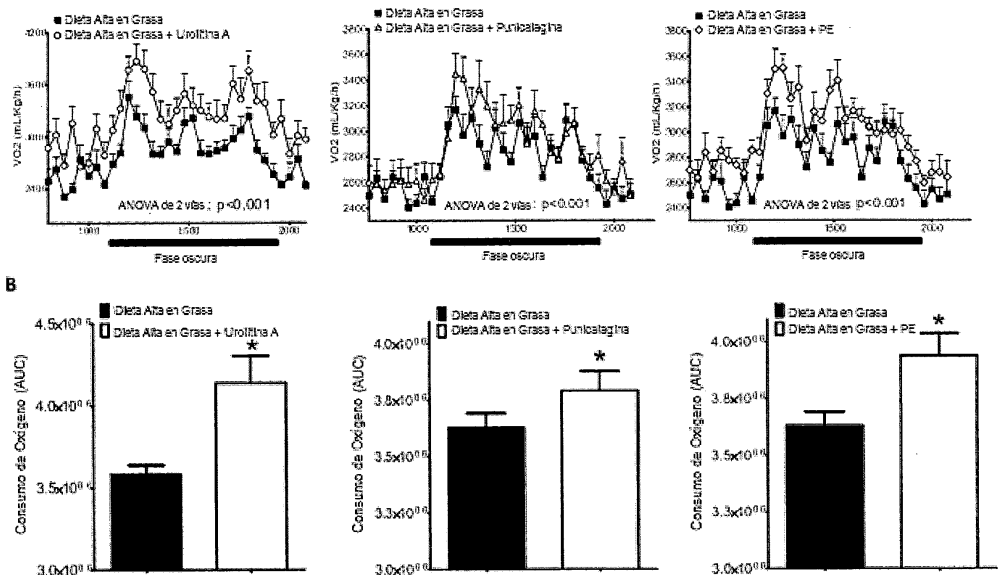
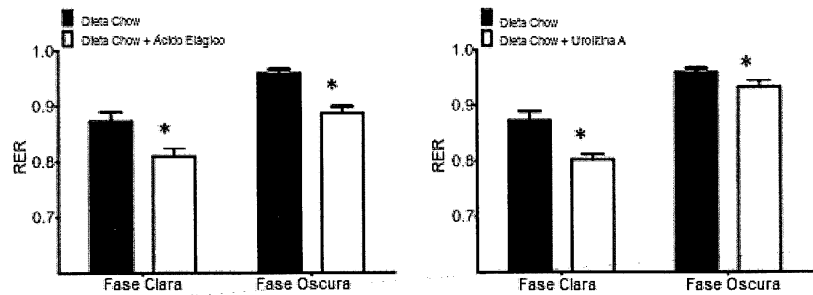
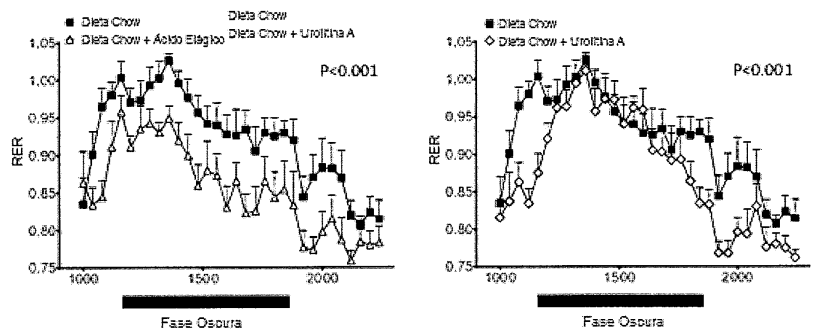


Figura 21

A

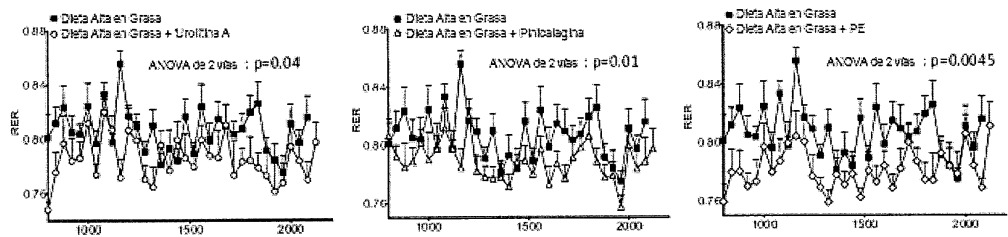


B

008226

Figura 22

A



B

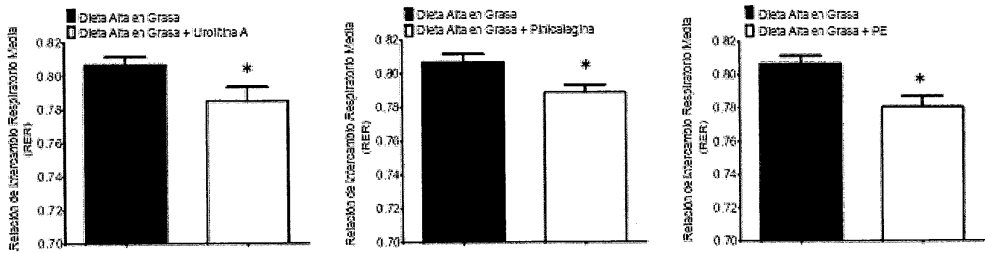
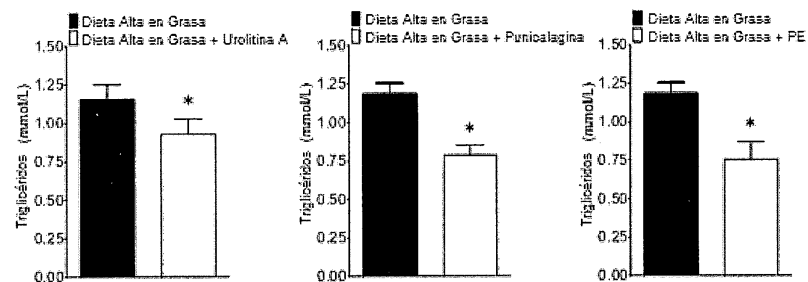
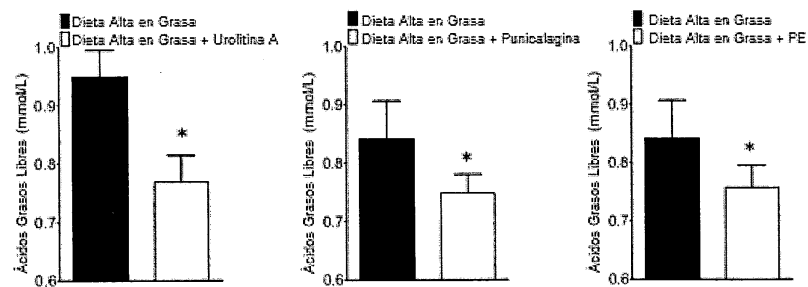


Figura 23

A



B



000228

Figura 24

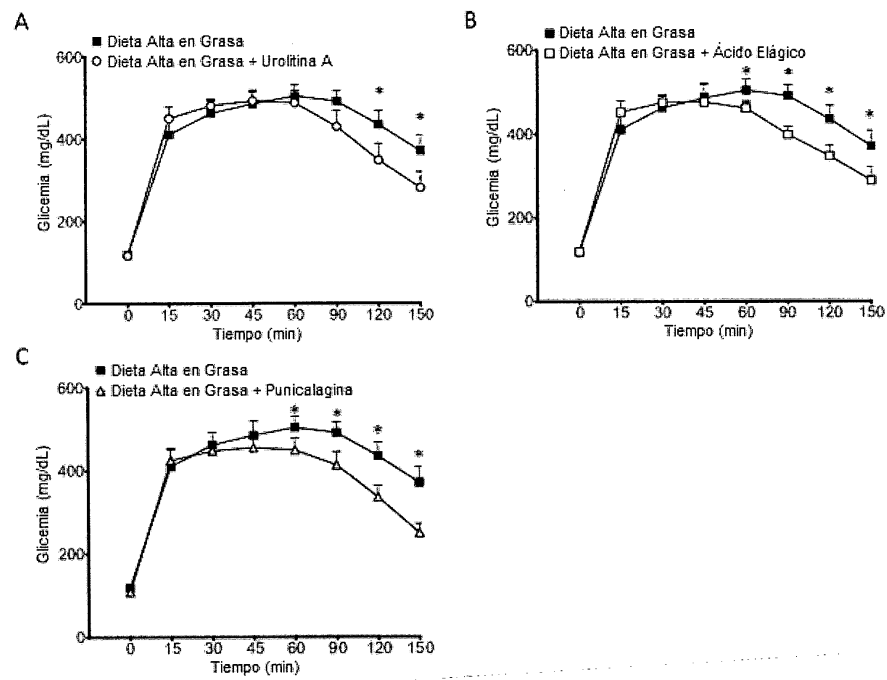


Figura 25

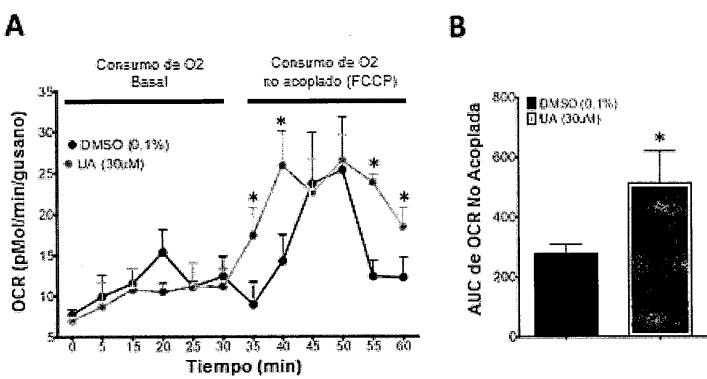


Figura 26

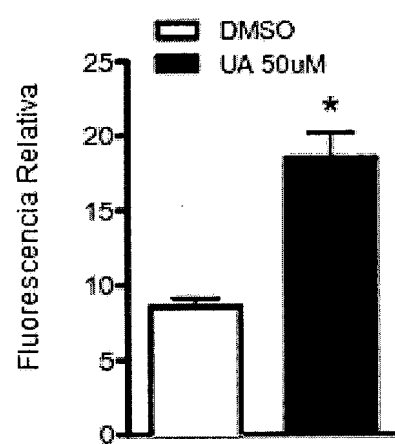


Figura 27

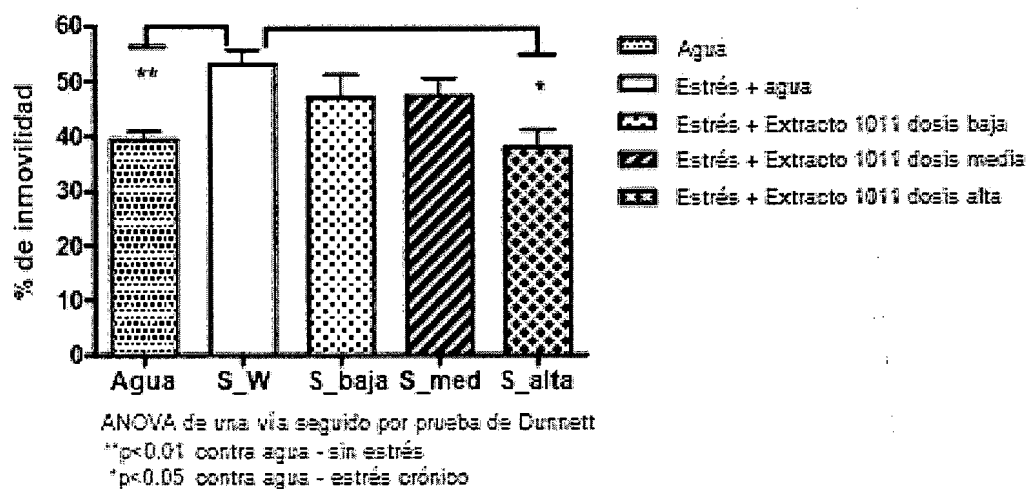


Figura 28

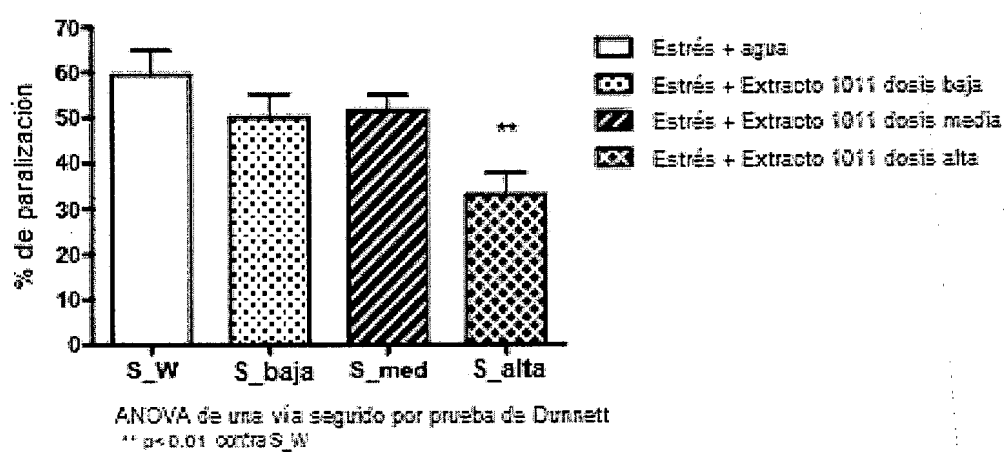


Figura 29

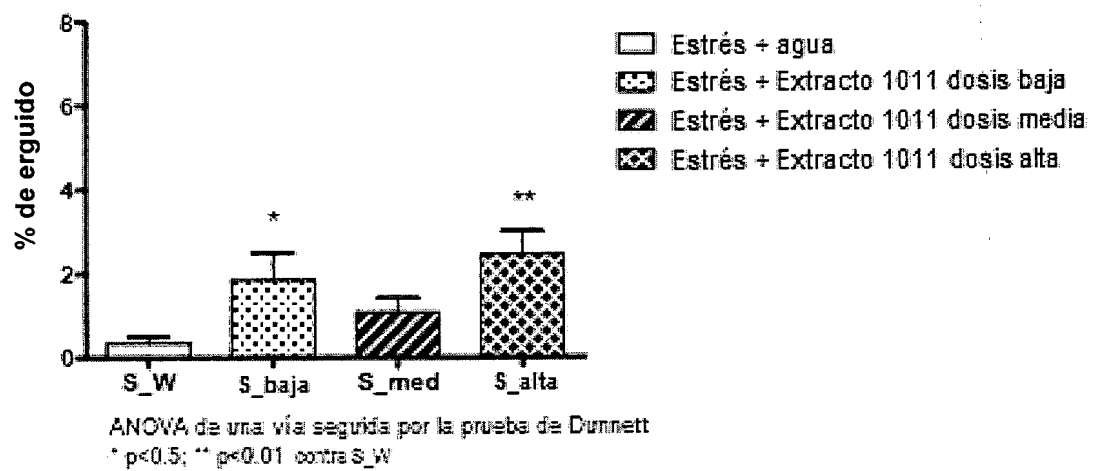


Figura 30

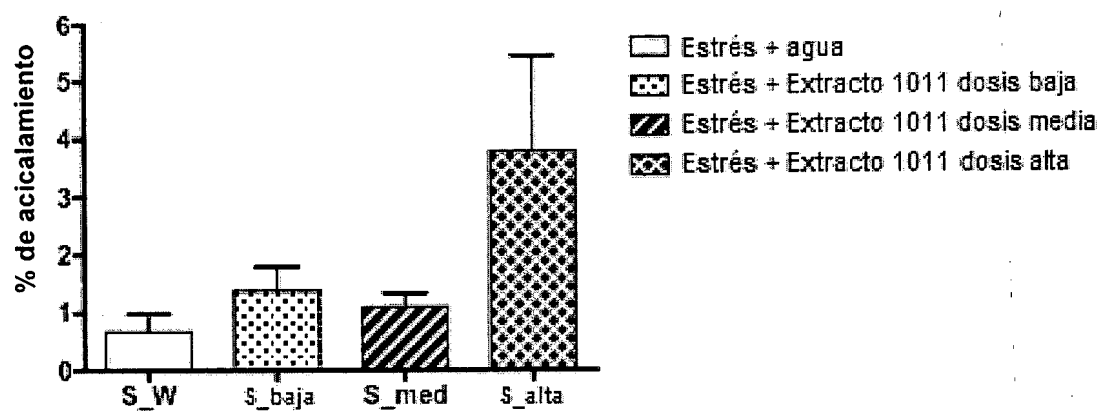


Figura 31

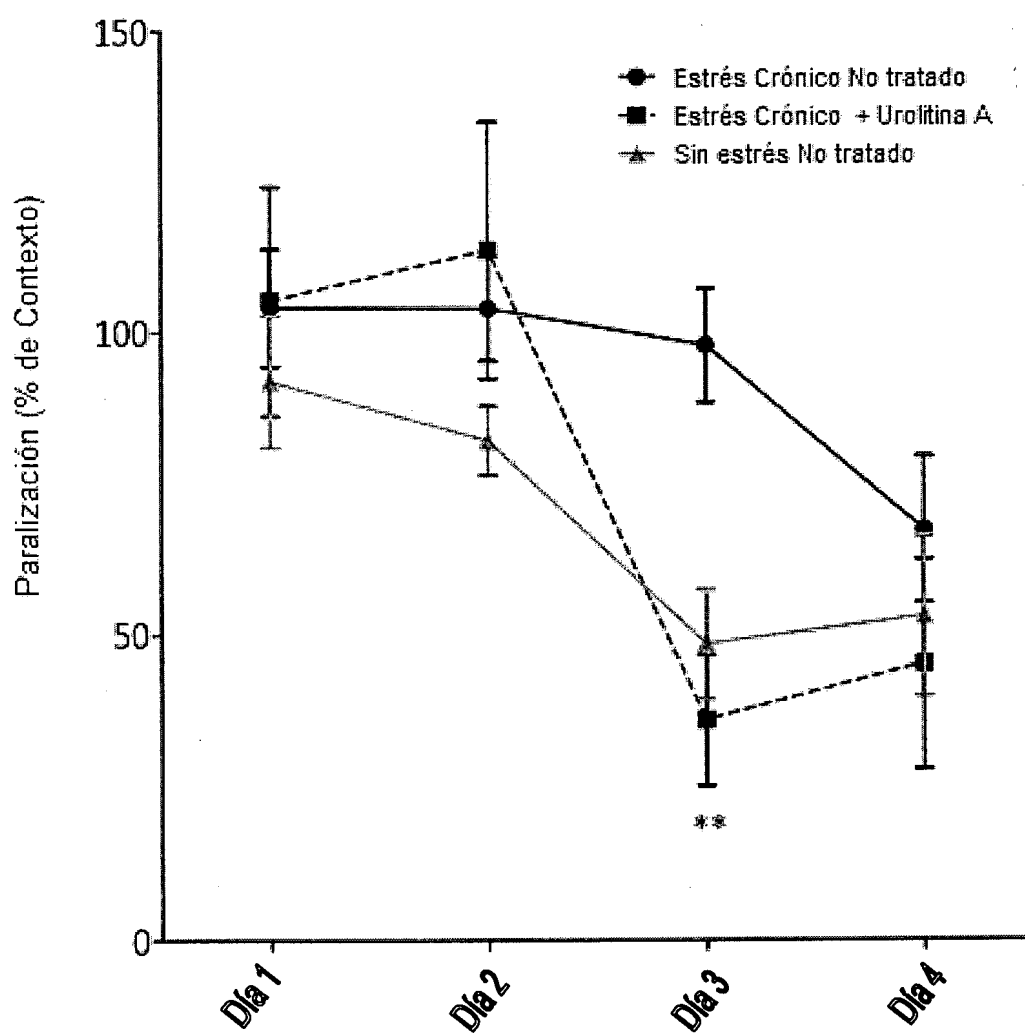


Figura 32

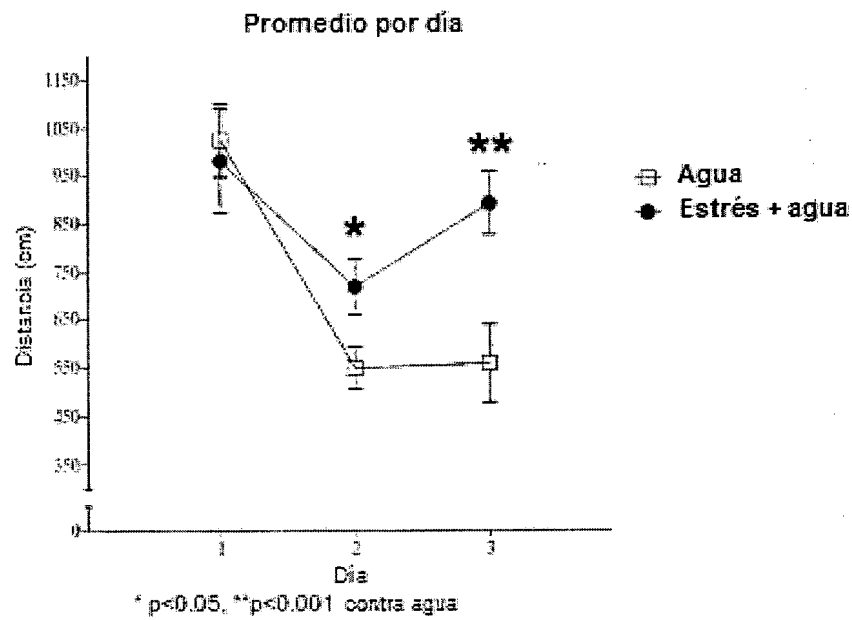


Figura 33

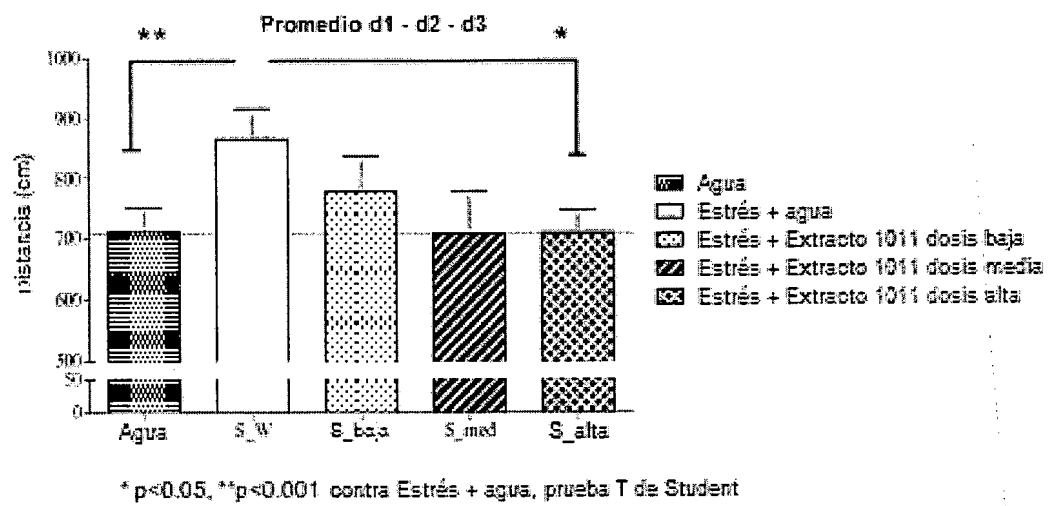


Figura 34

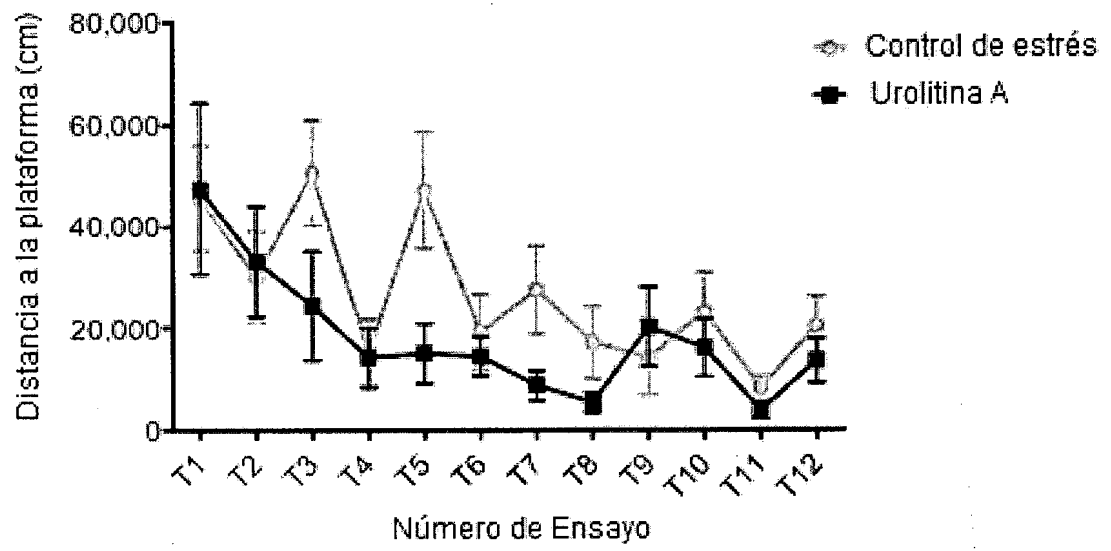


Figura 35

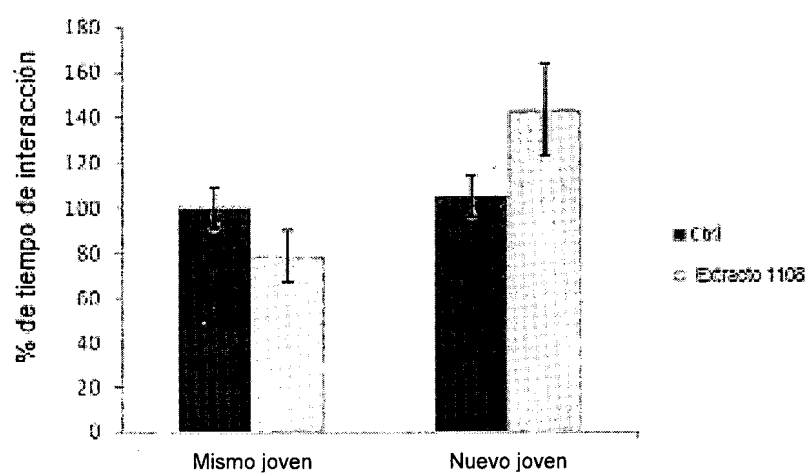


Figura 36

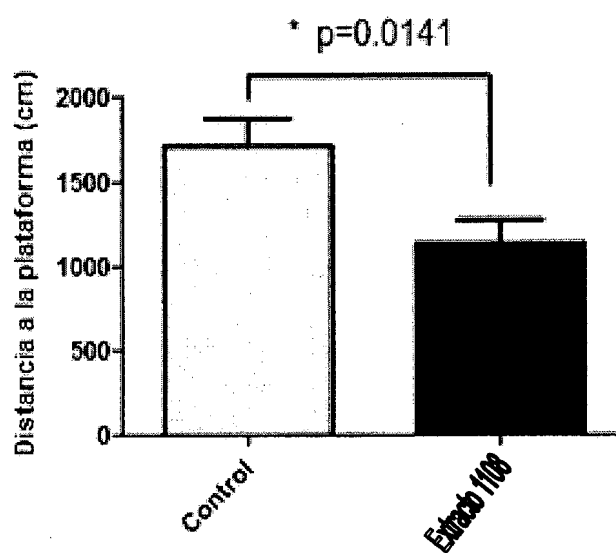
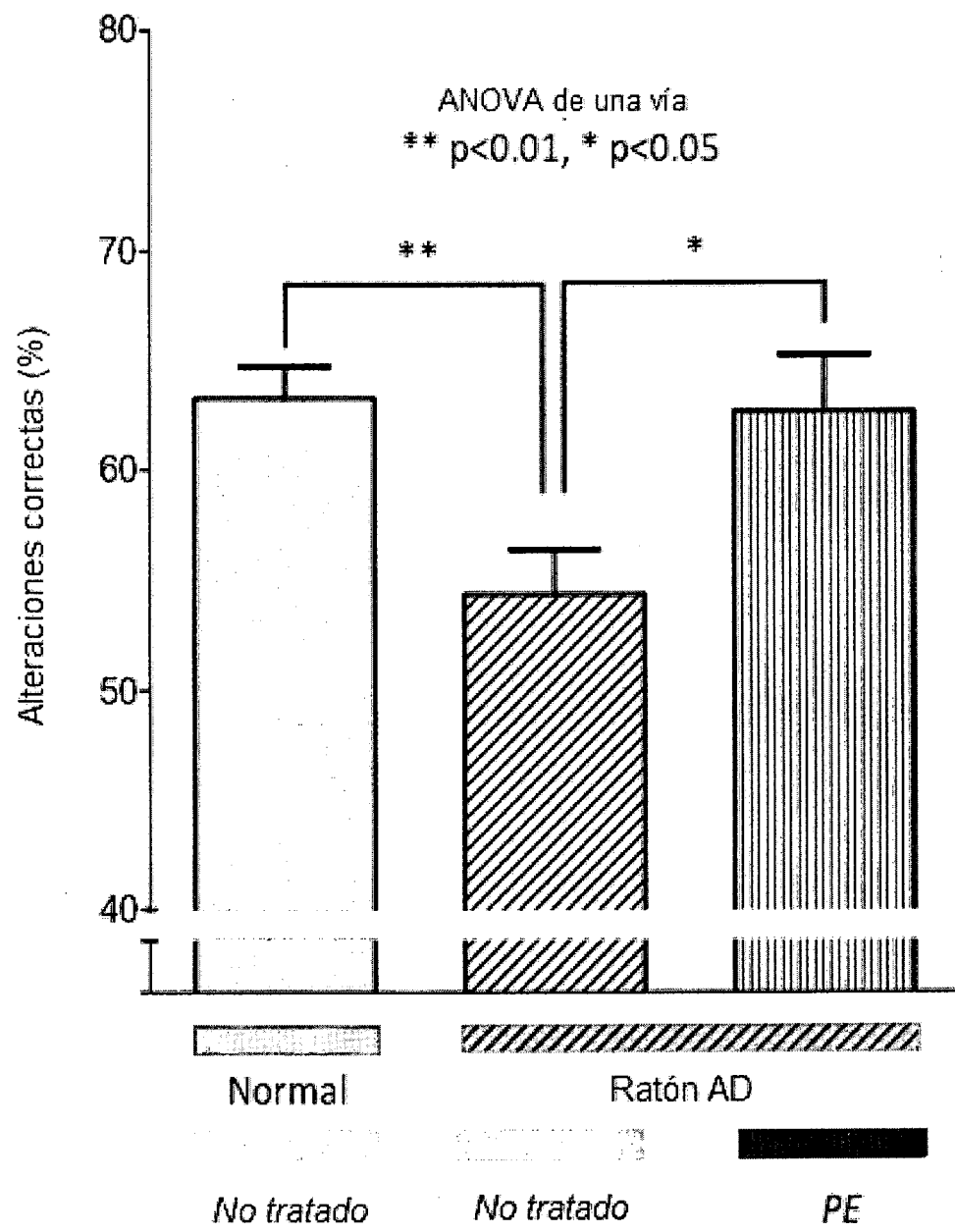


Figura 37



000238

Figura 38

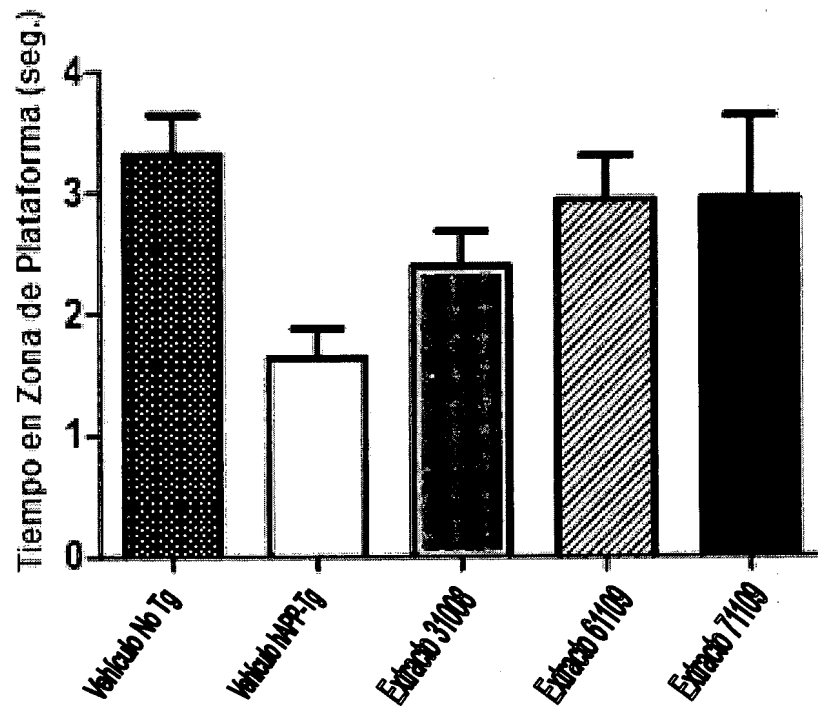
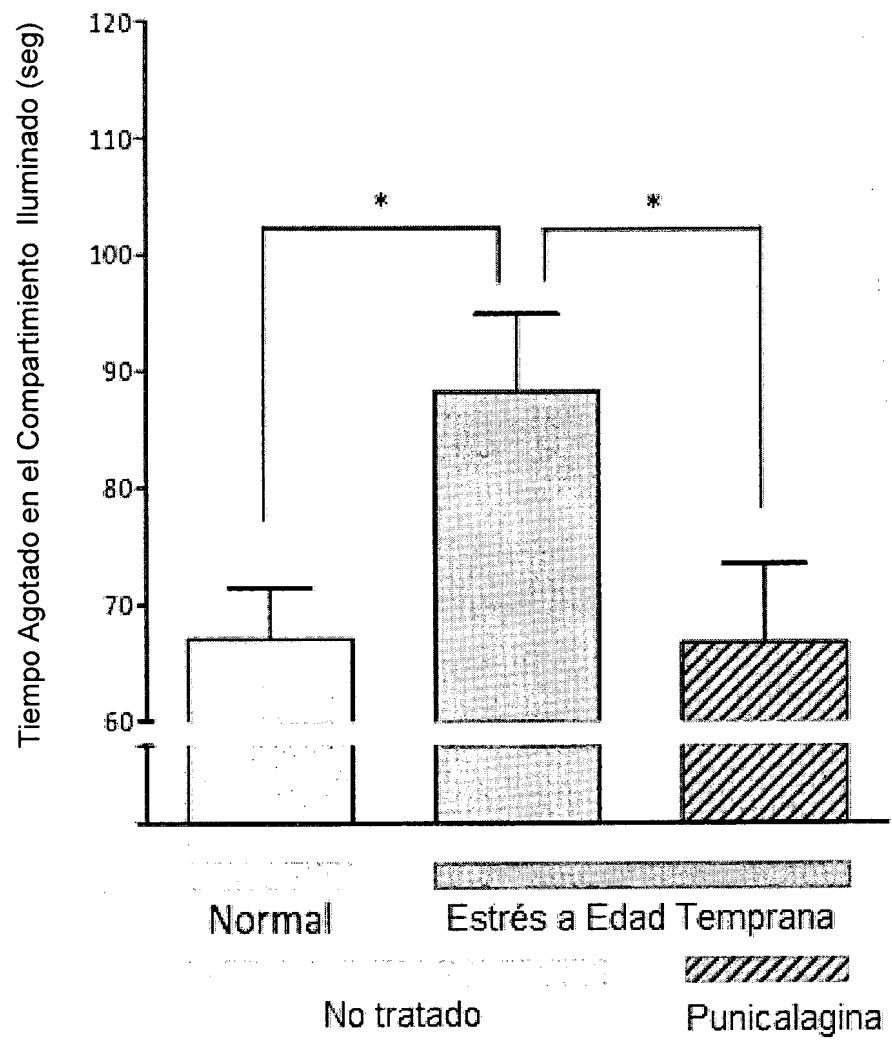
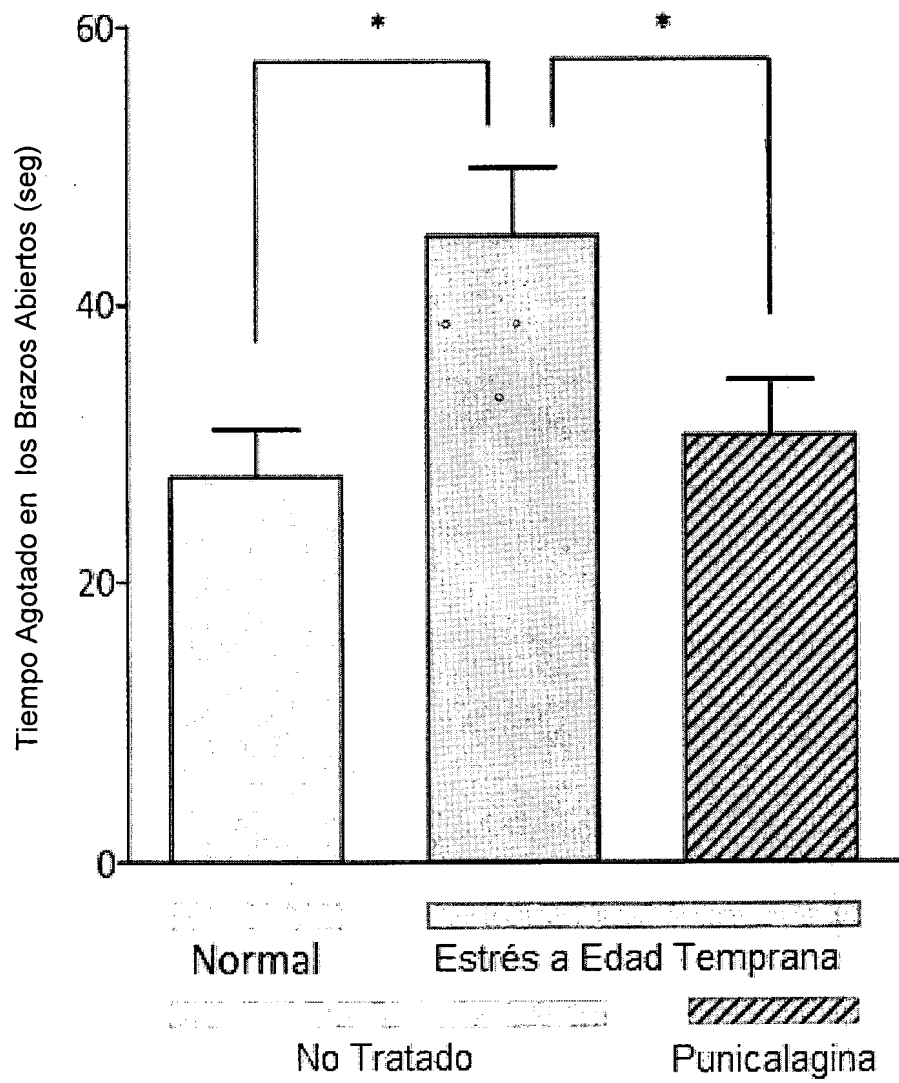


Figura 39



000240

Figura 40



000241

Figura 41

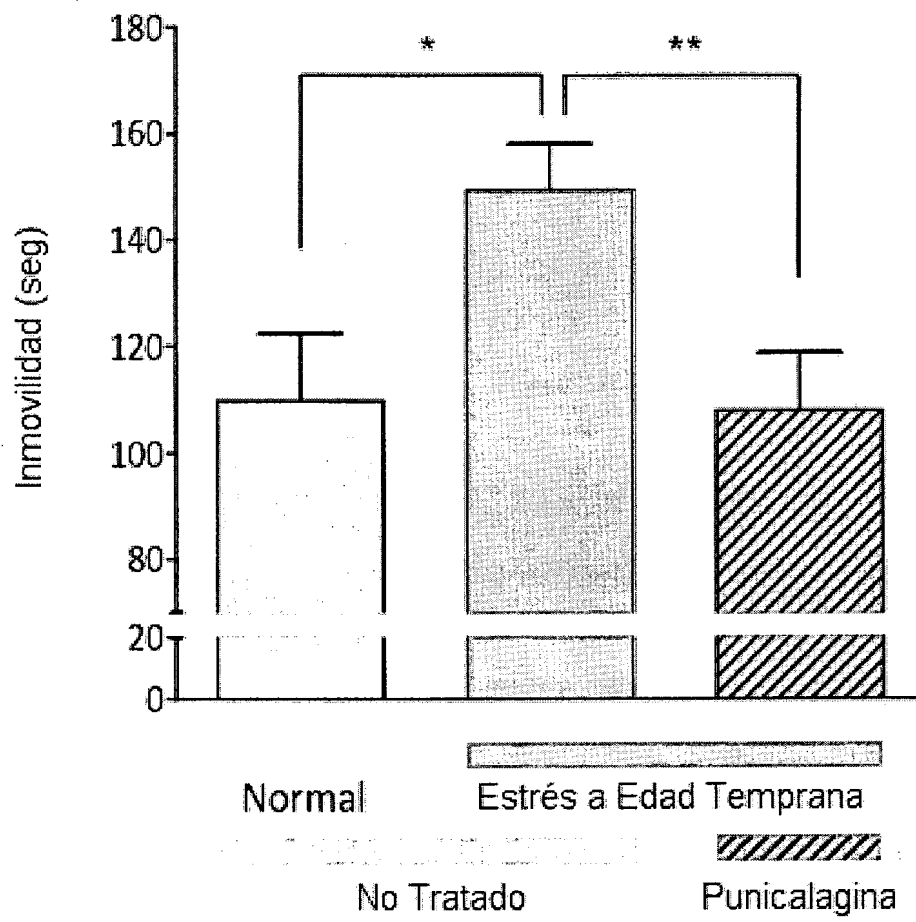
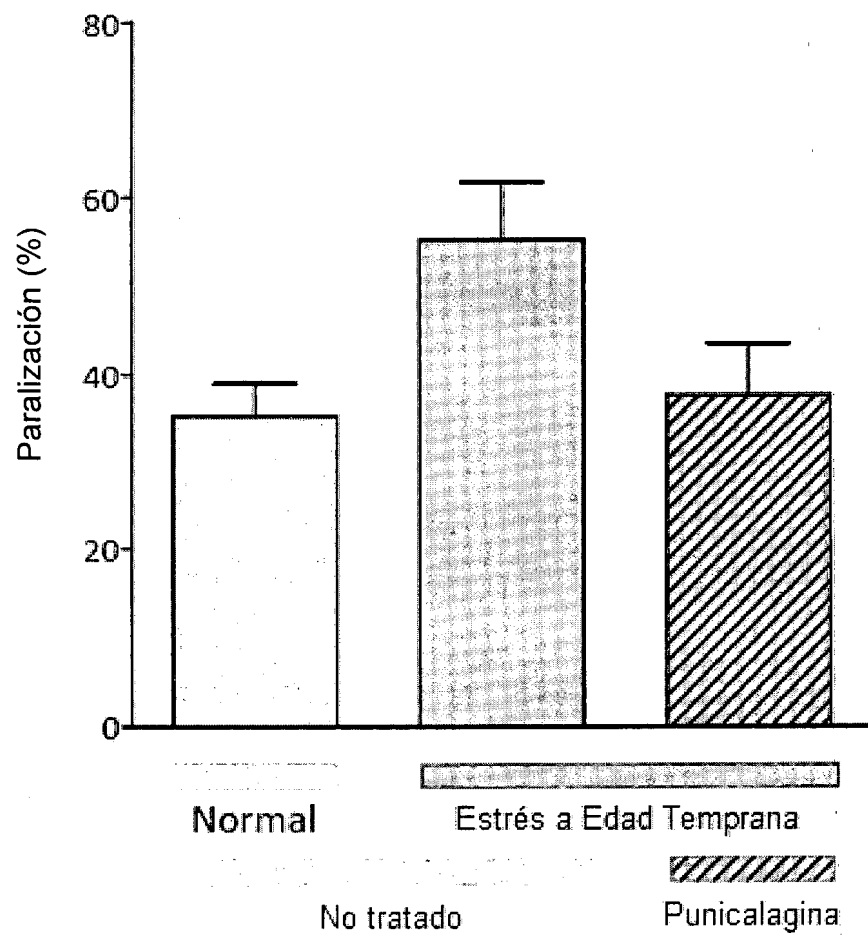
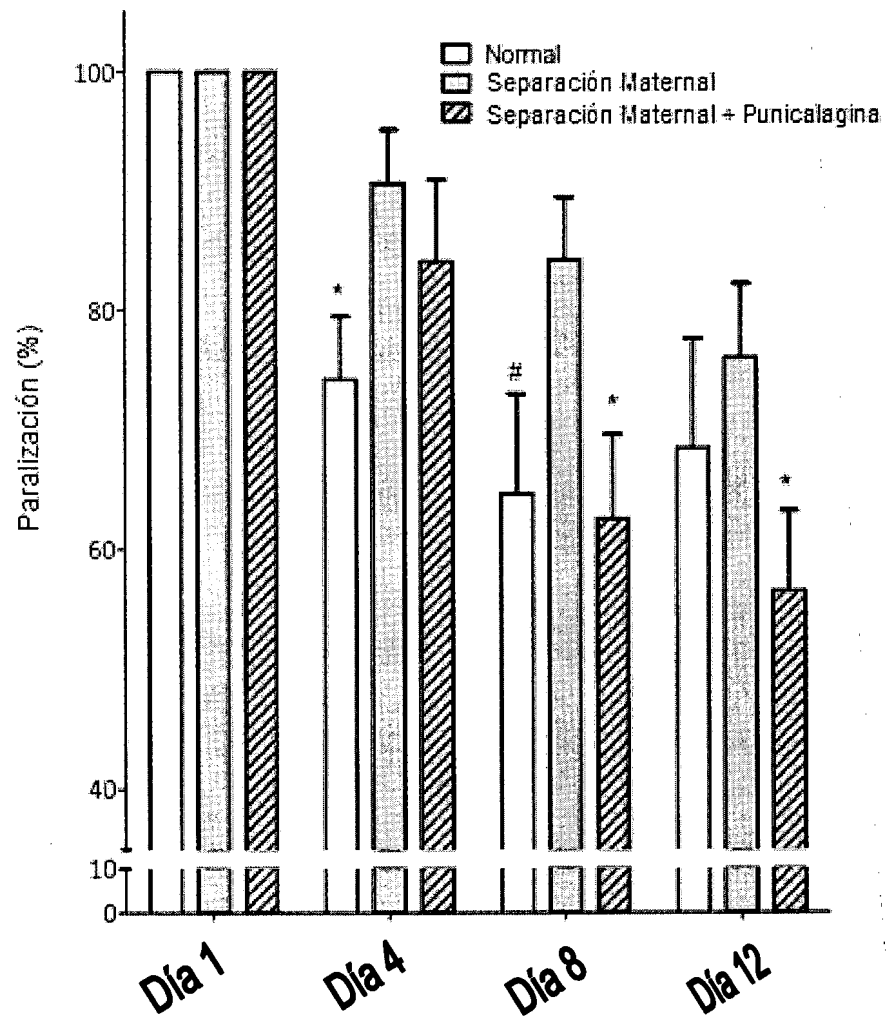


Figura 42



000243

Figura 43



000244

Figura 44

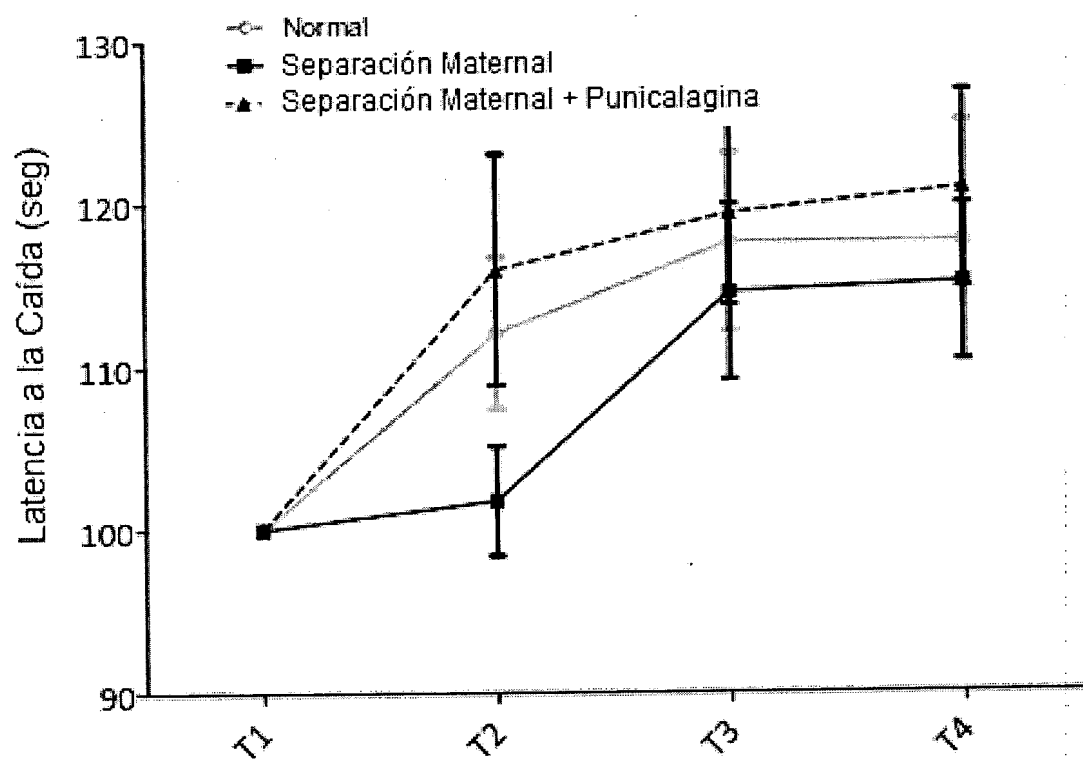
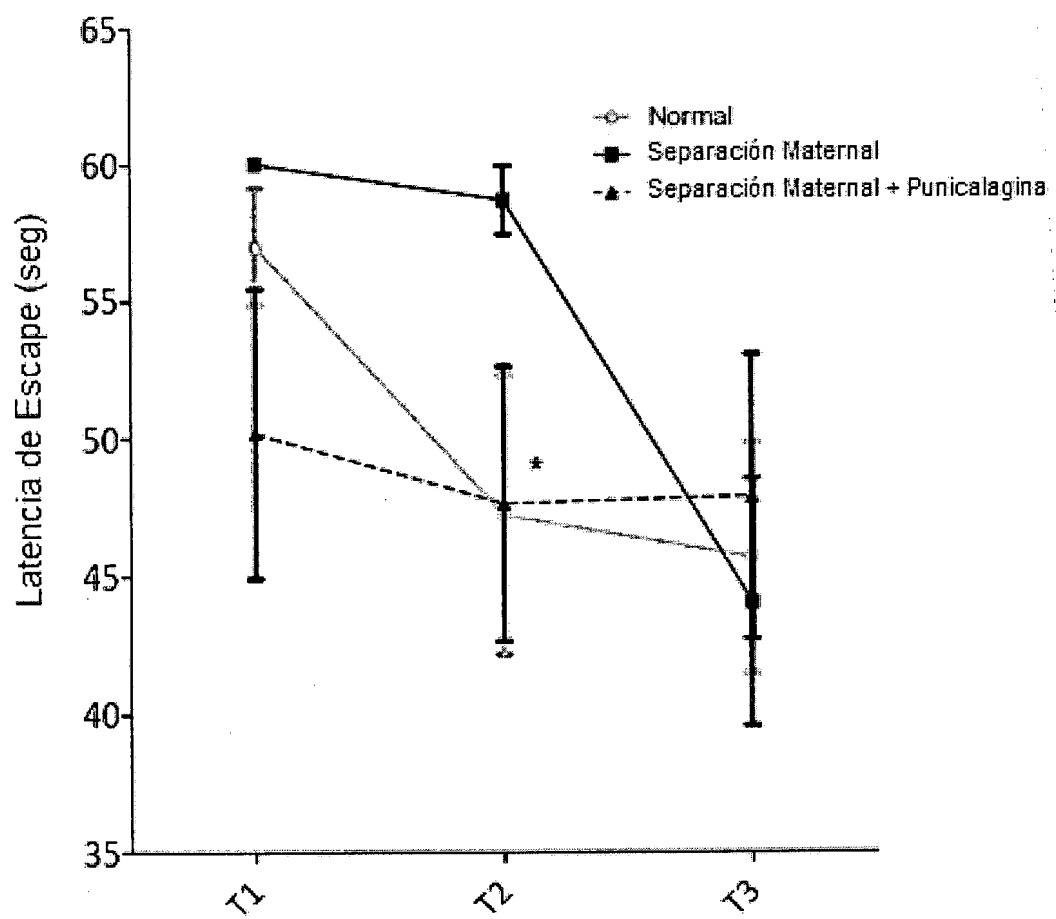
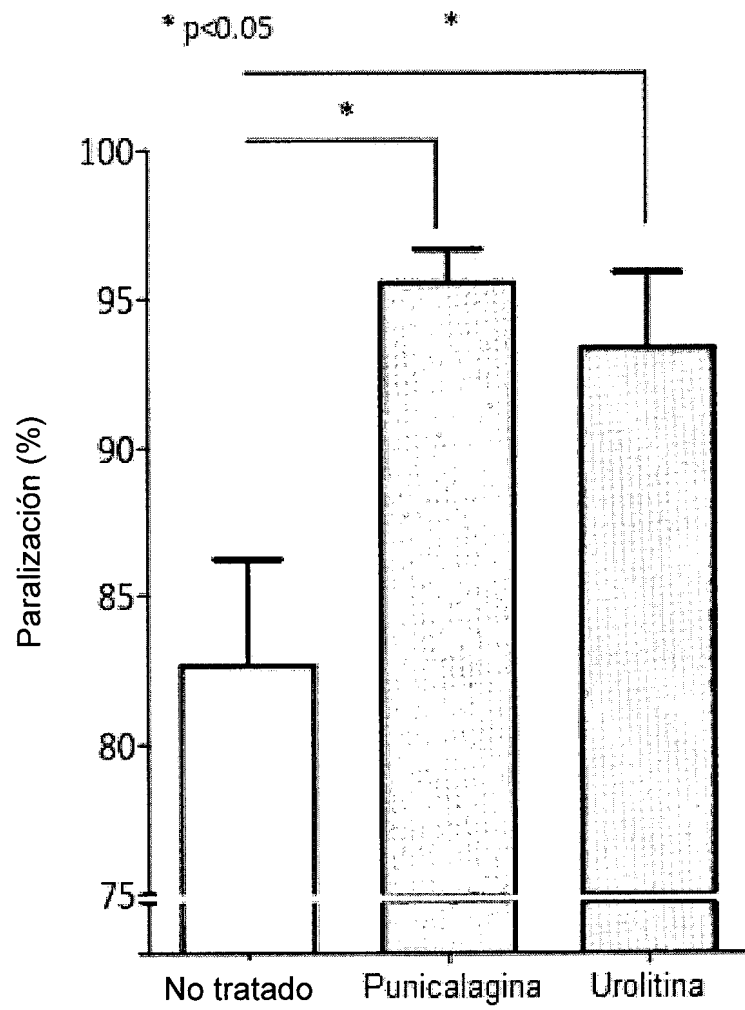


Figura 45



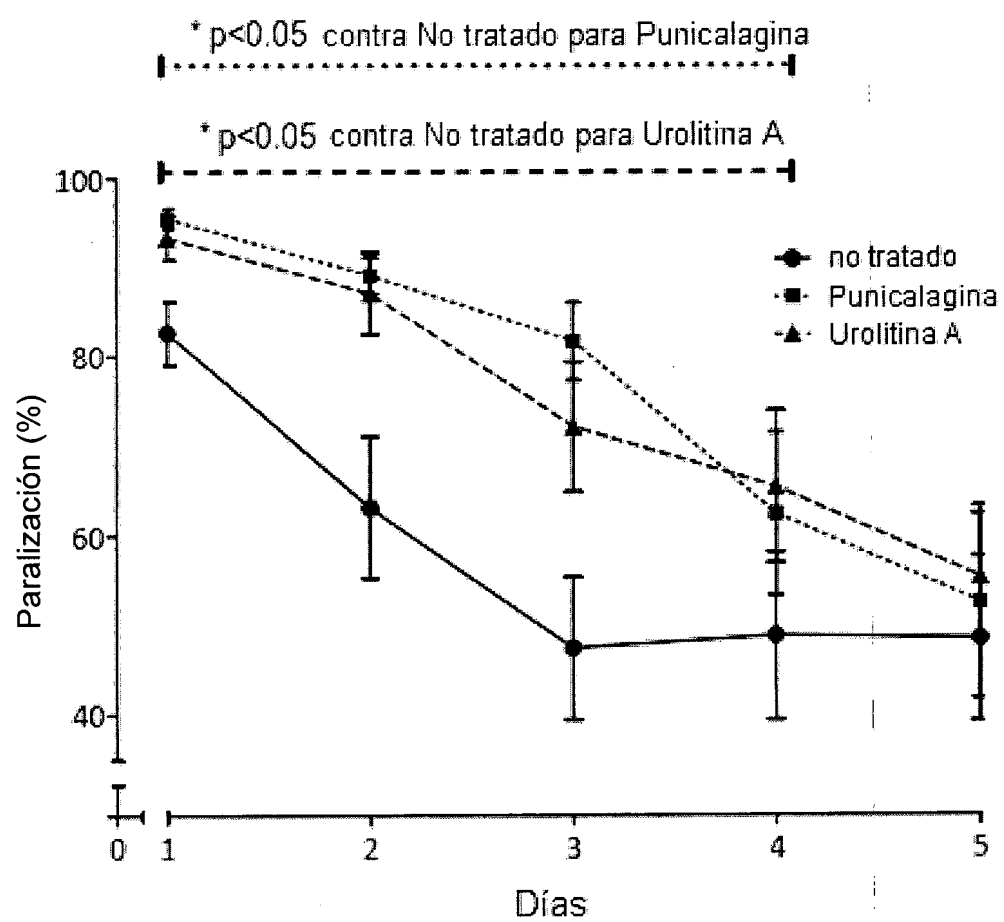
000246

Figura 46



000247

Figura 47



000248

Figura 48

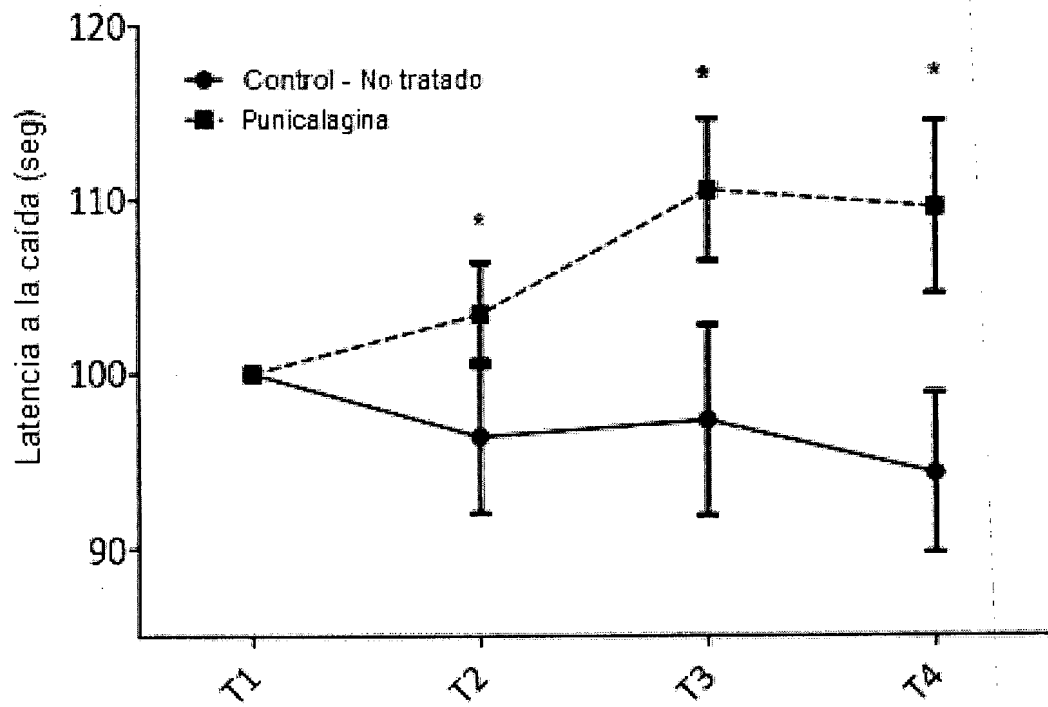
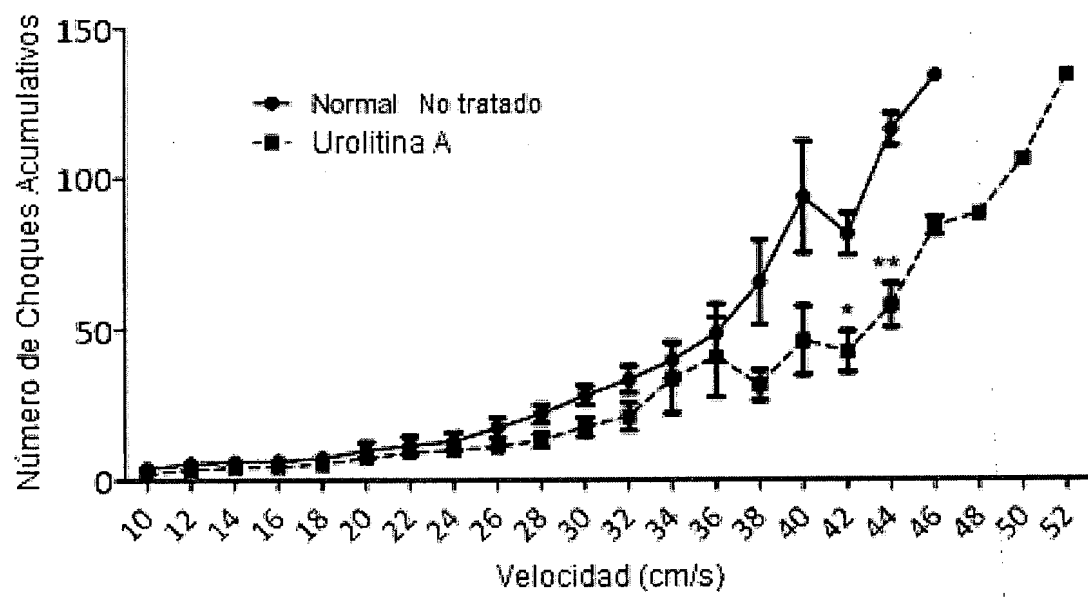


Figura 49



CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number

WO 2012/088519 A8

(43) International Publication Date
28 June 2012 (28.06.2012)

- (51) International Patent Classification:
A23L 1/30 (2006.01) A61K 36/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 36/185 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/067229
- (22) International Filing Date:
23 December 2011 (23.12.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/426,957 23 December 2010 (23.12.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
AMAZENTIS SA [CH/CH]; Parc Scientifique Epfl, Pse-c,
CH-1024 Ecublens (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): RINSCH, Chris-
topher, L. [US/CH]; 60 Rue De Lausanne, CH-1110
Morges (CH). BLANCO-BOSE, William [US/CH];
Chemin Chantemerle 13t, CH-1010 Lausanne (CH).
SCHNEIDER, Bernard [CH/CH]; Av. Des Cerisiers 37,
CH-1009 Pully (CH). THOMAS, Charles [FR/CH];
Chemin De La Mebre 18, CH-1033 Cheseaux-sur-lausanne
(CH). SANDI, Carmen [ES/CH]; Ch. De Roffens 2a, CH-
1121 Bremblens (CH). AUWERX, Johan [BE/CH]; 8 Rue
Roger De Lessert, CH-1168 Buchillon (CH). ANDREUX,
Penelope [FR/CH]; 3 Av d' Evian, CH-1006 Lausane
(CH). HOUTKOOPER, Richardus [NL/CH]; 5 Rue De
l'industrie, CH-1005 Lausanne (CH). PIRINEN, Eija
[FI/CH]; 24 Ch De Chandieu, CH-1006 Lausanne (CH).
MOUCHIROUD, Laurent [FR/CH]; Avenue De Cour
126, CH-1007 Lausanne (CH). GENOUX, David
[FR/CH]; 3 Rue De l'ancienne Douane, CH-1000
Lausanne (CH).
- (74) Agents: DEUTSCH, Stephen, B. et al.; Foley Hoag LLP,
155 Seaport Boulevard, Boston, MA 02210-2600 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report (Art. 21(3))
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))
- (88) Date of publication of the international search report:
13 September 2012
- (48) Date of publication of this corrected version:
8 November 2012
- (15) Information about Correction:
see Notice of 8 November 2012

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMPROVING MITOCHONDRIAL FUNCTION AND TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASES AND COGNITIVE DISORDERS

(57) Abstract: Provided are compositions comprising compounds or precursors to compounds which may be used for a variety of therapeutic applications including, for example, treating and/or preventing a disease or disorder related to reduced or inadequate mitochondrial activity, including aging or stress, diabetes, obesity, and neurodegenerative diseases. The compounds relate generally to urolithins and precursors thereof, including but not limited to ellagitannins and urolithin A. In certain embodiments the compositions are presented in or as food products or nutritional supplements. These same compounds and compositions can also be used advantageously in generally healthy individuals to increase or maintain metabolic rate, decrease percent body fat, increase or maintain muscle mass, manage body weight, improve or maintain mental performance (including memory), improve or maintain muscle performance, improve or maintain mood, and manage stress.

WO 2012/088519 A8

000051

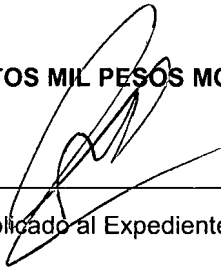
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0063557
		Bogotá D.C., Junio 27 de 2013 - 11:43:41

RECIBIDO DE : CLARKE MODET					NI 830.008.643
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	559956051	27/06/2013	74.410.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-172849- -00000-0000

Fecha: 2013-07-22 14:39:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

000252

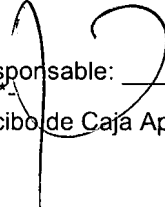
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0072230
		Bogotá D.C., Julio 22 de 2013 - 08:57:16

RECIBIDO DE : CLARKE MODET					NI 83.008.643
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	63462	27/06/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	63552	27/06/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	63553	27/06/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	63554	27/06/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	63602	27/06/2013		320.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
70 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	2.100.000.00
			\$2.100.000.00

SON: **DOS MILLONES CIENT MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-172849- -00000-0000

Fecha: 2013-07-22 14:39:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

000253



No. 13-172849-00000-0000

Fecha: 2013-07-22 14:39:37
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 253

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILI

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐