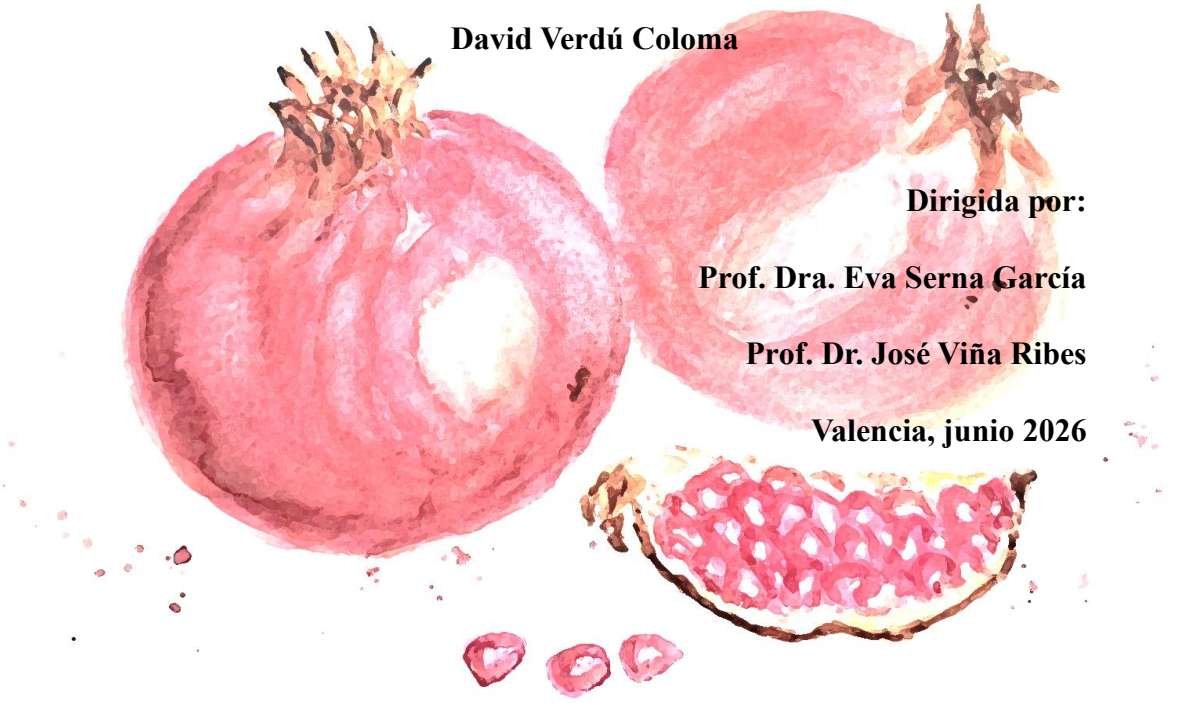
VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Doctorado en Fisiología
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina y Odontología

EFECTO DEL EXTRACTO DE GRANADA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ENVEJECIMIENTO

Tesis Doctoral presentada por:

David Verdú Coloma



Dirigida por:

Prof. Dra. Eva Serna García

Prof. Dr. José Viña Ribes

Valencia, junio 2026

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctorado en Fisiología

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina y Odontología

Prof. Dr. D. José Viña Ribes, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Prof. Dra. Dña Eva Serna García, Profesora titular del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el Sr. David Verdú Coloma, Graduado en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la presente Tesis Doctoral, titulada:

EFECTO DEL EXTRACTO DE GRANADA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ENVEJECIMIENTO

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, junio de 2026

Dra. Eva Serna García

EVA\| SERNA\| GARCIA

Firmado digitalmente por EVA\|SERNA\|GARCIA
Fecha: 2026.06.17 15:21:00 +02'00'

Dr. José Viña Ribes

JOSE VIÑA RIBES - NIF:19454510Y

Firmado digitalmente por JOSE VIÑA RIBES - NIF:19454510Y
Fecha: 2026.06.16 18:57:55 +02'00'

A todos los animales empleados para la ciencia

Financiación del proyecto

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos y ayudas: CB16/10/00435 (CIBERFES) del Instituto de Salud Carlos III; PID2019-110906RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 y RED2018-102576-T del Ministerio de Ciencia e Innovación; PROMETEO/2019/097 de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana; y el proyecto H2020-DIABFRAIL-LATAM financiado por la Unión Europea (Ref. 825546).

Asimismo, este trabajo recibió apoyo de la Iniciativa Conjunta de Programación Europea «Una Dieta Saludable para una Vida Saludable» (JPI HDHL) y del ERA-NET Cofund ERA-HDHL (Acuerdo de Subvención n.º 696295 del Programa Horizonte 2020 de la Unión Europea para la Investigación y la Innovación), así como de la Fundación Ramón Areces y la Fundación Soria Melguizo.

Parte del equipamiento empleado en esta investigación fue financiado por la Generalitat Valenciana y cofinanciado con fondos FEDER (Programa Operativo FEDER de la Comunitat Valenciana 2014–2020).

Agraïments

Esta tesi doctoral no representa únicament la culminació d'una etapa acadèmica; representa un procés vital. Han sigut anys d'aprenentatge, d'errors i d'encerts, de moments d'entusiasme i també de dubtes. Si alguna cosa he aprés durant este camí és que la ciència no és mai una construcció individual. La investigació és una xarxa de persones, de suports visibles i invisibles, d'esforços que s'entrellacen i fan possible que el coneixement avanci, pas a pas.

Vull començar agraint profundament a la meua tutora, Eva Serna, per la seua guia constant, per la seua exigència honesta i per la confiança que ha depositat en mi des del primer moment. Gràcies per ensenyar-me que el rigor i la humanitat no són incompatibles, que la ciència necessita pensament crític però també sensibilitat, i que formar persones investigadores implica molt més que dirigir experiments.

Al professor Jose Viña, gràcies per la inspiració, per la visió àmplia de la investigació i per defensar amb fermesa el paper transformador de la ciència en la societat. Al laboratori de Fisiologia Humana, gràcies per convertir-se en un espai de creixement personal i professional. Especialment a Aitor, Mar, Esther, Dani, Angela i Kristine, gràcies per cada dubte resolt, per cada consell compartit i per cada moment de complicitat.

Als membres del grup d'investigació ModulAhR; Mariola, Alicia, Andrea, Sol, Bego, Vero, Marta, Alexia i Elena, gràcies per sumar sempre i per construir un entorn de col·laboració real. Als companys i companyes de la

UCIM, veterinaris, tècnics i personal de neteja, especialment Ana, Aida, Clara, David, Carmen i Julia, gràcies per una tasca imprescindible que sovint queda fora dels focus però que sosté el dia a dia de la investigació.

A Teresa San Miguel, del servei de Patologia Humana, gràcies per la seua professionalitat i per la seua generositat compartint coneixement. Als companys i companyes de l'IIS La Fe, especialment Julia, gràcies per la vostra col·laboració.

Als amics i companys de Farmacologia; Nade, Ana, Alberto, Angela, Alexa, Inés i Cristina, gràcies per l'amistat i per compartir inquietuds i il·lusions. Vull agrair també de manera especial a Musta i Guadalupe, per la vostra ajuda, el vostre suport i per formar part d'esta etapa amb generositat i proximitat.

Un record molt especial per als companys i companyes de Madrid, amb qui vaig tindre l'oportunitat de compartir una estada que va marcar profundament la meua formació investigadora i personal. Gràcies, Miriam, Mario, Sara i Marta, per l'acollida, per la paciència, per ensenyar-me noves perspectives i per demostrar que la ciència també és intercanvi, obertura i creixement fora de la zona de confort. Aquella experiència va ampliar la meua mirada i va reforçar la meua vocació.

Vull dedicar unes paraules molt especials als estudiants predoctorals. Som, sovint, la força silenciosa dels laboratoris. Som qui repetim experiments fins que funcionen, qui assumim la frustració quan no ho fan, qui invertim hores invisibles en analitzar dades, revisar bibliografia, escriure i reescriure.

La recerca es sosté en gran part sobre la nostra vocació, moltes vegades en condicions d'incertesa. Reconèixer el valor del treball predoctoral és apostar pel futur de la ciència.

Igualment, esta tesi vol posar en valor totes aquelles persones que treballen des de posicions menys visibles o amb menor reconeixement: personal tècnic, administratiu, de manteniment i neteja. La ciència no és només qui signa els articles; és també qui prepara, cuida i sosté els espais on la investigació és possible. Cada engranatge és essencial.

Finalment, als meus familiars i amics, gràcies per ser refugi i motor. Per la paciència infinita, per entendre les absències i per celebrar cada xicotet avanç. Este assoliment també és vostre.

Esta tesi és el resultat d'un esforç compartit, d'una comunitat que creu en la importància del coneixement i en la necessitat de cuidar les persones que el fan possible.

Amb tot el meu agraïment,

Moltes gràcies.

RESUMEN

Resum

L'envelliment és un procés biològic complex, multifactorial i heterogeni, caracteritzat per l'acumulació progressiva de danys al llarg del temps i per la pèrdua gradual de l'homeòstasi. Aquest procés presenta una gran variabilitat entre individus, fet que explica la diferència entre edat cronològica i edat biològica. Diverses teories han intentat explicar-lo, des de les programades, relacionades amb mecanismes genètics, endocrins i immunològics, fins a les estocàstiques, centrades en el dany oxidatiu i els errors acumulatius. Actualment, s'entén l'envelliment com el resultat de la interacció de múltiples processos, com la senescència cel·lular, l'estrés oxidatiu, la disfunció mitocondrial, la inflamació i les alteracions metabòliques.

A nivell poblacional, l'envelliment demogràfic constitueix un repte sanitari i social de gran magnitud. L'augment de l'esperança de vida comporta una major prevalença de malalties cròniques, dependència funcional i fragilitat. Aquesta última es defineix com una pèrdua de reserva fisiològica que incrementa la vulnerabilitat davant situacions adverses, i s'associa amb caigudes, discapacitat i mortalitat. En aquest context, la promoció de l'envelliment saludable s'ha convertit en una prioritat, i els models experimentals resulten essencials per a estudiar possibles intervencions.

La magrana (*Punica granatum L.*) ha despertat un interés creixent com a aliment funcional per la seua riquesa en compostos bioactius,

especialment polifenols com les punicalagines. Aquests compostos presenten propietats antioxidants, antiinflamatòries i moduladores de l'expressió gènica, fet que els converteix en candidats d'interés per a la prevenció del deteriorament associat a l'edat.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser estudiar l'efecte de la suplementació amb extracte de magrana, concretament Pomanox® P30, en dos models animals d'envelliment: *Caenorhabditis elegans* i ratolins *Mus musculus*. Es va analitzar el seu impacte sobre la longevitat, la vitalitat, la funció física i cognitiva, així com sobre paràmetres bioquímics, cel·lulars, moleculars i histològics relacionats amb l'envelliment.

En *C. elegans*, es van estudiar diferents concentracions de l'extracte per a valorar la supervivència i la motilitat. Les dosis altes van resultar perjudicials, mentre que les intermèdies, especialment 0,05 i 0,1 mg/mL, van augmentar l'esperança de vida. La dosi de 0,05 mg/mL va ser la més efectiva, amb un increment de la vida mitjana i de l'activitat locomotora, fet que suggereix una millora de la longevitat i de la qualitat funcional de vida.

En el model murí, es van utilitzar ratolins adults, ratolins envellits i ratolins envellits suplementats amb extracte de magrana durant dotze setmanes. Es van avaluar el pes corporal, la composició corporal, la glucèmia, paràmetres bioquímics i hematològics, així com proves de força, coordinació, resistència i comportament. També es van analitzar marcadors d'estrés oxidatiu, apoptosi, inflamació i neurodegeneració, especialment en el cerebel i el còrtex cerebral.

Els resultats van mostrar que l'extracte de magrana no va modificar de manera rellevant la composició corporal, però sí que va atenuar la pèrdua de pes associada a l'edat. A nivell funcional, va millorar la coordinació motora i la integració sensoriomotora, especialment en les proves de Rotarod i escala inclinada. En canvi, la força de prensió i la resistència van mostrar canvis menys evidents. En l'àmbit conductual, la suplementació va millorar la motivació, l'activitat exploratòria i alguns indicadors relacionats amb la resposta a l'estrés.

Un dels efectes més destacats va ser la millora de l'equilibri redox. L'extracte va reduir l'oxidació del glutatió, va millorar la ràtio GSH/GSSG, va disminuir la peroxidació lipídica i va reduir la producció d'espècies reactives d'oxigen en leucòcits. A nivell cerebral, aquests efectes van ser especialment rellevants en el cerebel, on es va observar una reducció de marcadors d'inflamació, activació glial, complement i apoptosi. A més, l'estudi histològic va mostrar una millor preservació de l'arquitectura cerebel·losa i de les cèl·lules de Purkinje en els animals suplementats.

En conjunt, aquesta tesi demostra que l'extracte de magrana exerceix un efecte modulador sobre l'envelliment en models animals, amb beneficis sobre la longevitat, la funció motora, el comportament, l'estrés oxidatiu i la preservació del cerebel. Els seus efectes semblen dependre més de la regulació de l'equilibri redox, la neuroinflamació i l'apoptosi.

Resumen

El envejecimiento es un proceso biológico complejo, multifactorial y heterogéneo, caracterizado por la acumulación progresiva de daños a lo largo del tiempo y por la pérdida gradual de la homeostasis. Este proceso presenta una gran variabilidad entre individuos, hecho que explica la diferencia entre edad cronológica y edad biológica. Diversas teorías han intentado explicarlo, desde las programadas, relacionadas con mecanismos genéticos, endocrinos e inmunológicos, hasta las estocásticas, centradas en el daño oxidativo y los errores acumulativos. Actualmente, se entiende el envejecimiento como el resultado de la interacción de múltiples procesos, como la senescencia celular, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la inflamación y las alteraciones metabólicas.

A nivel poblacional, el envejecimiento demográfico constituye un reto sanitario y social de gran magnitud. El aumento de la esperanza de vida comporta una mayor prevalencia de enfermedades crónicas, dependencia funcional y fragilidad. Esta última se define como una pérdida de reserva fisiológica que incrementa la vulnerabilidad ante situaciones adversas, y se asocia con caídas, discapacidad y mortalidad. En este contexto, la promoción del envejecimiento saludable se ha convertido en una prioridad, y los modelos experimentales resultan esenciales para estudiar posibles intervenciones.

La granada (*Punica granatum L.*) ha despertado un interés creciente como alimento funcional por su riqueza en compuestos bioactivos,

especialmente polifenoles como las punicalaginas. Estos compuestos presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y moduladoras de la expresión génica, hecho que los convierte en candidatos de interés para la prevención del deterioro asociado a la edad.

El objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar el efecto de la suplementación con extracto de granada, concretamente Pomanox® P30, en dos modelos animales de envejecimiento: *Caenorhabditis elegans* y ratones *Mus musculus*. Se analizó su impacto sobre la longevidad, la vitalidad, la función física y cognitiva, así como sobre parámetros bioquímicos, celulares, moleculares e histológicos relacionados con el envejecimiento.

En *C. elegans*, se estudiaron diferentes concentraciones del extracto para valorar la supervivencia y la motilidad. Las dosis altas resultaron perjudiciales, mientras que las intermedias, especialmente 0,05 y 0,1 mg/mL, aumentaron la esperanza de vida. La dosis de 0,05 mg/mL fue la más efectiva, con un incremento de la vida media y de la actividad locomotora, hecho que sugiere una mejora de la longevidad y de la calidad funcional de vida.

En el modelo murino, se utilizaron ratones adultos, ratones envejecidos y ratones envejecidos suplementados con extracto de granada durante doce semanas. Se evaluaron el peso corporal, la composición corporal, la glucemia, parámetros bioquímicos y hematológicos, así como pruebas de fuerza, coordinación, resistencia y comportamiento. También se analizaron marcadores de estrés oxidativo, apoptosis, inflamación y neurodegeneración, especialmente en el cerebelo y la corteza cerebral.

Los resultados mostraron que el extracto de granada no modificó de manera relevante la composición corporal, pero sí atenuó la pérdida de peso asociada a la edad. A nivel funcional, mejoró la coordinación motora y la integración sensoriomotora, especialmente en las pruebas de Rotarod y escalera inclinada. En cambio, la fuerza de agarre y la resistencia mostraron cambios menos evidentes. En el ámbito conductual, la suplementación mejoró la motivación, la actividad exploratoria y algunos indicadores relacionados con la respuesta al estrés.

Uno de los efectos más destacados fue la mejora del equilibrio redox. El extracto redujo la oxidación del glutatión, mejoró la ratio GSH/GSSG, disminuyó la peroxidación lipídica y redujo la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos. A nivel cerebral, estos efectos fueron especialmente relevantes en el cerebelo, donde se observó una reducción de marcadores de inflamación, activación glial, complemento y apoptosis. Además, el estudio histológico mostró una mejor preservación de la arquitectura cerebelosa y de las células de Purkinje en los animales suplementados.

En conjunto, esta tesis demuestra que el extracto de granada ejerce un efecto modulador sobre el envejecimiento en modelos animales, con beneficios sobre la longevidad, la función motora, el comportamiento, el estrés oxidativo y la preservación morfológica del cerebelo. Sus efectos parecen depender más de la regulación del equilibrio redox, la neuroinflamación y la apoptosis.

Summary

Aging is a complex, multifactorial and heterogeneous biological process characterized by the progressive accumulation of damage over time and by the gradual loss of homeostasis. This process presents great variability among individuals, which explains the difference between chronological age and biological age. Various theories have attempted to explain it, from programmed theories, related to genetic, endocrine and immunological mechanisms, to stochastic theories, focused on oxidative damage and accumulated errors. Currently, aging is understood as the result of the interaction of multiple processes, such as cellular senescence, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation and metabolic alterations.

At the population level, demographic aging constitutes a health and social challenge of great magnitude. The increase in life expectancy entails a higher prevalence of chronic diseases, functional dependence and frailty. The latter is defined as a loss of physiological reserve that increases vulnerability to adverse situations and is associated with falls, disability and mortality. In this context, the promotion of healthy aging has become a priority, and experimental models are essential to study possible interventions.

Pomegranate (*Punica granatum L.)* has attracted increasing interest as a functional food due to its richness in bioactive compounds, especially polyphenols such as punicalagins. These compounds present antioxidant,

anti-inflammatory and gene expression modulating properties, which makes them candidates of interest for the prevention of age-associated deterioration.

The objective of this doctoral thesis was to study the effect of supplementation with pomegranate extract, specifically Pomanox® P30, in two animal models of aging*: Caenorhabditis elegans* and *Mus musculus* mice. Its impact on longevity, vitality, physical and cognitive function was analyzed, as well as biochemical, cellular, molecular and histological parameters related to aging.

In *C. elegans*, different concentrations of the extract were studied to assess survival and motility. High doses proved harmful, whereas intermediate doses, especially 0.05 and 0.1 mg/mL, increased lifespan. The 0.05 mg/mL dose was the most effective, with an increase in mean lifespan and locomotor activity, suggesting an improvement in longevity and functional quality of life.

In the murine model, adult mice, aged mice and aged mice supplemented with pomegranate extract for twelve weeks were used. Body weight, body composition, glycemia, biochemical and hematological parameters, as well as strength, coordination, endurance and behavioral tests were evaluated. Markers of oxidative stress, apoptosis, inflammation and neurodegeneration were also analyzed, especially in the cerebellum and cerebral cortex.

The results showed that pomegranate extract did not significantly modify body composition, but it did attenuate age-associated weight loss. At the functional level, it improved motor coordination and sensorimotor integration, especially in the Rotarod and inclined ladder tests. In contrast, grip strength and endurance showed less evident changes. In the behavioral field, supplementation improved motivation, exploratory activity and some indicators related to stress response.

One of the most remarkable effects was the improvement of redox balance. The extract reduced glutathione oxidation, improved the GSH/GSSG ratio, decreased lipid peroxidation and reduced the production of reactive oxygen species in leukocytes. At the cerebral level, these effects were especially relevant in the cerebellum, where a reduction in markers of inflammation, glial activation, complement and apoptosis was observed. In addition, the histological study showed a better preservation of cerebellar architecture and Purkinje cells in supplemented animals.

Overall, this thesis demonstrates that pomegranate extract exerts a modulatory effect on aging in animal models, with benefits on longevity, motor function, behavior, oxidative stress and cerebellar preservation. Its effects seem to depend more on the regulation of redox balance, neuroinflammation and apoptosis.

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Area Bajo la Curva
B2m	Microglobulina Beta-2
Casp3	Caspasa 3
Casp8	Caspasa 8
Casp9	Caspasa 9
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
CP	Células de Purkinje
CPHs	Células de Purkinje heterotópicas
CPK	Creatina fosfoquinasa
Ctss	Catepsina S
C1qa	Subunidad A del Complemento C1q
C4b	Componente del complemento 4B
DCF	Diclorofluoresceína
DEXA	Absorciometría de rayos X de doble energía
DHR123	Dihidrorrodamina 123
EG	Extracto de granada
EPMT	Prueba del laberinto elevado en brazos cruzados
FUdR	5-Fluoro-2'-desoxiuridina
Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Gfap	Proteína ácida glial fibrilar
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento – espectrometría de masas
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lzp-s	Proteína similar a la lisozima
MDA	Malondialdehído
MitoPY	Sonda fluorescente mitocondrial
NGM	Medio de crecimiento de nematodos
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTG	Prueba de tolerancia a la glucosa
RT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SEM	Error estándar de la media
TBA	Ácido tiobarbitúrico
tBHP	Hidroperóxido de tert-butilo
UA	Unidades Arbitrarias
UCIM	Unitat Central d'Investigació de la Facultat de Medicina
UPLC	Cromatografía líquida de ultrarendimiento

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN **2**

1. El envejecimiento 1

1.1. Concepto fisiológico y biológico: un difícil consenso entre la comunidad científica *1*

1.2. Teorías del envejecimiento *2*

1.3. Demografía del envejecimiento y su impacto en la salud pública actual *5*

1.3.1. El panorama internacional *5*

1.3.2. España: Un país longevo y con calidad de vida *7*

1.3.3. El envejecimiento en la Comunitat Valenciana *9*

1.3.4. El envejecimiento saludable y el manejo de la fragilidad: Una meta a alcanzar en la agenda 2030 ..... *11*

1.4. Uso de modelos experimentales en la investigación del envejecimiento *16*

1.4.1. Modelos invertebrados *16*

1.4.2. Modelos vertebrados *17*

2. La granada y su relevancia en el envejecimiento 19

2.1. Biocomponentes de la granada *20*

2.2. Uso de la granada en investigación *22*

OBJETIVOS **26**

Objetivo general 26

Objetivos específicos 26

MATERIALES Y MÉTODOS **30**

1. Extracto de granada 28

2. Estudio en el modelo *C. elegans* 30

2.1. Cepas empleadas *30*

2.2. Diseño experimental *30*

2.3. Ensayos de esperanza de vida *31*

2.4. Ensayos de vitalidad o motilidad *33*

3. ESTUDIO EN MODELO MURINO ENVEJECIDO 34

3.1. Animales de experimentación y condiciones de estabulación *34*

3.2. Diseño experimental *35*

3.3. Seguimiento del peso corporal *37*

3.4. Estudio antropométrico mediante absorciometría con rayos X de doble energía *37*

3.5. Determinación de parámetros hematológicos y bioquímicos en sangre total *39*

3.6. Prueba de tolerancia a la glucosa *40*

3.7. Evaluaciones funcionales y pruebas físicas *42*

3.8. Estudios cognitivos y de comportamiento *52*

3.9. Determinación de los niveles de GSH y GSSG en sangre periférica *59*

3.10. Determinación de malondialdehído mediante cromatografía líquida de ultra alta precisión en plasma, cerebelo y córtex *60*

3.11. Estudio de la expresión génica mediante PCR a tiempo real en cerebelo y córtex *63*

3.12. Análisis por citometría de flujo de la producción de especies oxidativas *68*

3.13. Estudio histológico del cerebelo *72*

Realización de cortes y tinción con hematoxilina y eosina *73*

Cuantificación del estudio histológico *75*

3.14. Análisis estadísticos *77*

RESULTADOS 81

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON EG EN UN MODELO DE *C. ELEGANS* 80

1.1. Estudio de esperanza de vida *80*

1.2. Estudio de la vitalidad *83*

2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON EG EN MODELO MURINO ENVEJECIDO 84

2.1. Estudio antropométrico y de seguimiento del peso corporal en ratones envejecidos suplementados con EG *85*

2.1.1.Estudio de parámetros antropométricos 85

2.1.2.Estudio de la evolución del peso corporal 86

2.2. Estudio hematológico y bioquímico en ratones envejecidos suplementados con extracto de granada 87

2.3. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones envejecidos suplementados con EG 90

2.4. Estudios funcionales y pruebas físicas en ratones envejecidos suplementados con EG 92

2.5. Estudios cognitivos y de comportamiento 96

2.6. Estudio del estado oxidativo en sangre total, plasma, cerebelo y córtex cerebral de ratones envejecidos suplementados con extracto de granada 100

2.6.1. ..... Determinación de la ratio GSH/GSSG en sangre total 100

2.6.2. Determinación de la peroxidación lipídica en plasma, cerebelo y córtex cerebral..... 102

2.7. Estudio de la expresión génica mediante RT-PCR en el cerebelo y el córtex cerebral 104

2.7.1.Estudio de expresión génica de biomarcadores de envejecimiento cerebral 104

2.7.2.Estudio del gen B2M involucrado en el deterioro cognitivo 106

2.7.3.Estudio de expresión génica sobre marcadores de apoptosis 108

2.8.Estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante citometría de flujo 111

2.8.1. Estudio de niveles basales de ROS citoplasmáticas y mitocondriales en sangre periférica 111

2.8.2. ..Estudio de niveles inducidos de ROS citoplasmáticos y mitocondriales en sangre periférica tratada con un agente prooxidante..... 114

2.9.Estudio histológico del cerebelo..... 117

DISCUSIÓN.....127

1. La suplementación con EG prolonga la vida y promueve la vitalidad en el modelo *C. elegans* 125

2. La suplementación con EG mejora la coordinación motora, además de atenuar la pérdida de peso involuntaria asociada a la edad sin alterar los parámetros antropométricos en el modelo murino 130

3. La suplementación con EG modula la conducta espontánea y de comportamiento en el envejecimiento murino 134

4. La suplementación con EG modula el metabolismo de la glucosa sin alterar los parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones envejecidos 138

5. La suplementación con EG muestra un efecto antioxidante sistémico mejorando la ratio GSH/GSSG sanguínea y reduciendo la peroxidación lipídica cerebelosa 143

6. Cambios transcripcionales asociados al envejecimiento en cerebelo y córtex cerebral y efectos moduladores de la suplementación con EG 146

7. El EG reduce el estrés oxidativo basal y mejora la respuesta celular frente al daño oxidativo inducido en células sanguíneas de ratones envejecidos 148

8. Evaluación histológica del cerebelo envejecido y papel del EG en la preservación de la arquitectura neuronal 153

CONCLUSIONES 159

BIBLIOGRAFÍA 165

ANEXOS 200

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tamaño de la población mundial y tasa de crecimiento anual: estimación y proyecciones 1950-2050.

Figura 2. Evolución poblacional de España separadas por sexo.

Figura 3. Evolución y previsión del porcentaje de población de más de 65 años en las provincias de Alicante, Castellón y Valencia entre 2014 y 2033.

Figura 4. Patogénesis del síndrome de fragilidad.

Figura 5. Estructura química de los principales compuestos fenólicos del fruto de la granada.

Figura 6. Diseño del estudio de esperanza de vida en *C. elegans* alimentados con NMG o NMG + EG.

Figura 7. Diseño experimental empleado en el modelo murino envejecido.

Figura 8. Imágenes adquiridas por el sistema DEXA.

Figura 9. Diseño experimental para la prueba de tolerancia a la glucosa.

Figura 10. Diseño de las evaluaciones funcionales realizadas en ratones de 18 meses y de 22 meses con y sin suplementación con EG.

Figura 11. Fotografía representativa de la evaluación de la coordinación motora mediante el sistema Rotarod.

Figura 12. Representación de la evaluación de la fuerza de agarre mediante dinamómetro.

Figura 13. Representación de la evaluación de la resistencia mediante la carrera incremental en cinta rodante.

Figura 14. Representación de la evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de la escalera inclinada.

Figura 15. Diseño experimental de las pruebas de comportamiento empleadas.

Figura 16. Representación de la prueba de excavación para determinar la capacidad exploratoria de los roedores.

Figura 17. Diseño experimental de la prueba de la superficie perforada donde se determina la capacidad exploratoria.

Figura 18. Diseño experimental de la prueba del laberinto en brazos cruzados elevados para estudiar el comportamiento y la ansiedad.

Figura 19. Diseño experimental para la determinación de los niveles de GSH y GSSG en sangre total.

Figura 20. Diseño experimental de la determinación de MDA mediante UPLC en plasma, cerebelo y córtex.

Figura 21. Proceso de extracción de ARN total de cerebelo y córtex cerebral.

Figura 22. Diseño experimental del estudio de citometría de flujo en sangre periférica para determinar los niveles de ROS en condiciones basales y tratadas con tBHP (50 µM).

Figura 23. Efecto del EG a diferentes concentraciones altas sobre la longevidad en *C. elegans.*

Figura 24. Efecto del EG a diferentes concentraciones bajas sobre la esperanza de vida de *C. elegans.*

Figura 25. Efecto del EG a diferentes concentraciones sobre la vitalidad de *C. elegans.*

Figura 26. Estudio de la vitalidad con y sin suplementación con EG a concentraciones de 0,05 mg / mL en *C. elegans.*

Figura 27. Efecto de la suplementación con EG sobre la pérdida de peso involuntaria en modelo murino envejecido.

Figura 28. Prueba de tolerancia a la glucosa en modelo murino envejecido suplementado con EG.

Figura 29. Efecto de la suplementación con EG sobre la coordinación motora evaluada con Rotarod en modelo murino envejecido.

Figura 30. Efecto de la suplementación con EG sobre la fuerza de agarre en modelo murino envejecido.

Figura 31. Efecto de la suplementación con EG sobre la resistencia a la fatiga medida con la cinta rodante en modelo murino envejecido.

Figura 32. Efecto de la suplementación con EG sobre la fuerza y la coordinación motora evaluada con la prueba de la escalera inclinada en modelo murino envejecido.

Figura 33. Efecto de la suplementación con EG en estudios del comportamiento exploratorio-excavación en modelo murino envejecido.

Figura 34. Efecto de la suplementación con EG en estudios del comportamiento para evaluar la ansiedad en modelo murino envejecido.

Figura 35. Efecto de la suplementación con EG sobre el estado redox del glutatión en sangre total de un modelo murino envejecido.

Figura 36. Efecto de la suplementación con EG sobre la peroxidación lipídica en el plasma de un modelo murino envejecido.

Figura 37. Efecto de la suplementación con EG sobre la peroxidación lipídica en el cerebelo y córtex cerebral de un modelo murino envejecido.

Figura 38. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de envejecimiento en el cerebelo de un modelo murino envejecido.

Figura 39. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de envejecimiento en el córtex cerebral de un modelo murino envejecido.

Figura 40. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de *B2m* en cerebelo y córtex cerebral de un modelo murino envejecido.

Figura 41. Conexiones entre los procesos celulares y biomarcadores de envejecimiento y deterioro cognitivo.

Figura 42. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de apoptosis en el cerebelo de un modelo murino envejecido.

Figura 43. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de apoptosis en el córtex cerebral de un modelo murino envejecido.

Figura 44. Niveles intracelulares de peróxidos marcados con DCF en sangre total en modelo murino envejecido.

Figura 45. Niveles intracelulares de radical hidroxilo y el anión peroxinitrito marcados con DHR123 en sangre total en modelo murino envejecido.

Figura 46. Niveles de superóxidos mitocondriales marcados con MitoPY en sangre total en modelo murino envejecido.

Figura 47. Niveles intracelulares de peróxidos marcados con DCF en sangre total tratada con tBHP (50 µM) en modelo murino envejecido.

Figura 48. Niveles intracelulares de radical hidroxilo y el anión peroxinitrito marcados con DHR123 en sangre total tratada con tBHP (50 µM) en modelo murino envejecido.

Figura 49. Niveles de superóxidos mitocondriales marcados con MitoPY en sangre total tratada con tBHP (50 µM) en modelo murino envejecido.

Figura 50. Imagen representativa de cortes histológicos de los cerebelos estudiados en modelo murino envejecido.

Figura 51. Estudio de la capa granular del cerebelo en modelo murino envejecido suplementado con EG.

Figura 52. Estudio de la capa molecular del cerebelo en modelo murino envejecido suplementado con EG.

Figura 53. Estudio de las células de Purkinje en modelo murino envejecido suplementado con EG.

Figura 54. Presencia de CPH en los cerebelos del modelo murino envejecido suplementado con EG.

Figura 55. Presencia de vacuolas en el cerebelo del modelo murino envejecido suplementado con EG.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos beneficiosos para la salud estudiados en humanos tras el consumo de la granada y alguno de sus derivados.

Tabla 2. Composición del EG Pomanox P30®.

Tabla 3. Reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción.

Tabla 4. Sondas TaqMan empleadas en los estudios de expresión génica.

Tabla 5. Parámetros estudiados para el estudio histológico del cerebelo.

Tabla 6. Efecto de diferentes concentraciones de EG sobre la esperanza de vida en *C. elegans.*

Tabla 7. Composición corporal de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

Tabla 8. Parámetros hematológicos de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

Tabla 10. Parámetros estudiados en la prueba del laberinto elevado en brazos cruzados de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

INTRODUCCIÓN

1. El envejecimiento

1.1. Concepto fisiológico y biológico: un difícil consenso entre la comunidad científica

El envejecimiento es un fenómeno complejo y controvertido cuya definición varía según el enfoque conceptual adoptado, molecular, celular, fisiológico o poblacional. Aun así, existe un consenso amplio en considerar la acumulación progresiva de daño con el paso del tiempo como una característica central del proceso (Harman, 1956, 1956; Keshavarz et al., 2023).

Según, la Organización Mundial de la Salud (OMS), el envejecimiento se define como el resultado del daño molecular y celular acumulado que, a lo largo de la vida, reduce la capacidad física y mental, incrementa el riesgo de enfermedad y, en última instancia, conduce a la muerte (OMS, 2025). Desde la fisiología, se asume como un proceso universal pero no uniforme, con marcada variabilidad interindividual en su ritmo y trayectoria (Finkel & Holbrook, 2000; Hennekam, 2020; Kirkwood, 2005). Esta heterogeneidad justifica la distinción entre edad cronológica, (tiempo transcurrido desde el nacimiento), y edad biológica, que refleja el estado funcional de sistemas sensoriales, cognitivos y somáticos, así como el mantenimiento de procesos moleculares y celulares (Hamczyk et al., 2020; Hayflick, 2007; Lowsky et al., 2014).

Para integrar causas y consecuencias, se han propuesto los pilares del envejecimiento que articulan procesos como el daño macromolecular, el

acortamiento telomérico, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, la disfunción metabólica y de la detección de nutrientes, el agotamiento de células madre, las alteraciones de la proteostasis, la respuesta al estrés y los cambios epigenéticos y genómicos (Kenyon, 2010; López-Otín et al., 2013). En conjunto, el envejecimiento biológico puede interpretarse como la acumulación progresiva de células senescentes y de daño molecular que compromete la homeostasis tisular y orgánica, con expresión clínica en deterioro funcional y mayor riesgo de muerte (López-Otín et al., 2023).

1.2. Teorías del envejecimiento

La diversidad de mecanismos implicados ha dado lugar a la proliferación de numerosas teorías. A finales del siglo XX se catalogaron más de 300 propuestas y se agrupan en teorías programadas y teorías estocásticas (Da Costa et al., 2016; De Magalhães, 2025; Mc Auley, 2025).

(A) Teorías programadas

Reloj biológico y telómeros

Plantea que programas genéticos regulan el tiempo de vida, con los telómeros como un sensor mitótico clave. Su acortamiento por replicación y la baja actividad de telomerasa en la mayoría de células somáticas precipitan senescencia y limitación proliferativa. La manipulación de la telomerasa en modelos animales modula la longevidad y la función tisular (Blackburn et al., 2006, 2015).

Teoría endocrina

Los cambios en ejes hormonales (GH/IGF-1, gonadales, cortisol) reconfiguran el metabolismo celular así como el funcionamiento general del organismo, favoreciendo el deterioro físico y la aparición de enfermedades (Bartke, 1998; Bartke et al., 1998).

Teoría inmunológica

La inmunosenescencia y el i*nflammaging* (inflamación crónica de bajo grado) descritos clásicamente por Franceschi y colaboradores, se asocian a una peor capacidad de respuesta inmunitaria y mayor incidencia de infecciones, autoimunidad y cáncer en la edad avanzada (Franceschi et al., 2000; Fulop et al., 2014).

(B) Teorías estocásticas

Daño oxidativo (radicales libres)

Desde la propuesta de Harman (Harman, 1956), múltiples evidencias relacionan el estrés oxidativo (desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno/nitrógeno y defensas antioxidantes) con daño acumulativo en ADN, proteínas y lípidos (Fulop et al., 2014; Lindahl, 1993; Stadtman, 1992). En tejidos, se monitoriza mediante peroxidación lipídica, determinando moléculas como el malondialdehído (MDA) (Draper & Hadley, 1990; Valenzuela, 1991) y el estado redox del glutatión, determinando su estado reducido (GSH) y oxidado para así establecer una ratio entre ambos estados (GSH/GSSG) (Lapenna, 2023).

Errores somáticos.

Propone que mutaciones acumuladas durante la replicación y reparación del ADN deterioran funciones celulares y tisulares a lo largo del tiempo (Szilard, 1959).

Desgaste

La teoría del desgaste, formulada por Raymond Pearl en 1928, propone que el envejecimiento es consecuencia del deterioro progresivo de los sistemas biológicos debido al uso continuo y a la acumulación de daños a lo largo del tiempo. Según este enfoque, los procesos metabólicos normales, junto con la actividad funcional de células, tejidos y órganos, generan un desgaste fisiológico que supera gradualmente la capacidad del organismo para mantener la homeostasis y reparar el daño estructural. Pearl estableció una relación inversa entre la tasa metabólica y la longevidad, sugiriendo que un metabolismo elevado acelera el deterioro funcional y reduce la expectativa de vida (Lints, 1989).

En conjunto, ninguna teoría por sí sola explica la complejidad del envejecimiento; se trata de un fenómeno que emerge de la interacción entre programas biológicos y daño estocástico, modulados por genética y ambiente (Viña et al., 2007).

1.3. Demografía del envejecimiento y su impacto en la salud pública actual

1.3.1. El panorama internacional

El envejecimiento demográfico se perfila como una de las transformaciones sociales más significativas del siglo XXI, con profundas implicaciones en los sistemas de protección social, los mercados laborales, la economía global, la planificación urbanística y la estructura de cuidados (Gianfredi et al, 2025).

A lo largo del siglo XX se consolidaron una serie de transformaciones multidimensionales, que dieron origen a tres transiciones fundamentales responsables del incremento de la supervivencia y la longevidad humanas: la transición demográfica, la transición epidemiológica y la transición sanitaria. En conjunto, estas transformaciones configuraron el marco estructural que sostiene el actual crecimiento de la población envejecida (Scott, 2021).

La Figura 1 presenta la evolución histórica y la proyección del crecimiento demográfico mundial entre 1950 y 2050, mostrando simultáneamente la tasa anual de crecimiento poblacional (y el número total de habitantes en miles de millones (*European Commission Directorate General for Economic and Financial Affairs., 2024*). Se observa que, entre 1950 y mediados de la década de 1960, la tasa de crecimiento aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo cercano al 2,2 % anual, coincidiendo con el periodo de expansión demográfica posterior a la Segunda Guerra Mundial. A partir de entonces, dicha tasa inicia una

tendencia descendente sostenida (Figura 1), con leves fluctuaciones, situándose por debajo del 1 % hacia 2020. Las proyecciones para el periodo 2020–2050 (segmentos punteados y áreas sombreadas de la Figura 1) indican una continuación de este descenso en la tasa de crecimiento, lo que refleja una desaceleración estructural del crecimiento poblacional global.

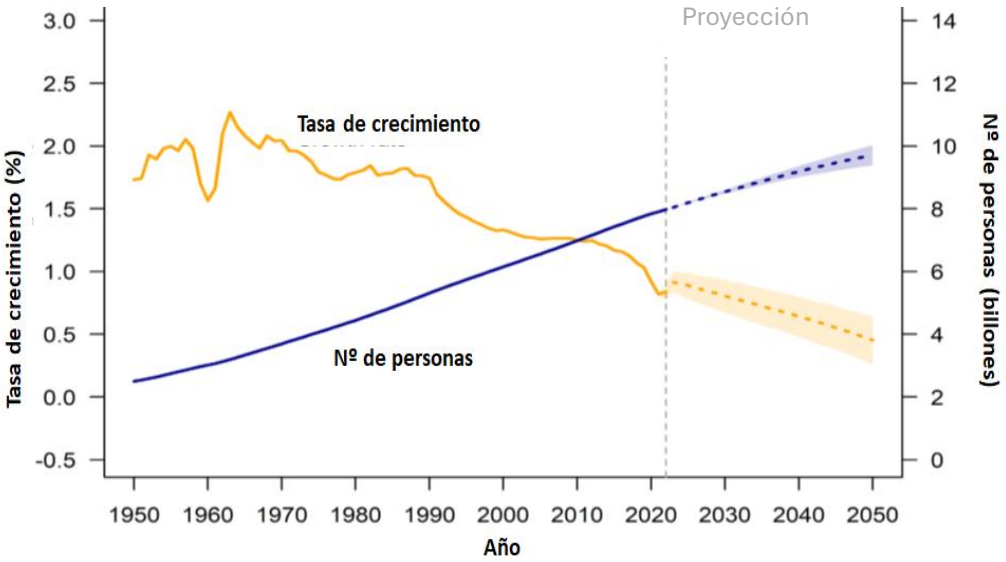


Figura 1. Tamaño de la población mundial y tasa de crecimiento anual: estimación y proyecciones 1950-2050. Adaptado de *United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2025). World Population Prospects 2025: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO.*

En contraste, el número absoluto de habitantes mantiene una trayectoria ascendente continua durante todo el periodo analizado (Figura 1): desde aproximadamente 2,5 billones en 1950 hasta cerca de 7,8 billones en 2020, con estimaciones próximas a los 9,5–10 billones para 2050. Aunque la población total continúa aumentando, lo hace a un ritmo cada vez menor.

Desde la perspectiva del envejecimiento demográfico, se ilustra claramente el avance de la transición demográfica global: la reducción sostenida de la natalidad y de las tasas de crecimiento, junto con el aumento de la supervivencia y la esperanza de vida, conducen a una transformación en la estructura por edades. En este contexto, el menor reemplazo generacional y la expansión de las cohortes de mayor edad incrementarán progresivamente el peso relativo de las personas mayores en la población total, intensificando los desafíos asociados a la sostenibilidad de los sistemas de salud, cuidados de larga duración, pensiones y apoyo social (OMS, 2025).

1.3.2. España: Un país longevo y con calidad de vida

En consonancia con la tendencia demográfica global, la población de España alcanzó en 2025 un total de 49.315.949 habitantes, con una edad media de 47,3 años. Este dato sitúa al país entre los más envejecidos del mundo. La esperanza de vida al nacer en España ha aumentado más de diez años desde 1975, hasta alcanzar en 2024 los 84 años de media (Figura 2). Al analizar las diferencias por sexo, se aprecia que las mujeres mantienen sistemáticamente una esperanza de vida superior a la de los hombres durante todo el periodo. En 1975 alcanzaban 76,3 años, frente a 70,5 años en los hombres (Figura 2). En 2024, estos valores ascienden hasta 86,5 años y 81,4 años, respectivamente. Aunque la brecha de género persiste, tiende a moderarse ligeramente en los últimos años. Estas diferencias se relacionan con factores biológicos, hormonales, conductuales y sociales, así como con una distinta exposición a riesgos cardiovasculares, laborales y hábitos nocivos a lo largo del ciclo vital.

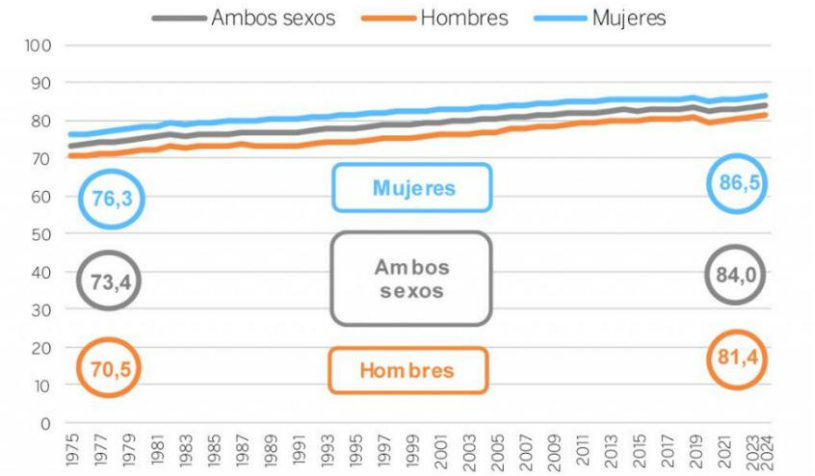


Figura 2. Evolución poblacional de España separadas por sexo. Actualizada en diciembre de 2025 por el INE.

El INE informó en 2024 que, si continúan las tendencias actuales, la población de España crecerá en más de cinco millones en 15 años y casi seis millones para 2074. También se prevé que la proporción de personas mayores de 65 años aumente del 20,4% actual a un máximo del 30,5% hacia 2055. En 2025 se destacó que el índice de envejecimiento alcanzó un récord del 142%. Los datos históricos muestran un aumento continuo de este indicador: de 34,99 en 1975 a 142,35% en 2024, reflejando un progresivo envejecimiento de la población española.

España lidera la esperanza de vida al nacer en la Unión Europea, junto a Italia y Suecia, además de posicionarse como uno de los más envejecidos del continente. Los progresos en salud pública, bienestar social y condiciones de vida han permitido reducir la mortalidad en todas las edades, pero el

aumento de los años vividos no siempre viene acompañado de una buena calidad de vida (Martínez-Angulo et al., 2023). El reto demográfico ya no consiste solo en prolongar la vida, sino en lograr que los años adicionales se vivan con salud, autonomía y participación social.

Por todo ello, la esperanza de vida constituye un indicador demográfico esencial, definido como el número promedio de años que una persona podría vivir si las tasas de mortalidad por edad se mantuvieran constantes a lo largo del tiempo. Este parámetro es ampliamente utilizado en el ámbito de la salud pública y la demografía para comparar los niveles de mortalidad entre distintas poblaciones y evaluar las condiciones sanitarias y el desarrollo socioeconómico de una sociedad (Modig et al., 2020).

1.3.3. El envejecimiento en la Comunitat Valenciana

En la Comunitat Valenciana, el proceso de envejecimiento demográfico constituye un fenómeno de creciente relevancia que sigue las tendencias observadas en el conjunto de España. Si bien la región no presenta los niveles de envejecimiento extremo característicos del noroeste peninsular (como los registrados en Galicia, Castilla y León o Asturias), sí evidencia una evolución sostenida hacia una estructura poblacional cada vez más envejecida. Como muestra la Figura 3, según datos recientes, en 2026, el porcentaje de personas mayores de 65 años en la Comunitat Valenciana se situa en el 22 % del total de la población, reflejando así un incremento progresivo de la proporción de personas mayores (Ros, 2026).

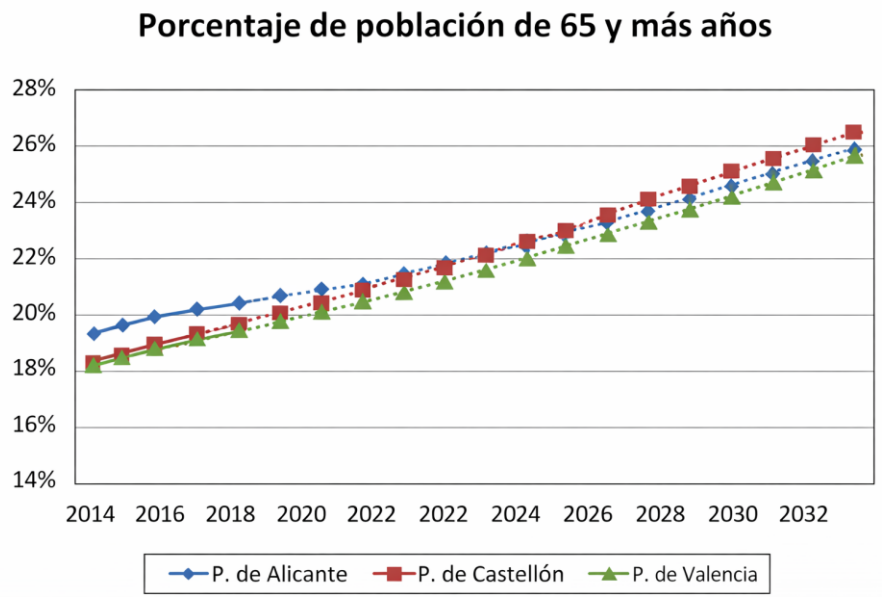


Figura 3. Evolución y previsión del porcentaje de población de 65 y más años en las provincias de Alicante, Castellón y Valencia entre 2014 y 2033. Elaboración propia a partir de datos actualizados en 2026 del Instituto Nacional de Estadística (INE).

Paralelamente a lo que pasa en España, los factores más determinantes de este proceso también son la disminución de la tasa de natalidad (que se ha mantenido en descenso durante las últimas décadas) y el índice de fecundidad que se encuentra actualmente por debajo del nivel de reemplazo generacional, lo que contribuye de manera directa al envejecimiento estructural de la población valenciana.

Desde una perspectiva territorial, el envejecimiento presenta una distribución desigual. Las áreas rurales y los municipios de menor tamaño concentran una mayor proporción de personas mayores en comparación con los entornos urbanos, como las ciudades de Valencia, Alicante y Castellón.

No obstante, en determinadas zonas costeras, especialmente en la provincia de Alicante, se observa también una elevada presencia de población jubilada, tanto nacional como extranjera, atraída por las condiciones climáticas y la oferta residencial (Generalitat Valenciana, 2021).

Las estrategias autonómicas, como el Plan Estratégico de Atención a las Personas Mayores (Generalitat Valenciana, 2022) y la Estrategia de Envejecimiento Activo y Saludable 2021-2025 (Orts Ríos et al., 2025), subrayan la importancia de promover un modelo integral de atención que combine la autonomía personal, la prevención de la dependencia y la mejora de la calidad de vida de las personas mayores.

1.3.4. El envejecimiento saludable y el manejo de la fragilidad: Una meta a alcanzar en la agenda 2030

El envejecimiento poblacional constituye uno de los mayores desafíos médicos, sociales y demográficos del siglo XXI. En este contexto, las políticas internacionales y los organismos de salud pública han orientado sus esfuerzos hacia la promoción del envejecimiento saludable como una prioridad estratégica dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 (Sachs et al., 2025).

La OMS define el envejecimiento saludable como el proceso de mantener la capacidad funcional que permite el bienestar en la vejez, subrayando la importancia de la calidad de vida y la autonomía, más allá de la mera longevidad (Bautmans et al., 2022). En línea con esta visión, la OMS impulsó la Estrategia Mundial y Plan de Acción sobre el Envejecimiento y la

Salud (2016-2020), que evolucionó hacia la Década del Envejecimiento Saludable 2020-2030, con el propósito de optimizar las oportunidades para que las personas mayores disfruten de vidas saludables, seguras y activas (Rudnicka et al., 2020).

Este marco internacional ha promovido el desarrollo de la investigación básica y aplicada en torno a los mecanismos biológicos del envejecimiento, especialmente en relación con la fragilidad, un síndrome clínico complejo y multifactorial que representa uno de los principales retos en la atención sanitaria de la población mayor (Muñoz-Redondo et al., 2023).

La fragilidad se define como un estado caracterizado por la disminución de la capacidad fisiológica del organismo para responder a situaciones de estrés, lo que incrementa la vulnerabilidad ante enfermedades, discapacidad y mortalidad (OMS, 2016). Desde la perspectiva clínica, se reconoce como un proceso dinámico y potencialmente reversible, que refleja la interacción entre el envejecimiento biológico, la genética, el estilo de vida, las comorbilidades y los factores ambientales (Hoogendijk et al., 2019).

El modelo más utilizado para evaluar la fragilidad es el Fenotipo de Fried, basado en cinco criterios clínicos: pérdida de peso involuntaria, agotamiento, bajo nivel de actividad física, lentitud en la marcha y disminución de la fuerza de prensión (Fried et al., 2001). Este modelo ha sido ampliamente validado y continúa siendo la referencia en la práctica clínica y la investigación (Rodríguez-Mañas et al., 2013; Ruiz-Grao et al., 2022). Estos

resultados refuerzan la necesidad de abordar la fragilidad desde un enfoque integrador que contemple tanto los mecanismos biológicos del envejecimiento como los determinantes sociales (Hanlon et al., 2024).

La fragilidad asociada al envejecimiento es el resultado de una interacción compleja entre factores biológicos, genéticos, conductuales, clínicos y ambientales que, acumulados a lo largo de la vida, condicionan una disminución progresiva de la reserva funcional del organismo (Clegg & Young, 2011). El envejecimiento biológico, la predisposición genética, los estilos de vida poco saludables, la presencia de enfermedades crónicas y la influencia del entorno actúan conjuntamente favoreciendo una mayor vulnerabilidad fisiológica (Figura 4).

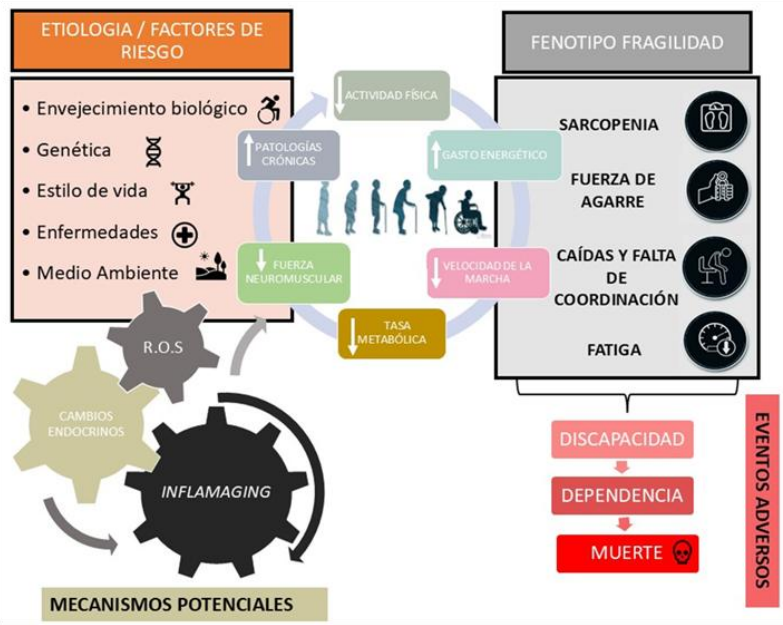


Figura 4. Patogénesis del síndrome de fragilidad.
ROS: especies reactivas de oxígeno.

Entre los mecanismos implicados destacan el estrés oxidativo (ROS), las alteraciones endocrinas y la inflamación crónica de bajo grado (*inflammaging*), procesos estrechamente relacionados con el deterioro celular y tisular propio de la edad. Estas alteraciones comprometen la homeostasis metabólica y reducen la capacidad adaptativa frente a situaciones de estrés, facilitando la aparición de disfunción multisistémica.

Como consecuencia, se producen cambios funcionales relevantes como la reducción de la actividad física, la pérdida de fuerza neuromuscular, la disminución de la velocidad de la marcha, alteraciones del gasto energético y descenso de la tasa metabólica basal. La coexistencia de estas modificaciones contribuye al desacondicionamiento físico y a la progresiva pérdida de autonomía.

La expresión clínica de este proceso se manifiesta mediante sarcopenia, debilidad muscular, menor fuerza de prensión, fatiga, inestabilidad postural, caídas recurrentes y dificultades de coordinación. Todo ello configura un estado de especial susceptibilidad ante agresiones menores, infecciones, hospitalizaciones o cambios agudos de salud y aumento de la mortalidad (Howlett et al., 2021).

A pesar de su impacto, la fragilidad no parece ser irreversible. Diversos estudios han demostrado que puede prevenirse o revertirse mediante intervenciones multicomponentes que combinan ejercicio físico, optimización nutricional, suplementación nutraceútica, que junto a un

enfoque comunitario y centrado en el paciente resulta esencial para su manejo eficaz (Apóstolo et al., 2018; Walston et al., 2018).

Con el fin de abordar este desafío, el Ministerio de Sanidad de España y la Unión Europea impulsan desde 2019 la Iniciativa *ADVANTAGE Joint Action,* orientada a la detección temprana y manejo homogéneo de la fragilidad en Europa, dentro del marco del envejecimiento saludable (Dent et al., 2019).

Además, cabe destacar que la fragilidad puede manifestarse de manera prematura en adultos jóvenes, en ausencia de una edad avanzada, debido a factores genéticos, enfermedades crónicas o estilos de vida poco saludables. Por ello, se reconoce como un síndrome transversal que refleja la interacción entre el envejecimiento biológico y la reserva funcional del organismo (Loecker et al., 2021).

Entre las consecuencias más graves de la fragilidad, comentadas anteriormente, se encuentran las caídas, que representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las personas mayores. Alrededor de un tercio de los mayores de 65 años experimenta al menos una caída al año, proporción que asciende al 50% en mayores de 80 años (Guo et al., 2023; Q. Xu et al., 2022). Estas caídas no solo generan fracturas y hospitalizaciones, sino también un profundo impacto psicológico, como el miedo a volver a caer, lo que conduce al sedentarismo, pérdida de masa muscular y agravamiento del estado frágil (Yang et al., 2023). Asimismo, enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento como el

Alzheimer y el Parkinson aumentan aún más el riesgo al alterar la coordinación motora y la integración sensorial.

En conjunto, la fragilidad se consolida como un síndrome clínico dinámico, multifactorial y potencialmente reversible, estrechamente vinculado con los objetivos del envejecimiento saludable propuestos por la OMS y la Agenda 2030. Su abordaje requiere estrategias integradas de prevención, detección temprana y tratamiento multidimensional que promuevan la autonomía y la calidad de vida en la población mayor.

1.4. Uso de modelos experimentales en la investigación del envejecimiento

Los modelos experimentales han sido fundamentales para comprender los mecanismos biológicos del envejecimiento, ya que permiten estudiar procesos conservados en organismos con similitudes genéticas y fisiológicas con los humanos. Gracias a ellos, se han identificado factores que determinan la longevidad, la aparición de enfermedades relacionadas con la edad y la degeneración celular, lo que ha impulsado el desarrollo de intervenciones terapéuticas (Fontana & Partridge, 2015).

1.4.1. Modelos invertebrados

Uno de los modelos más utilizados es el nematodo *Caenorhabditis elegans (C. elegans)*, introducido por Sydney Brenner en el siglo pasado. Su

corto ciclo de vida (2–3 semanas), su simplicidad y la facilidad para realizar manipulaciones genéticas lo convierten en una herramienta ideal para observar rápidamente los efectos de distintas intervenciones (Brenner, 1974). A finales de los años setenta, los estudios de Klass demostraron que la longevidad en este organismo puede modificarse tanto por condiciones ambientales como por mutaciones genéticas, estableciendo un vínculo directo entre genética y envejecimiento (Klass & Hirsh, 1976). Entre sus ventajas destacan su bajo costo, transparencia y genoma completamente secuenciado, mientras que su principal limitación es la falta de órganos y sistemas comparables con los de los vertebrados, lo que restringe la extrapolación de resultados a los humanos (Kenyon, 2010).

La mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster)* representa un paso intermedio entre los invertebrados simples y los vertebrados. Posee un sistema nervioso más complejo y comparte numerosas vías metabólicas con los humanos. Su rápido desarrollo, facilidad de manipulación genética y la disponibilidad de múltiples mutantes la convierten en un modelo idóneo para estudiar la relación entre metabolismo, estrés y longevidad. Sin embargo, sus diferencias anatómicas con los mamíferos limitan su utilidad en el análisis de enfermedades complejas (Arking & Dudas, 1989; Spencer et al., 2003; Wodrich et al., 2023).

1.4.2. Modelos vertebrados

El pez *killifish* africano (*Nothobranchius furzeri*), el vertebrado con el ciclo de vida más corto conocido (3 a 12 meses), ha adquirido relevancia

como modelo intermedio entre los invertebrados y los mamíferos. Presenta un envejecimiento natural acelerado con manifestaciones visibles, como pérdida de pigmentación y deterioro de órganos, lo que facilita el estudio de los procesos fisiológicos asociados a la edad (Harel et al., 2015). Ofrece la ventaja de compartir una mayor similitud molecular con los humanos, aunque su mantenimiento es más costoso y requiere condiciones acuáticas específicas.

Entre los modelos mamíferos, los roedores, especialmente el ratón (*Mus musculus*) y la rata (*Rattus norvegicus*), son esenciales por su similitud genética con los humanos, su ciclo de vida relativamente corto y las herramientas disponibles para la manipulación genética. Dichos mamíferos han permitido identificar genes clave del envejecimiento, y evaluar diferentes intervenciones como que han demostrado que prolongan la vida y reduce enfermedades relacionadas con la edad (Ackert-Bicknell et al., 2015; Palliyaguru et al., 2021a).

En particular, los ratones envejecidos proporcionan un marco experimental adecuado para reproducir aspectos claves de la fragilidad y del envejecimiento como sarcopenia, deterioro motor, inflamación de bajo grado o aumento estrés oxidativo (Bartolomucci et al., 2024; Huffman et al., 2016). Nuestro grupo, ha desarrollado y validado una batería de pruebas funcionales para determinar el grado de fragilidad en modelos murinos a través de una puntuación estandarizada y conocida como el *Valencia Score for Frailty* (Gomez-Cabrera et al., 2017). Dichos criterios se basan en la escala

de fragilidad utilizada en humanos, y adaptada posteriormente para su aplicación en modelos animales.

Finalmente, los primates no humanos, como el mono *rhesus* (*Macaca mulatta*), son los modelos más cercanos al ser humano por su elevada similitud genética, anatómica y fisiológica. Se utilizan principalmente para validar hallazgos preclínicos y estudiar los efectos de intervenciones nutricionales o farmacológicas sobre la salud y la longevidad (Mattison et al., 2017). Su uso está restringido por su alto costo, largo ciclo de vida y las consideraciones éticas que conlleva su manipulación experimental.

En conjunto, estos modelos han permitido identificar mecanismos moleculares y fisiológicos conservados entre especies y su respuesta común a intervenciones nutricionales. Así, los organismos de vida corta ofrecen una base sólida para explorar la biología de la longevidad, mientras que los modelos más complejos permiten trasladar este conocimiento hacia la comprensión y tratamiento del envejecimiento humano (Fontana & Partridge, 2015).

2. La granada y su relevancia en el envejecimiento

La granada *(Punica granatum L*.) es una fruta originaria de la región comprendida entre Irán y el norte de la India, cultivada desde la antigüedad en el área del Mediterráneo, donde ha adquirido gran relevancia tanto cultural como nutricional (C. Liu et al., 2025). Los extractos naturales se obtienen principalmente a partir de sus semillas, cáscara y jugo, que concentran una elevada cantidad de compuestos bioactivos responsables de

sus propiedades beneficiosas para la salud humana (Melgarejo-Sánchez et al., 2021).

2.1. Biocomponentes de la granada

Entre los principales componentes bioactivos destacan los polifenoles, taninos hidrolizables, flavonoides y ácidos grasos esenciales, así como vitaminas C y K, y minerales con función antioxidante. Estos compuestos han sido ampliamente estudiados por su capacidad para neutralizar radicales libres, reducir la inflamación sistémica y modular la expresión génica relacionada con el estrés oxidativo (C. Liu et al., 2025; Melgarejo-Sánchez et al., 2021; Moga et al., 2021).

Los polifenoles constituyen una clase estructural de compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de múltiples unidades fenólicas en su estructura. La estructura química de los principales compuestos fenólicos del fruto de la granada y de sus subproductos se muestra en la Figura 5, e incluye elagitaninos (ácido elágico, punicalagina, ácido gálico y punicalina), antocianinas (cianidina y pelargonidina), ácidos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido clorogénico, y flavonoides (quercetina) (Arlotta et al., 2022; Božović et al., 2026; Mihaylova et al., 2025).

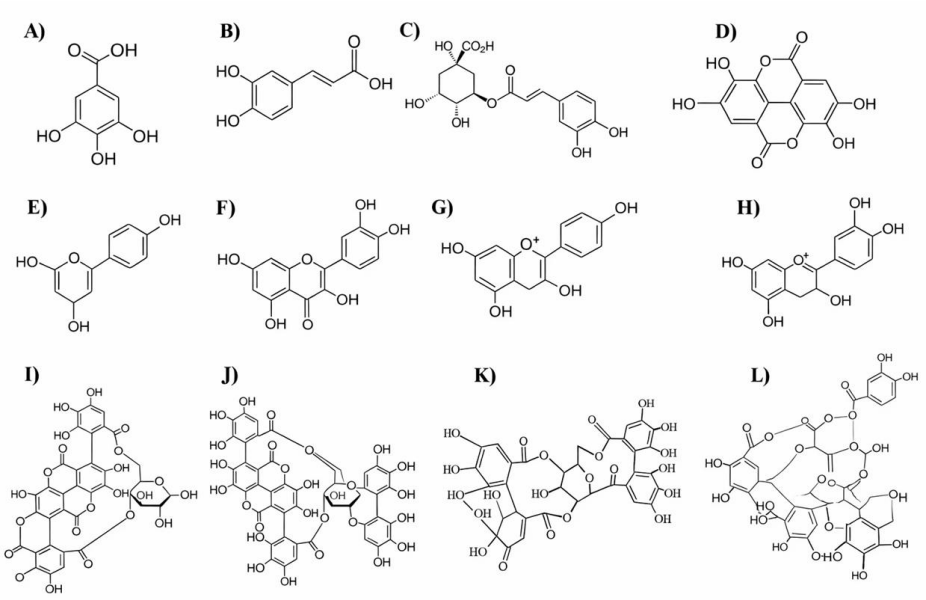


Figura 5. Estructura química de los principales compuestos fenólicos del fruto de la granada: (A) ácido gálico, (B) ácido cafeico, (C) ácido clorogénico, (D) ácido elágico, (E) apigenina, (F) quercetina, (G) pelargonidina, (H) cianidina, (I) punicalina, (J) punicalagina, (K) granatina A y (L) granatina B**.**

Las punicalaginas constituyen aproximadamente el 85 % de la capacidad antioxidante total del jugo de granada. Estas moléculas hidrosolubles derivadas del ácido elágico presentan dos formas isoméricas (A y B), unidas a glucosas por enlaces éster (Yamada et al., 2018). Su potencia antioxidante supera a la de compuestos clásicos como el resveratrol o la vitamina C (J. H. Kim et al., 2024). No obstante, su biodisponibilidad es limitada, ya que son rápidamente metabolizadas en el tracto gastrointestinal. Tras la ingesta, son hidrolizadas por la microbiota intestinal para producir derivados más pequeños y bioactivos, principalmente ácido elágico y urolitinas, que son absorbidos sistémicamente y responsables de buena

parte de los efectos biológicos atribuidos al consumo de granada (Espín et al., 2017; Oliveira et al., 2024).

Las urolitinas, especialmente la urolitina A, representan metabolitos clave del eje dieta–microbiota–salud. Este compuesto ha mostrado efectos notables sobre la función mitocondrial, la homeostasis celular y la inflamación relacionada con el envejecimiento, actuando como un modulador del metabolismo energético y la autofagia. La conversión intestinal de los elagitaninos a urolitinas depende de la composición microbiana individual, la cual tiende a modificarse con la edad, lo que explica la variabilidad interindividual en la respuesta a los polifenoles (D'Amico et al., 2021).

2.2. Uso de la granada en investigación

La granada ha sido utilizada con fines medicinales desde la Antigüedad, con referencias documentadas en la medicina tradicional persa, egipcia y ayurvédica, donde se empleaba para el tratamiento de procesos infecciosos, como la infección por tenia (Breton, 1821) . Durante el siglo XX, el interés científico por la granada se centró principalmente en la caracterización de su composición fitoquímica, identificándose un elevado contenido en polifenoles, especialmente elagitaninos, flavonoides y antocianinas, responsables de su potente capacidad antioxidante (Ben Nasr et al., 1996; Langley, 2000).

En el ámbito de la investigación preclínica, la granada ha sido ampliamente utilizada en modelos celulares y animales para estudiar sus

efectos biológicos y mecanismos de acción. Diversos estudios in vitro han demostrado que sus principales compuestos bioactivos, especialmente los elagitaninos y sus metabolitos, ejercen efectos antioxidantes y antiinflamatorios mediante la modulación de vías de señalización asociadas al estrés oxidativo y la inflamación (Adams et al., 2006; Seeram et al., 2005). De forma complementaria, estudios en modelos animales han evidenciado efectos cardioprotectores, neuroprotectores y metabólicos, así como una mejora de la función mitocondrial y una atenuación de procesos asociados al envejecimiento y a la inflamación crónica de bajo grado (Aviram et al., 2000; Rojanathammanee et al., 2013).

Sin embargo, en humano, diversos estudios clínicos (agrupados en la Tabla 1) han evaluado los efectos de diferentes formas de consumo de la granada sobre parámetros metabólicos, inflamatorios y funcionales en distintas poblaciones. En personas con obesidad, la suplementación con extracto de fruta entera se ha asociado con una disminución de la inflamación sistémica, el peso corporal, la glucosa en sangre, el colesterol total y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), junto con un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que sugiere un perfil cardiometabólico más favorable tras la intervención (Hosseini et al., 2016).

Tabla 1. Efectos beneficiosos para la salud estudiados en humanos tras el consumo de la granada y alguno de sus derivados.

Fruta de la granada	Complicaciones de salud Tipo de paciente Modelo	Efecto tras la suplementación		Referencia.
Extracto de fruta entera	Obesidad	Menor • Inflamación • Peso corporal • Glucosa en sangre • Colesterol total • LDL	Más alto • HDL	(Hosseini et al., 2016)
Zumo	Paciente sometido a hemodiálisis	Menor • Presión sanguínea • Triglicéridos séricos • Estrés oxidativo • Inflamación	Más alto • HDL	(Barati Boldaji et al., 2020)
Zumo	Diabetes tipo 2	Eritropoyetina sérica reducida		(Banihani et al., 2020)
Microencapsulación	Mujeres con síndrome coronario agudo	• Reversión de la disfunción endotelial inducida por HDL • Trigliceridemia postprandial reducida		(Estrada-Luna et al., 2019)
Extracto de pericarpio	Diabetes tipo 2	Menor • Ácidos grasos libres	Más alto • Potencial antioxidante	(Grabež et al., 2020)

		• Glucosa en sangre		
Extracto de pericarpio	Dislipidemia	Menor • Presión arterial sistólica • LDL • Colesterol total	Más alto • HDL	(Haghighian et al., 2016)
Zumo	Adultos activos	Mantenimiento de las habilidades de memoria visual		(Siddarth et al., 2020)
Zumo	Diabetes tipo 2	Presión arterial más baja		(Sohrab et al., 2019)
Zumo	Hombres activos y sanos	• Presión sistólica menor • Creatinina menor		(Achraf et al., 2018)
Zumo	Atletas de resistencia	Menor capacidad de síntesis de grasa corporal y proteínas		(Fuster-Muñoz et al., 2016)

LDL: Lipoproteína de baja densidad; HDL: Lipoproteína de alta densidad.

En pacientes con diabetes mellitus tipo 2, el consumo de zumo de granada ha mostrado efectos específicos sobre parámetros hormonales, observándose una reducción de la eritropoyetina sérica, lo que podría reflejar modificaciones en la respuesta metabólica y oxidativa asociada a la enfermedad (Banihani et al., 2020). Asimismo, el uso de extracto de pericarpio de granada en esta misma población se ha relacionado con una disminución de los ácidos grasos libres y de la glucosa en sangre, además de

un incremento del potencial antioxidante, lo que refuerza el posible papel de los compuestos fenólicos de la granada en el control metabólico y del estrés oxidativo (Grabež et al., 2020).

Por otro lado, en adultos activos, el consumo de zumo de granada se ha vinculado con el mantenimiento de las habilidades de memoria visual, lo que sugiere un posible beneficio neurocognitivo asociado a su ingesta regular (Siddarth et al., 2020). En hombres activos y sanos, se ha observado que el zumo de granada contribuye a una reducción de la presión arterial sistólica y de los niveles de creatinina, indicando efectos positivos tanto a nivel cardiovascular como renal (Achraf et al., 2018). Finalmente, en atletas de resistencia, la suplementación con zumo de granada se ha asociado con una menor degeneración de la grasa corporal y de proteínas, lo que podría favorecer la recuperación y la adaptación al ejercicio físico prolongado, especialmente en contextos de alta exigencia metabólica (Fuster-Muñoz et al., 2016).

No obstante, pese a los resultados prometedores observados, existe una considerable heterogeneidad en cuanto a la forma de administración, la composición y la dosis de los productos derivados de la granada empleados en los distintos estudios. Esta variabilidad dificulta la comparación directa de los resultados y limita la extrapolación de las conclusiones. En este contexto, resulta necesario el desarrollo de futuros ensayos clínicos que utilicen extractos de granada estandarizados, con una caracterización precisa de su contenido en compuestos bioactivos, así como protocolos de intervención bien definidos. La estandarización permitiría mejorar la reproducibilidad de

los estudios, facilitar la comparación entre investigaciones y fortalecer la evidencia científica sobre los efectos reales de la granada en la salud humana.

Es por ello que, la evidencia científica actual sugiere que la granada y sus derivados constituyen un recurso dietético prometedor en el contexto del envejecimiento saludable. Sin embargo, se requieren investigaciones a gran escala para confirmar su eficacia, establecer dosis óptimas y comprender con mayor profundidad las acciones terapéuticas y sus posibles beneficios en el envejecimiento y/o en la fragilidad, así como una mayor comprensión de las causas que promueven dichos beneficios. De esta forma, las aproximaciones multidisciplinares (partiendo de estudios funcionales hasta ensayos biomoleculares) podrían contribuir a un mayor conocimiento de los beneficios de este alimento, para poder así ayudar a establecer pautas dietéticas o nutricionales que contribuyan al envejecimiento saludable basándose en la evidencia científica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de la suplementación con extracto de granada (EG) en dos modelos animales (*C. elegans* y *Mus Musculus*), analizando su impacto sobre la longevidad, la vitalidad y la funcionalidad física y cognitiva, así como sobre diferentes parámetros biomoleculares involucrados con el proceso de envejecimiento.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la suplementación con el EG sobre la esperanza de vida de *C. elegans* a diferentes concentraciones.
2. Evaluar la motilidad o vitalidad del nematodo tras la suplementación con EG.
3. Determinar el efecto del EG sobre parámetros antropométricos mediante el estudio con DEXA en modelo murino envejecido.
4. Estudiar parámetros hematológicos y bioquímicos en sangre periférica de ratones envejecidos que han sido suplementados con el EG para determinar posibles efectos sistémicos.
5. Evaluar las capacidades físicas de ratones envejecidos que han sido suplementados con el EG mediante la realización de pruebas de fuerza, coordinación motora y resistencia.
6. Evaluar el comportamiento y capacidad cognitiva del modelo murino envejecido mediante test de enterramiento, exploración, y de respuesta a estrés tras la suplementación con EG.

7. Cuantificar marcadores de estrés oxidativo y apoptosis en muestras biológicas de ratones envejecidos suplementados.
8. Determinar los niveles basales de ROS citoplasmáticos y mitocondriales en la población leucocitaria del modelo murino envejecido, así como estudiar la capacidad de respuesta frente a un estrés inducido en dicha población de ratones envejecidos suplementados con el EG.
9. Estudiar la estructura y morfología del cerebelo, así como la presencia de alteraciones histológicas asociados al envejecimiento neurocognitivo en ratones envejecidos suplementados con el EG.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Extracto de granada

El extracto natural concentrado de granada entera empleado en este estudio corresponde a Pomanox® P30, suministrado por Euromed S.A. (Barcelona, España). Este extracto se obtiene mediante un proceso de extracción acuosa, libre de disolventes orgánicos, que permite conservar el perfil natural de compuestos bioactivos de la granada (*Punica granatum L.*). De acuerdo con las especificaciones del fabricante (Lote 0100531601), Pomanox® P30 (Tabla 2) está estandarizado a más del 50 % de polifenoles totales, con un contenido de punicalaginas (α + β) ≥ 30 % p/p. Los compuestos fenólicos se cuantificaron mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-TOF-MS).

Entre sus principales constituyentes se incluyen α-punicalagina (174,4 g / kg), β-punicalagina (206,8 g / kg), galoilglucosa, punicalina y ácido elágico (7,3 g / kg), glucósido de ácido elágico (4,2 g / kg) y ramnósido de ácido elágico (1,3 g / kg). Asimismo, contiene diversas antocianinas, entre ellas delfinidina-3,5-diglucósido (302,9 mg / kg), cianidina-3,5-diglucósido (425,3 mg / kg), delfinidina-3-glucósido (75,7 mg / kg), cianidina-3-glucósido (241,8 mg / kg) y pelargonidina-3-glucósido (99,5 mg / kg).

Tabla 2. Composición del EG Pomanox P30®.

	GRUPO FITOQUIMICO	BIOCOMPONENTES	CONCENTRACIÓN (g / 100 g de EG)
EG P30®	**Polifenoles**	Se calcula a partir de la suma de punicalagina + ácido elágico + antocianina + elagitaninas	44,2
	Elagitaninas	Punicalagina	31,6
		Ácido elagico	1,5
		Otras elagitaninas (galloilglucos, punicalin, ácido egalico, rhamnosido)	11,1
	Antocinaninas	(delfinidina 3,5-diglucosido, cianidina3,5-diglucoside, delfinidina 3-glucosido, cianidina 3-glucosido, pelargonidina 3-glucosido)	<0,1

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses en relación con la realización de este estudio. En particular, el grupo de investigación no mantiene vínculos financieros, comerciales ni personales con la empresa Euromed S.A., fabricante del extracto POMANOX® 30, utilizado en esta investigación. La colaboración con dicha entidad se limitó exclusivamente al suministro del material experimental, sin que esto haya influido en el diseño del estudio, la obtención y el análisis de los datos, ni en la interpretación o publicación de los resultados.

2. Estudio en el modelo *C. elegans*

2.1. Cepas empleadas

Para la realización de los ensayos se empleó la cepa silvestre N2 de *Caenorhabditis elegans,* obtenida del Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Esta cepa se considera el estándar de referencia en estudios de envejecimiento y fisiología, debido a su ciclo de vida corto, genoma completamente secuenciado y alta homología genética con organismos superiores (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). El modelo de *C. elegans* ha demostrado ser particularmente útil en la evaluación de compuestos bioactivos con potencial antioxidante o geroprotector, permitiendo establecer correlaciones entre longevidad, vitalidad y salud metabólica (Hahm et al., 2015).

2.2. Diseño experimental

El presente estudio se llevó a cabo empleando el extracto natural de granada Pomanox® P30 disuelto en agua destilada y aplicado sobre la superficie de placas con agar de crecimiento de gusanos o Nematode Growth Medium (NGM). Dichas placas fueron utilizadas como soporte para el cultivo de *C. elegans.* También, como fuente de alimento, se empleó la cepa Escherichia coli (E.coli) OP50 que es una variante bacteriana ampliamente utilizada en laboratorios.

Esta cepa es un mutante auxótrofo para uracilo, característica que limita su crecimiento excesivo y permite formar una capa bacteriana delgada y uniforme que facilita la observación, manipulación y desarrollo de los

nematodos sin interferir con su desplazamiento ni alterar las condiciones experimentales (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006).

El extracto fue evaluado a diferentes dosis crecientes (0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 mg / mL), seleccionadas en función de la naturaleza del ensayo (esperanza de vida o movilidad), con el fin de analizar el efecto dosis-dependiente del extracto sobre la biología del envejecimiento.

2.3. Ensayos de esperanza de vida

Siguiendo los protocolos descritos por Puchalt y colaboradores (Puchalt et al., 2019), se utilizaron gusanos sincronizados en edad N2, que cuando alcanzan el estadío larvario L4, se transfieren a placas con la bacteria E. coli OP50, y fluorodeoxyuridina (FUdR), para evitar que haya descendencia. Tras 24h, las placas se colocan en unos pallets donde las placas se quedan en una posición fija durante el ensayo y comienza a cuantificarse la supervivencia de manera diaria (lunes a viernes) mediante el empleo de un sistema automatizado basado en visión artificial desarrollado por la empresa ADM-Biopolis (Parque Científico Universitat de Agustín Escardino, 9, Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch, 46980 Paterna, Valencia).

Como muestra la Figura 6, durante el ensayo, las placas se mantuvieron a 20 °C, sin renovación del medio, hasta alcanzar el 100 % de mortalidad. Se realizaron dos ensayos independientes, con 100 gusanos por condición experimental, suplementados y sin suplementar con EG (200 individuos por condición). Adicionalmente, se realizaron ensayos manuales para validar los resultados obtenidos de forma automatizada. En estos casos, se prepararon

placas frescas tres veces por semana con E. coli OP50 o HT115 y el extracto de granada, omitiendo el uso de FUdR. Los gusanos se transfirieron manualmente para evitar la confusión entre generaciones, y la supervivencia se determinó bajo doble ciego, estimulando los individuos con una varilla de platino para diferenciar los vivos de los muertos. En este formato, se analizaron 50 gusanos por condición. Los datos de supervivencia se representaron mediante curvas Kaplan-Meier y se compararon entre si mediante la prueba log-Rank.

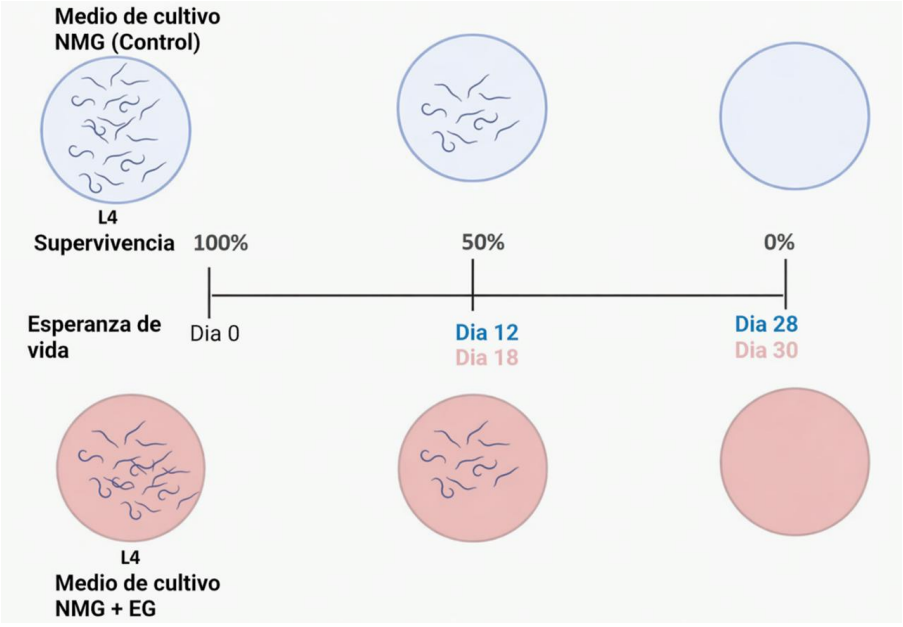


Figura 6. Diseño del estudio de esperanza de vida en *C. elegans* alimentados con NMG o NMG + EG. Se realizaron 2 ensayos de esperanza de vida independientes con 100 gusanos por cada condición (200 gusanos totales / condición).

2.4. Ensayos de vitalidad o motilidad

La vitalidad o capacidad locomotora de los gusanos se evaluó como indicador funcional complementario al estudio de la longevidad. Se emplearon gusanos sincronizados (cepa N2) que, al alcanzar el estadio L4, fueron transferidos a placas de 96 pocillos, cada uno conteniendo E. coli OP50 y FUdR.

Transcurridas 24 horas, las placas se introdujeron en un sistema automatizado de visión artificial para registrar la actividad locomotora de cada pocillo. Este método de análisis de comportamiento ha sido validado como marcador robusto de calidad de vida, reflejando la capacidad funcional de los organismos durante el envejecimiento. La actividad motora (motilidad) se cuantificó diariamente durante 8 días consecutivos, empleando diferentes concentraciones de EG.

Los resultados se normalizaron y expresaron como porcentaje de motilidad respecto al control (NMG), representando el nivel de actividad de los gusanos tratados con el EG frente a aquellos cultivados en condiciones estándar. Estos resultados se cuantificaron calculando el área bajo la curva (AUC) para comparar la actividad entre grupo control y suplementado. Se realizaron dos ensayos independientes, con 120 gusanos por condición (240 en total).

3. Estudio en modelo murino envejecido

3.1. Animales de experimentación y condiciones de estabulación

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, se emplearon ratones machos de la cepa C57BL/6J. Concretamente, se emplearon ratones envejecidos de 18 meses de edad y ratones adultos. Esta cepa se encuentra establecida en la Unitat Central d'Investigació de la Facultat de Medicina de la Universitat de València. En este servicio se mantienen en unas condiciones de 23 ± 1°C de temperatura, una humedad relativa del 60 %, ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas y una alimentación y agua ad libitum.

Cabe mencionar que todos los procedimientos en los que fue necesario el uso de ratones se realizaron tras su aprobación por parte de la Comisión de Ética en la Investigación Experimental del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Valencia y siguiendo la normativa establecida en el Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Específicamente, el estudio con animales fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia bajo la referencia A20201110122413 y el número de procedimiento 2021/VSC/PEA/0006 aprobado por Conselleria de Agricultura, desarrollo rural, emergencia climática y transición ecológica de la Generalitat Valenciana.

3.2. Diseño experimental

El diseño se orientó a evaluar el EG en un contexto de envejecimiento fisiológico. Para ello, se seleccionó la edad de 18 meses como punto inicial de la suplementación, ya que, dicha edad, corresponde al inicio del desarrollo de fenotipo de fragilidad murino (Gomez-Cabrera et al., 2017). Para los estudios in vivo, los animales se monitorizaron desde los 18 meses y se dividieron en dos grupos: uno placebo con solo H_2O en el biberón y el otro grupo suplementado con EG a 150 mg / Kg /día hasta la edad de 22 meses como punto final. Los estudios realizados in vivo fueron evaluaciones funcionales, de comportamiento o cognitivos, así como análisis antropométricos y la prueba de tolerancia de glucosa (PTG).

Además, se realizó un estudio ex vivo que consistió en la medición de parámetros bioquímicos, hematológicos, estudio de la ratio GSH/GSSG, peroxidación lipídica (MDA en plasma, cerebelo y córtex) y estudio de ROS en sangre total. Además, se realizaron estudios de expresión génica y de histología en cerebelo y córtex. Para ello se emplearon, la edad de 10 meses como grupo de ratones adultos para comparar con los dos grupos de 22 meses sin o con suplementación con EG.

En la Figura 7 se resume el diseño experimental.

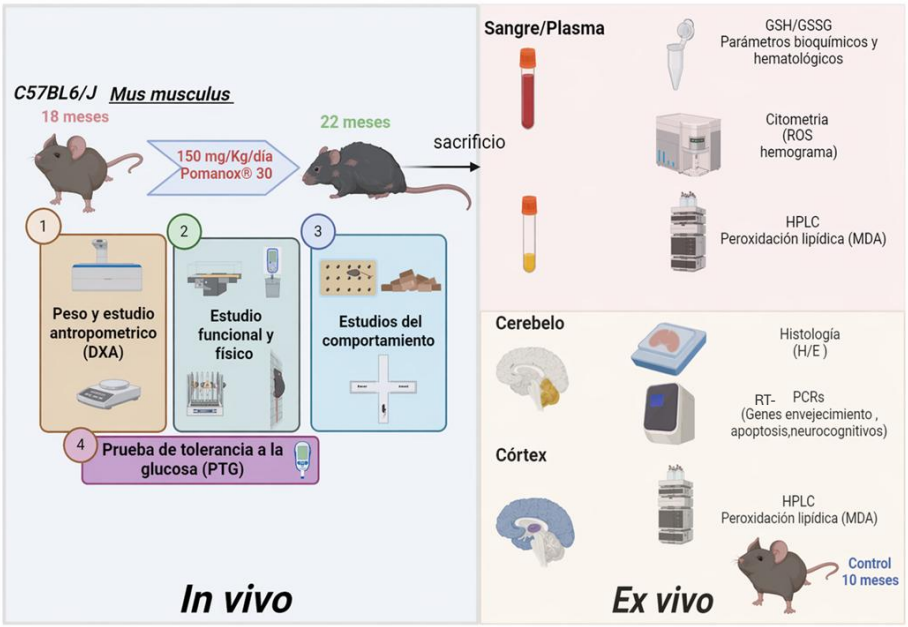


Figura 7. Diseño experimental empleado en el modelo murino envejecido.

La dosis del EG (Pomanox® P30) empleada en el presente estudio murino fue de 150 mg / kg/ día, como hemos comentado anteriormente. Ésta se estableció en función de evidencia previa en humanos, donde la dosis efectiva correspondió a 750 mg / día de Pomanox® P30, con un contenido estandarizado de un 30 % de punicalaginas (α + β), lo que equivale a 112,5 mg de punicalaginas por cápsula y una dosis total diaria de 225 mg de punicalaginas (Al-Dujaili et al., 2022; Torregrosa-García et al., 2019). Considerando la necesidad de extrapolar la dosis humana a modelos animales, se aplicó el método de conversión interespecies propuesto por Nair y Jacob en 2016, basado en el factor de corrección por superficie corporal (Nair & Jacob, 2016; Abouelezz et al., 2023; Barghchi et al., 2023).

3.3. Seguimiento del peso corporal

El peso corporal de los ratones se registró diariamente y semanalmente, empleando una balanza de precisión calibrada referencia PB3002 Delta Range (Mettler Scales, Toledo, OH).

Para cada ratón se calculó la media aritmética de las mediciones semanales correspondientes a cada punto temporal. La pérdida de peso corporal individual se expresó como porcentaje de reducción respecto al valor inicial, siguiendo la fórmula:

$$Pérdida\ de\ peso\ (\%) = \frac{(PC_{18} - PC_{22})}{PC_{18}} * 100$$

Donde PC_{18} representa el peso corporal a los 18 meses de edad (antes del inicio del programa de suplementación), y PC_{22} corresponde al peso corporal registrado a los 22 meses de edad (punto final de la suplementación).

3.4. Estudio antropométrico mediante absorciometría con rayos X de doble energía

Para complementar el seguimiento del peso corporal, se evaluó la composición corporal mediante absorciometría de rayos X de energía dual o de doble energía (DEXA). Se realizaron dos mediciones principales: la basal, antes del inicio de la suplementación (a 18 meses), y posteriormente, a punto final, a los 22 meses de edad, coincidiendo con el final del programa de suplementación y justo el día anterior a su sacrificio.

Las mediciones se realizaron utilizando el analizador DEXA, InAlyzer (Medikors) específico para animales de laboratorio, disponible en la Unitat Central d'Investigació de la Facultat de Medicina (UCIM) de la Universitat de València.

Esta técnica de imagen permite la cuantificación precisa de masa total, masa magra y masa grasa, utilizando una dosis mínima de radiación ionizante. El sistema DEXA ha sido ampliamente validado tanto en estudios clínicos como en modelos animales para la estimación de la composición corporal (Brommage, 2003; Nagy & Clair, 2000; Shepherd et al., 2017).

Este equipo proporciona imágenes típicas como las que se pueden observar en la Figura 8, a partir de las cuales se determinaron los parámetros de contenido mineral óseo (g), la densidad ósea (g/cm^2), volumen (cm^3) y área ósea (cm^2), así como el porcentaje de masa magra (%) y masa grasa (%).

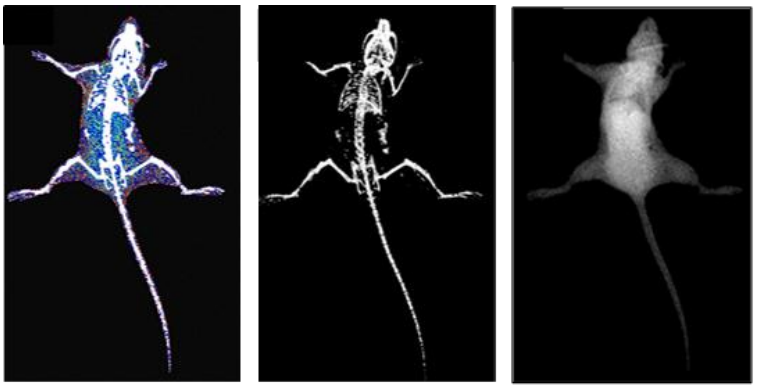


Figura 8. Imágenes adquiridas por el sistema DEXA. Imágenes representativas proporcionados por el software InAlyzer.

3.5. Determinación de parámetros hematológicos y bioquímicos en sangre total

Para la evaluación de los parámetros hematológicos en los ratones envejecidos (22 meses de edad), se empleó un analizador hematológico automatizado Element HT5 (Heska Corporation, EE. UU.). Este equipo está diseñado para proporcionar un hemograma completo mediante el uso combinado de citometría de flujo por láser, dispersión de luz y análisis por impedancia eléctrica, lo que permite una diferenciación precisa de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, así como los parámetros morfológicos asociados.

Las muestras de sangre total se obtuvieron bajo anestesia general, utilizando tubos con anticoagulante EDTA. Posteriormente, fueron procesadas en un intervalo inferior a dos horas para preservar la integridad celular y minimizar alteraciones preanalíticas (Brown et al., 2019). Se realizaron controles de calidad diarios con materiales certificados comercialmente, siguiendo las especificaciones del fabricante, para garantizar la exactitud, precisión y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Para el análisis bioquímico de parámetros críticos en sangre utilizó el analizador veterinario automatizado Skyla VB1® (Skyla Corporation, Taiwán), un equipo diseñado para el diagnóstico rápido tanto en entornos clínicos como en investigación biomédica. Este dispositivo emplea cartuchos rotatorios preconfigurados; en el presente estudio se utilizó el rotor Critical Care referencia 900-330 (Skyla™ VB1®, Hsinchu, Taiwán), el cual permite la evaluación simultánea de múltiples analitos de relevancia fisiológica y

metabólica, nitrógeno ureico; albumina, creatina fosfoquinasa, fosfatasa alcalina, creatina, alanina transaminasa; glucosa; proteína total y lactato.

Las muestras sanguíneas se recolectaron mediante tubos con EDTA, a través de la vena cava descendente, asegurando un volumen mínimo de 200 µL de sangre total. Posteriormente, se cargaron directamente en el rotor dentro de los cinco minutos posteriores a la extracción, cumpliendo rigurosamente las recomendaciones del fabricante para preservar la estabilidad de los analitos.

El analizador Skyla VB1® emplea tecnologías de absorción espectrofotométrica y conductividad iónica, proporcionando resultados en menos de 15 minutos, lo que lo convierte en una herramienta altamente eficiente y precisa para el seguimiento fisiopatológico en modelos animales.

3.6. Prueba de tolerancia a la glucosa

La PTG constituye un procedimiento estándar ampliamente utilizado tanto en humanos como en modelos animales (principalmente roedores) para evaluar la capacidad del organismo de regular la glucemia tras la administración de una carga elevada de glucosa 2% (2 g / kg de peso corporal) (Kennard et al., 2022; Moro & Magnan, 2025; Pedro et al., 2020).

En el presente estudio, la PTG se realizó a la edad de 18 meses y 22 meses, tras la suplementación. Tras 6 h de ayuno los ratones reciben una administración intraperitoneal de glucosa 2% (respecto al peso del ratón) y la glucemia se determinó a partir de muestras de sangre capilar obtenidas de la vena safena en diferentes puntos temporales: antes de la

administración intraperitoneal de glucosa (0 minutos) y posteriormente a los 15, 30, 60, 120 y 180 minutos (Figura 9).

Para la medición se empleó el glucómetro Accu-Chek Guide Me® (Roche Diagnostics, Alemania) junto con sus tiras reactivas específicas, calibradas de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Los datos obtenidos se utilizaron para generar curvas de tolerancia a la glucosa, permitiendo evaluar la eficiencia del metabolismo glucídico en los ratones envejecidos y el posible efecto modulador del tratamiento experimental sobre la homeostasis de la glucosa.

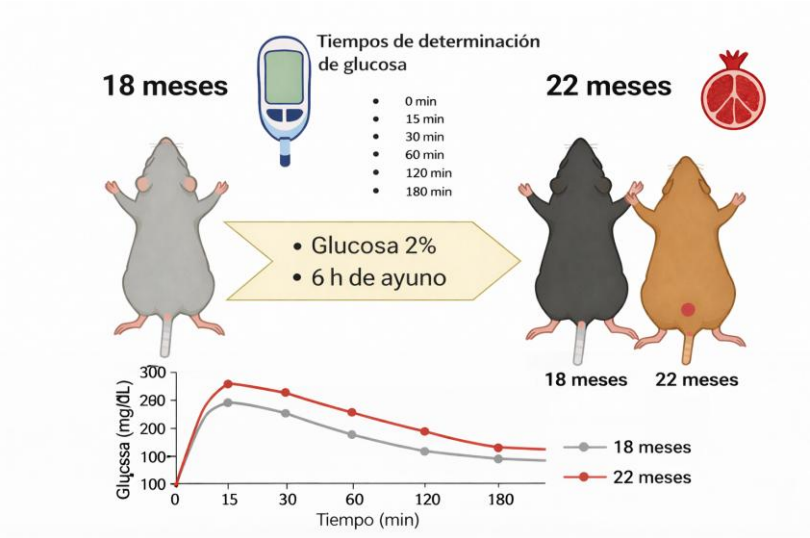


Figura 9. Diseño experimental para la prueba de tolerancia a la glucosa.

3.7. Evaluaciones funcionales y pruebas físicas

En los estudios con modelos animales, existen pruebas cuantitativas estandarizadas que además se correlacionan con el fenotipo de envejecimiento humano descrito por Linda Fried, permitiéndonos así estudiar diferentes parámetros relacionados con la fragilidad.

En nuestro estudio empleamos una adaptación del Valencia Score, el cual, incluye la medición de: coordinación motora medida con Rotarod y prueba de la escalera, fuerza de agarre medida como fuerza máxima ejercida sobre el dinamómetro, y resistencia (tiempo, distancia y velocidad máxima alcanzada en la prueba incremental en cinta rodante) (Figura 10) (Gomez-Cabrera et al., 2017; Martinez De Toda et al., 2018).

El espacio y los sistemas de evaluaciones de los parámetros de condición física que realizamos se encuentran ubicados en la UCIM. Y todas las pruebas funcionales se realizaron en la misma franja horaria, por la mañana de 8.30 horas a 12.30 horas de la mañana, y se evaluaron simultáneamente los ratones de todos los grupos experimentales.

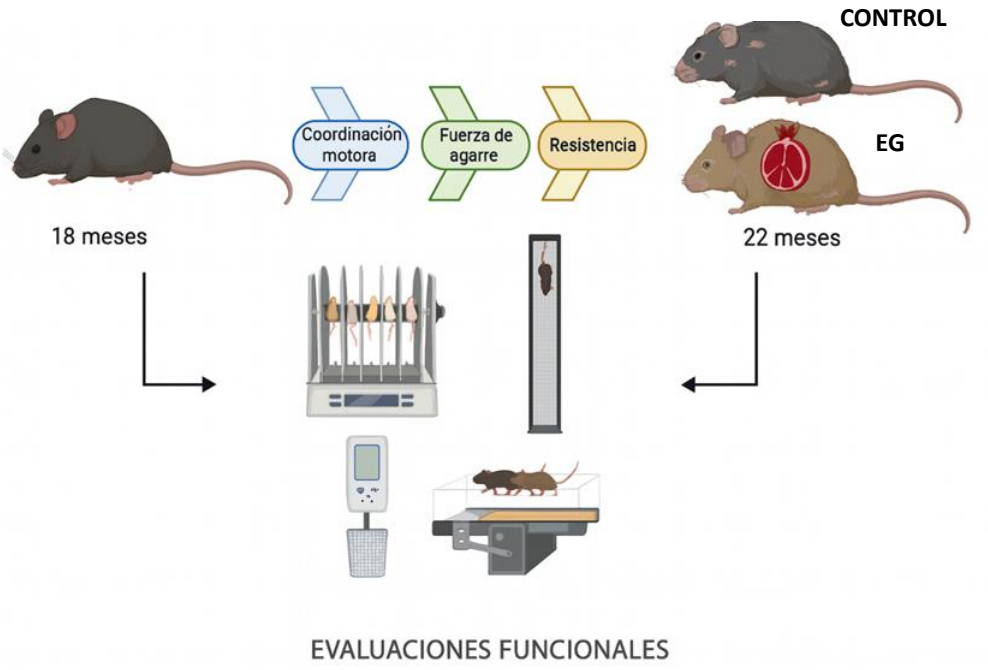


Figura 10. Diseño de las evaluaciones funcionales realizadas en ratones de 18 meses y de 22 meses con y sin suplementación con EG.

Evaluación de la coordinación motora: prueba de Rotarod

En el ámbito experimental, la coordinación motora se evalúa tradicionalmente mediante la prueba de Rotarod, ampliamente utilizada en estudios con roedores (Graber et al., 2013; Liu et al., 2014; Shoji et al., 2016). Esta prueba consiste en colocar al animal sobre una barra horizontal giratoria que rota sobre su eje longitudinal. A medida que la barra gira, el animal debe caminar hacia adelante para mantener el equilibrio y evitar la caída, lo que permite cuantificar su capacidad de coordinación y resistencia motora.

Antes de la evaluación formal, los animales se someten a un periodo de adaptación de dos días al sistema Rotarod (Panlab, Harvard Apparatus) para reducir el estrés y los efectos del aprendizaje. Las pruebas se realizan en una sala controlada, con mínimo nivel de ruido y estímulos externos, y tras 30 minutos de aclimatación del animal a las condiciones ambientales. Posteriormente, se ejecuta el protocolo experimental estandarizado, registrando el tiempo de permanencia sobre la barra (latencia de caída) como variable principal para el análisis del desempeño motor. De esta forma realizaremos el siguiente protocolo (Figura 11):

1. Encendemos el aparato Rotarod.
2. Iniciamos el modo de aceleración de 4 a 40 rpm en 300 segundos. La barra girará inicialmente a una velocidad constante de 4 rpm para permitir el posicionamiento de todos los ratones en sus respectivos carriles y la pantalla indicará "espera de aceleración" de velocidad constante de 4 rpm.
3. Retiramos los ratones de su jaula y se sitúan en el carril.
4. Esperamos 10 segundos mientras los ratones colocados en la barra caminan hacia adelante para mantener el equilibrio.
5. Iniciamos la aceleración de 4 rpm a 40 rpm en 300 seg. A partir de este momento, el temporizador comenzará a contar.
6. Registramos la latencia a la que cada ratón se cae de la barra (el valor se mostrará en la pantalla para cada carril) y devolvemos a los ratones en su jaula de origen.

7. Repetiremos este procedimiento dos veces, dejando 15 minutos de descanso entre cada intento para obtener un total de 3 mediciones. Se utiliza el valor de latencia máxima obtenido para evaluar la coordinación motora.

Los ratones que se caen de la varilla durante los primeros 10 segundos de la prueba (cuando el cronómetro aún no cuenta) se identifican como animales incapaces de realizar la prueba, por lo que se descartan.

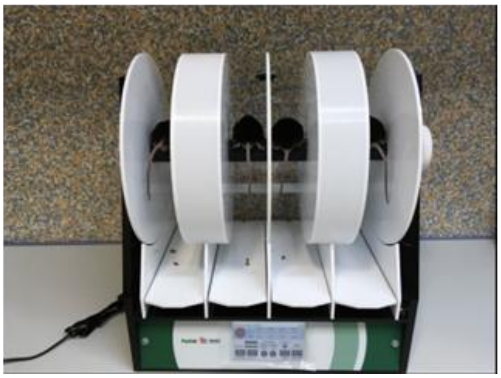


Figura 11. Fotografía representativa de la evaluación de la coordinación motora mediante el sistema Rotarod.

Evaluación de la fuerza de agarre

La prueba de fuerza de agarre utiliza comúnmente para evaluar la función neuromuscular y la fuerza máxima desarrollada por los roedores, siendo un método estandarizado para cuantificar el rendimiento muscular en estudios de envejecimiento y funcionalidad (Ackert-Bicknell et al., 2015; Ge et al., 2016; Graber et al., 2013).

En el presente estudio, la fuerza de las extremidades anteriores de los ratones se determinó utilizando un dinamómetro digital (Panlab, Harvard Apparatus) (Figura 12), el cual registra la fuerza ejercida cuando el animal se aferra a una barra metálica y es tirado suavemente hacia atrás. Este ensayo proporciona una medida directa de la fuerza de agarre absoluta (en gramos o newtons), la cual se normaliza posteriormente al peso corporal del animal para obtener la fuerza relativa, parámetro que se emplea para el análisis comparativo entre grupos experimentales.

Este procedimiento se repitió dos veces antes del día de la prueba principal, con el fin de garantizar la adaptación de los animales y la reproducibilidad de los resultados. La fuerza de agarre relativa se utilizó como variable principal para evaluar la capacidad muscular y su evolución con la edad y la suplementación experimental. Además, los ratones se aclimataron al procedimiento durante dos días previos a la evaluación, simulando las condiciones de la prueba y registrando valores preliminares.

El procedimiento experimental se desarrolló siguiendo los pasos descritos a continuación:

Extracción del animal: Se retira cuidadosamente al ratón de su jaula sujetándolo por la base de la cola, entre el pulgar y el índice.

Colocación en el dinamómetro: El ratón se baja lentamente hacia el dispositivo hasta que agarra las barras metálicas con las patas delanteras.

Medición de la fuerza: Se tira suavemente hacia atrás de la cola del ratón, asegurando que el animal mantenga el agarre con las extremidades

anteriores y que su torso permanezca en posición horizontal durante el ensayo. Una vez que el ratón suelta las barras, se registra el valor máximo de fuerza de agarre mostrado en la pantalla del dinamómetro.

Repetición del ensayo: El procedimiento se repite tres veces por individuo, con intervalos de descanso de 10 minutos entre cada intento para evitar la fatiga muscular.

Cálculo de la fuerza relativa: Los valores máximos obtenidos se dividen por el peso corporal del animal, calculando así la fuerza relativa (g / g o N / kg) como medida de capacidad funcional neuromuscular.

Figura 12. Representación de la evaluación de la fuerza de agarre mediante dinamómetro digital.

Evaluación de la resistencia física

Entre los métodos disponibles, la prueba incremental en cinta rodante es uno de los procedimientos más empleados, ya que permite evaluar la resistencia al ejercicio hasta el agotamiento, controlando la velocidad, la inclinación y la duración de la carrera (Graber et al., 2013; Massett et al., 2021; Thomas et al., 2011).

En el presente estudio, la resistencia física se determinó mediante la prueba de carrera incremental utilizando un sistema automatizado de cinta rodante para roedores (Panlab, Harvard Apparatus, Columbus Instruments (Figura 13). El día previo a la evaluación, los animales fueron sometidos a una fase de adaptación que consistió en una exploración de los carriles de la cinta y una exposición controlada a velocidades progresivas: primero a 10 cm / s durante 10 minutos y posteriormente a 14 cm / s durante 5 minutos, con el fin de familiarizarlos con el entorno y reducir el estrés experimental. El procedimiento experimental de evaluación se realizó siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Ajuste inicial del equipo: Se configuró la cinta rodante con un ángulo de inclinación positivo del 5 %, para incrementar la demanda física del ejercicio.
2. División de carriles: Se insertaron los divisores individuales en las ranuras de la cinta para separar a los animales y evitar interferencias durante la prueba.
3. Estimulación eléctrica: Se ajustó la intensidad del estímulo eléctrico a un rango de 0.2–0.4 mA, utilizado únicamente como

refuerzo para mantener la carrera, sin provocar daño ni estrés excesivo.

4. Colocación de los animales: Los ratones fueron trasladados cuidadosamente desde sus jaulas hasta los respectivos carriles.
5. Inicio de la prueba: La velocidad inicial de la correa se estableció en 10 cm / s, permitiendo un periodo de aclimatación de 4 minutos.
6. Progresión de la velocidad: Posteriormente, la velocidad se incrementó en 4 cm / s cada 2 minutos hasta que el animal alcanzó el agotamiento.
7. Finalización y registro: Una vez que el ratón no pudo continuar corriendo, fue retirado de la cinta y devuelto a su jaula. Se registró el tiempo total de carrera mostrado en la pantalla del sistema en el momento del agotamiento.

Se registraron el tiempo total de carrera (min) y la velocidad máxima de carrera (m / min) alcanzada. La velocidad máxima de carrera se consideró la capacidad de carga de trabajo aeróbica máxima del animal.

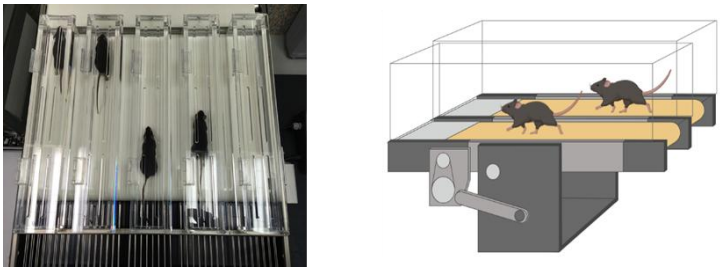


Figura 13. Representación de la evaluación de la resistencia mediante la carrera incremental en cinta rodante.

Prueba de la escalera con carga incremental

La prueba de la escalera con carga incremental constituye una herramienta ampliamente empleada para la evaluación de la fuerza y la resistencia muscular en roedores. La escalada es un comportamiento locomotor biológicamente relevante, ya que implica movimientos verticales necesarios para trepar superficies inclinadas o perpendiculares, una actividad habitual en el entorno natural de estos animales (Cummings et al., 2007; Hornberger Jr. & Farrar, 2004).

Para la presente investigación, se siguió una adaptación del protocolo descrito por Hornberger y Farrar (2004) para la determinación de la fuerza máxima de carga. Se utilizó una escalera metálica de 1 m de longitud por 0,18 m de anchura, con rejilla de 1 cm^2 y una inclinación de 80° (Figura 14). Los pesos de lastre se fijaron a la porción proximal de la cola del ratón mediante una tira adhesiva, asegurando la comodidad del animal y evitando interferencias con su movilidad.

Previo al ensayo, los ratones fueron sometidos a un día de adaptación tanto a la escalera como al sistema de lastre, para reducir el estrés y familiarizarlos con la tarea experimental. El procedimiento de evaluación se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos a continuación:

Prueba inicial sin carga: Cada ratón realizó una subida completa sin lastre hasta alcanzar la caseta o meta situada en la parte superior de la escalera. Este paso fue requisito indispensable para continuar con la prueba.

Evaluación con carga progresiva: Tras un descanso de 5 minutos, se colocó un lastre equivalente al 75 % del peso corporal del animal. Los ratones que lograron alcanzar la cima descansaron nuevamente durante 5 minutos antes de la siguiente evaluación. Aquellos que no lograron completar la subida fueron reevaluados con cargas decrecientes (50 % y 25 % del peso corporal) hasta identificar el porcentaje máximo de carga que podían transportar con éxito.

Incremento de la carga hasta el fallo: En los ratones que completaron exitosamente la escalada con una carga del 75 %, la carga se incrementó en un 25 % adicional del peso corporal en cada repetición. El fracaso o punto de agotamiento se definió como tres intentos consecutivos fallidos de alcanzar al menos dos tercios de la altura de la escalera. La carga máxima transportada con éxito se consideró la carga máxima de transporte y se expresó como porcentaje del peso corporal del animal. Este valor se utilizó como indicador cuantitativo de la fuerza muscular relativa y del rendimiento funcional de los animales evaluados.

Figura 14. Representación de la evaluación de la fuerza y coordinación motora mediante el test de la escalera inclinada.

3.8. Estudios cognitivos y de comportamiento

En el marco del presente estudio, se diseñó una batería compuesta por tres pruebas cognitivas y/o conductuales (Figura 15), con el fin de evaluar el estado cognitivo y emocional de los ratones experimentales a los 18 y 22 meses de edad. Este protocolo permitió examinar los posibles efectos del envejecimiento y de la suplementación con EG sobre diversas dimensiones del comportamiento, tales como la capacidad exploratoria, los niveles de ansiedad y la respuesta frente a situaciones de estrés. Las pruebas empleadas incluyeron la prueba de excavación y enterramiento (Figura 16), la prueba de la superficie perforada (Figura 17) y el laberinto elevado en brazos cruzados (Figura 18), ampliamente utilizadas en la literatura para el análisis de la conducta en modelos murinos.

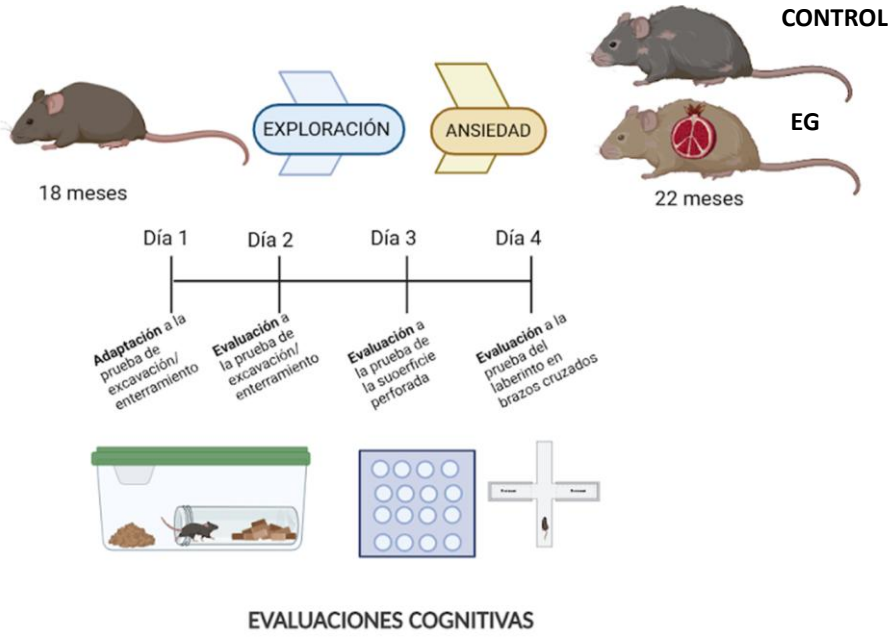


Figura 15. Diseño experimental de las pruebas de comportamiento empleadas.

Prueba de excavación-enterramiento

La conducta de excavación constituye una actividad innata y altamente desarrollada en los roedores, asociada a la exploración, la protección y la obtención de alimento. Deacon y colaboradores (Deacon, 2006, 2009) destacaron su valor como herramienta sensible para la evaluación de disfunciones neurológicas, demostrando que la prueba de excavación era capaz de detectar alteraciones tempranas en modelos de enfermedades priónicas.

Además, esta prueba ha sido empleada como un indicador conductual de bienestar y motivación en estudios de envejecimiento, mostrando que los animales de mayor edad o sometidos a deterioro cognitivo suelen exhibir una reducción en la actividad de excavación, reflejando una menor capacidad exploratoria y alteraciones en la regulación emocional. Por tanto, el análisis cuantitativo de esta conducta ofrece una medida sensible y no invasiva del funcionamiento cognitivo de los animales experimentales (Geiszler et al., 2016a; Jirkof, 2014a).

En el presente estudio, la prueba de excavación-enterramiento (Figura 16) se realizó dos horas antes del inicio del ciclo activo de los ratones (entre las 17:45 horas y las 19:45 horas), que consiste con el ciclo de oscuridad y se distribuyó en dos días consecutivos: una de adaptación y otra de evaluación.

El procedimiento metodológico se desarrolló siguiendo las siguientes etapas:

Preparación del entorno experimental. Cada tubo se llenó con 200 g de pellets para ratones, colocando el extremo cerrado del tubo contra la pared posterior de la jaula. Los animales tuvieron libre acceso al agua, pero no a alimento adicional en la tolva, con el fin de minimizar distracciones y mantener la motivación hacia la tarea.

Inicio de la prueba. Se introdujo un solo ratón en cada jaula, aproximadamente dos horas antes del ciclo de oscuridad. Durante el periodo experimental, se evitó la presencia humana para garantizar un comportamiento espontáneo.

Medición del material desplazado. Finalizada la prueba, se registró la cantidad de material desplazado desde la madriguera al suelo de la jaula. Este parámetro se calculó restando el peso del material restante en el tubo del peso inicial (200 g). En caso de que el ratón permaneciera dentro de la madriguera, se inclinaba cuidadosamente el tubo para efectuar la medición sin generar estrés adicional.

$$Material\ desplazado\ (\%) = \frac{(200 - Pr)}{200} * 100$$

Cuantificación del material enterrado. Finalmente, se determinó la proporción de material desplazado que había sido enterrado, retirando con cuidado la viruta superficial para recuperar los pellets cubiertos. Los resultados se expresaron como porcentaje de material desplazado y enterrado por cada individuo, permitiendo la comparación entre grupos experimentales.

$$Material\ enterrado\ (\%) = \frac{(Pe * 100)}{200}$$

Donde Pr corresponde al peso del material remanente dentro de la madriguera y Pe al peso del material que hemos encontrado enterrado entre la viruta.

Figura 16. Representación de la prueba de excavación para determinar la capacidad exploratoria de los roedores.

Prueba de la superficie perforada o tablero de agujeros

La prueba de la superficie perforada, comúnmente nombrado en inglés como *Hole-Board*, fue descrita originalmente por Boissier y colaboradores y fue diseñado para evaluar la conducta exploratoria en roedores (Boissier & Simon, 1962). Desde su introducción, esta prueba se ha consolidado como una herramienta ampliamente utilizada para el análisis de distintos dominios conductuales, incluyendo la exploración dirigida, la reactividad a la novedad, la ansiedad basal, determinados aspectos de la cognición, e incluso patrones de interacción social, dependiendo de la variante metodológica empleada (Boissier & Simon, 1962; Brown & Nemes, 2008; Takeda et al., 1998).

En su configuración estándar, el Hole-Board consiste en una superficie perforada elevada (100 × 50 × 50 cm) con 16 orificios circulares de 5 cm de diámetro (Figura 17). En nuestro protocolo experimental, cada ratón se situó individualmente sobre la superficie y permaneció en el dispositivo durante un total de 5 minutos. Durante ese intervalo, se registró el número de visitas a los orificios (mediante un sistema de sensores automático), entendido como el número de veces que el animal introducía la cabeza parcial o completamente en cada abertura ("*head-dipping*"), una conducta que se interpreta clásicamente como una manifestación de exploración no forzada y búsqueda de información ambiental.

Entre evaluaciones consecutivas, el dispositivo se sometió a un protocolo estandarizado de limpieza con el fin de eliminar señales olfativas que pudieran alterar la conducta del siguiente sujeto. Concretamente, se aplicó una solución de etanol (EtOH) al 1%, que se dejó actuar durante 2–3 minutos, seguida de un secado completo de la superficie.

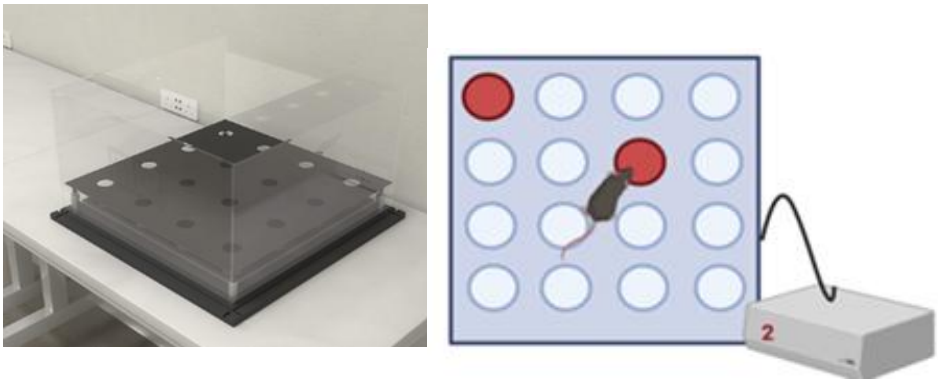


Figura 17. Diseño experimental de la prueba de la superficie perforada donde se determina la capacidad exploratoria.

Prueba del laberinto elevado en brazos cruzados

Con el fin de estudiar la ansiedad y las respuestas de evitación frente a la exposición a espacios abiertos o elevados, se han desarrollado diversos paradigmas conductuales en modelos animales. Entre ellos, el laberinto en brazos cruzados elevados, *Elevated Plus Maze Test*, EPMT, por sus siglas en inglés) se ha consolidado como uno de los instrumentos más utilizados y validados para la evaluación de la ansiedad en roedores. Este test se fundamenta en el conflicto natural del animal entre la tendencia exploratoria hacia lo novedoso y el temor innato a los espacios abiertos y elevados (Pellow et al., 1985; Walf & Frye, 2007).

El dispositivo experimental consistió en un laberinto en forma de cruz, compuesto por cuatro brazos de 50 × 10 cm, elevados a 50 cm del suelo y dispuestos ortogonalmente (Figura 18). Dos de los brazos estaban cerrados por paredes de acrílico negro opaco de 30 cm de altura, mientras que los otros dos permanecían abiertos, sin paredes laterales. Ambos tipos de brazos se conectaban a través de una plataforma central cuadrada que servía como punto de partida del ensayo. Las variables a cuantificar fueron: nº total de entradas, entradas en brazos abiertos (nº y %), entradas en brazos cerrados.

Por otro lado, también se cronometro el tiempo que el ratón se situaba en el brazo cerrado, brazo abierto y en la zona central del laberinto, así como el % invertido en dichas zonas respecto los 5 min de duración de la prueba.

El protocolo experimental se estructuró siguiendo los siguientes pasos:

Preparación del equipo y limpieza del dispositivo: Antes de cada sesión, el laberinto se limpió con una solución de EtOH 1% para eliminar rastros olfativos sin dejar residuos que pudieran interferir con la conducta del animal. Posteriormente, se verificó la conexión del sistema de grabación (cámara Logitech Brio HD 4K), ajustando el campo visual y la iluminación.

Adaptación del sujeto experimental: Los ratones se trasladaron a la sala de evaluación con una antelación de 30 a 60 minutos para permitir su adaptación a las condiciones ambientales (temperatura, intensidad lumínica y ruido ambiental). Este periodo de habituación es crucial para reducir los efectos del estrés agudo de manipulación y transporte sobre la conducta ansiosa.

Inicio de la evaluación: Cada ratón se colocó cuidadosamente en el centro del laberinto, orientado hacia uno de los brazos abiertos, iniciándose de inmediato el registro temporal (5 minutos). Tras este posicionamiento, el experimentador abandonó la sala para minimizar la influencia humana sobre el comportamiento espontáneo.

Registro y análisis conductual: El sistema automatizado de seguimiento por vídeo registró el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, así como el tiempo total que cada animal permaneció en ellos. De forma complementaria, un experimentador realizó un registro manual simultáneo mediante cronómetro para validar los datos y detectar posibles errores en la detección automática. Se consideró una entrada válida en un

brazo abierto cuando las cuatro patas del roedor se encontraban completamente dentro de dicho brazo.

Finalización y limpieza: Transcurridos los cinco minutos de evaluación, el ratón fue retirado del dispositivo y devuelto a su jaula de origen. Posteriormente, se aplicó nuevamente la solución de EtOH al 1% y se realizó un secado completo antes de evaluar al siguiente animal.

Figura 18. Diseño experimental de la prueba del laberinto en brazos cruzados elevados para estudiar el comportamiento y la ansiedad.

3.9. Determinación de los niveles de GSH y GSSG en sangre periférica

El glutatión (GSH) es un tripéptido ubicuo que comprende una amplia gama de funciones en el metabolismo a través de sus propiedades reductoras, acción desintoxicante y su papel en la síntesis de lípidos bioactivos y grupos hierro-azufre, así como en el plegamiento oxidativo de proteínas y señalización redox. Junto con el glutatión oxidado (GSSG), la ratio redox (GSH/GSSG) es un parámetro determinante e importante que contribuye al potencial redox citoplasmático y su equilibrio es indispensable para una adecuada reproducción, crecimiento y diferenciación celular.

En este trabajo, se determinaron los niveles de GSH y GSSG mediante un protocolo estandarizado donde se empleó la espectrofotometría de masas con cromatografía liquida (LC-MS) para muestras de 10 µL de sangre basado en la derivatización directa in situ de GSH con N-etilmaleimida (NEM) (Figura 19) (Ten-Doménech et al., 2022).

Para la preparación de las muestras, se depositaron 10 µL de sangre sobre papeles previamente impregnados con NEM, permitiendo la derivatización (formación de GSH-NEM) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se conservaron entre 3 y 24 horas a 4 °C antes del procesamiento.

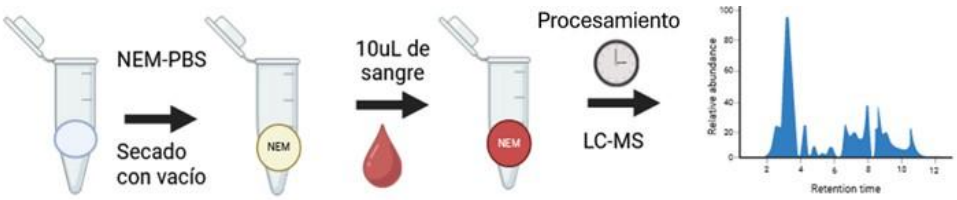


Figura 19. Diseño experimental para la determinación de los niveles de GSH y GSSG en sangre total.

3.10. Determinación de malondialdehído mediante cromatografía líquida de ultra alta precisión en plasma, cerebelo y córtex.

Para la determinación del MDA se empleó el ACQUITY UPLC®-TUV (Waters Corporation, Milford, MA, USA), que es un sistema de cromatografía líquida de ultra alta presión (UPLC) equipado con un detector ultravioleta sintonizable (Tunable UV Detector). Este detector utiliza una celda de flujo

de bajo volumen óptico, lo que minimiza la dispersión y permite una detección precisa incluso de analitos presentes en concentraciones traza.

Se empleó el software Empower™ y acoplado al sistema ACQUITY UPLC®, que trabaja hasta 15,000 psi con columnas de partículas sub-2 µm (Nováková & Vlčková, 2009; Schebb et al., 2011).

El proceso de cuantificación del analito se realiza mediante un detector espectrofotométrico, que mide la absorbancia de los compuestos eludidos en función del tiempo. La intensidad de la señal se relaciona directamente con la concentración del analito, la cual se determina comparando las AUC obtenidas con una curva patrón de concentraciones conocidas, siguiendo un principio similar al del método de Lowry para proteínas (Lowry et al., 1951) (Figura 20).

Para la detección y cuantificación de MDA se empleó el método descrito por Wong y colaboradores (Wong et al., 1987) basado en la formación de un aducto coloreado entre el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y el MDA. Este complejo (TBA–MDA_2) presenta un pico de absorbancia entre 532–535 nm, que puede ser detectado con alta sensibilidad mediante UPLC.

Preparación de las muestras. Los tejidos o células a analizar se homogeneizaron en un tampón KPi–EDTA (50 mM KH_2PO_4: 50 mM K_2HPO_4, 4:1 v/v, pH 7,4) suplementado con 0,1 mM EDTA para quelar iones metálicos y prevenir la oxidación secundaria. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó previamente para normalizar los resultados finales.

1. Preparación de la curva patrón. Se elaboró una curva estándar de MDA con concentraciones de 0,781 – 1,562 – 3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 nmol/mL, que sirvió como referencia para la cuantificación.
2. Reacción con TBA: Se mezclaron 20 µL de cada muestra o estándar con 500 µL de tampón TBA (0,2 % de TBA en una solución de 2 M de acetato de sodio, pH 6,8). Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 95 °C para permitir la formación del aducto TBA–MDA_2.
3. Centrifugación: Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 5 minutos a 4 °C, y se recuperaron 200 µL del sobrenadante para el análisis cromatográfico.

   Condiciones cromatográficas:

   - Columna Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm de Waters
   - Flujo: 0,2 ml / min
   - Fase móvil: ACN- (H_2O + 0.3 % Ác Fosfórico) proporción 10-90.
   - Tiempo de análisis: 7 minutos

4. Cálculo y normalización: El área bajo el pico correspondiente al aducto TBA–MDA_2 se integró para cada muestra, y la concentración de MDA se determinó mediante interpolación en la curva estándar. Los valores se normalizaron por el contenido proteico, expresándose finalmente como nmol de MDA por mg de proteína.

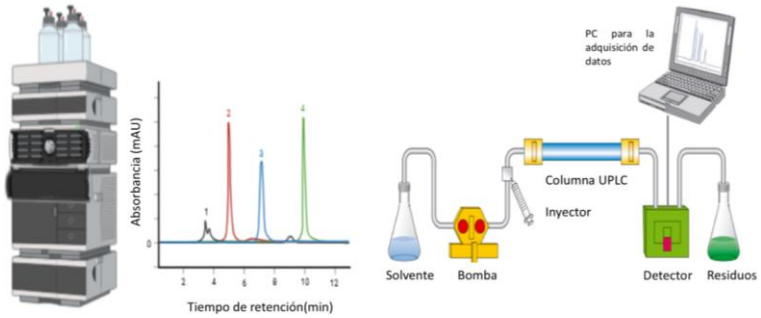


Figura 20. Diseño experimental de la determinación de MDA mediante UPLC en plasma, cerebelo y córtex.

3.11. Estudio de la expresión génica mediante PCR a tiempo real en cerebelo y córtex

Aislamiento de ARN total.

La Figura 21 muestra el protocolo de extracción de ARN total (Chomczynski & Sacchi, 2006). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica).

Tras el sacrificio se obtuvieron las muestras biológicas para proceder a la obtención de los homogenados intentando cortar siempre la misma cantidad

de muestra manteniendo la relación 10 mg de tejido por 100 µL de Trizol (Invitrogen). El tejido cortado se guarda en tubos de plástico específicos del sistema Precellys® Evolution (Avantor®, Pensilvania, Estados Unidos) añadiendo dentro de estos unas esferas de cerámica (0,65 ± 0,2 g de peso de las esferas por cada tubo) que provocan la destrucción mecánica del tejido.

El protocolo establecido para la homogenización fue:

- Revoluciones por minuto: 5.800 rpm
- Nº de ciclos de homogenización: 2
- Duración de ciclo: 15 segundos
- Descanso entre ciclos: 30 segundos

Tras la fase de homogenización se añadió cloroformo en relación de 0,2 mL por 1 mL Trizol usado. El tubo se agitó vigorosamente durante 15-20 segundos y se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 ºC. Tras este paso se ven dos fases diferentes. La parte de abajo (color rojo) es la fase orgánica, mientras que la parte acuosa (incolora), quedaría en la parte superior del eppendorf, que es donde se encuentra el ARN. Se separó esa parte acuosa a un nuevo eppendorf y se desechó la fase orgánica. Para la precipitación del ARN total, se añadió a la fase acuosa un volumen de isopropanol en relación de 0,5 mL por 1 mL trizol utilizado en el homogenado. Seguidamente, se incubó toda la noche a -20 ºC y, al día siguiente, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC. Se eliminó el sobrenadante con pipeta y el pellet se lavó con etanol al 75 % previamente

frío. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4 ºC y se retiró el etanol al 75 %. Finalmente, se resuspendió el pellet con 30-50 µl de agua DEPC.

Para la cuantificación de la concentración y pureza del ARN total se utilizó el sistema nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000), que se encuentra localizado en la UCIM. El valor óptimo del ARN total debía estar comprendido en un rango de 260 / 280 de 1,8 y por debajo de 2,2.

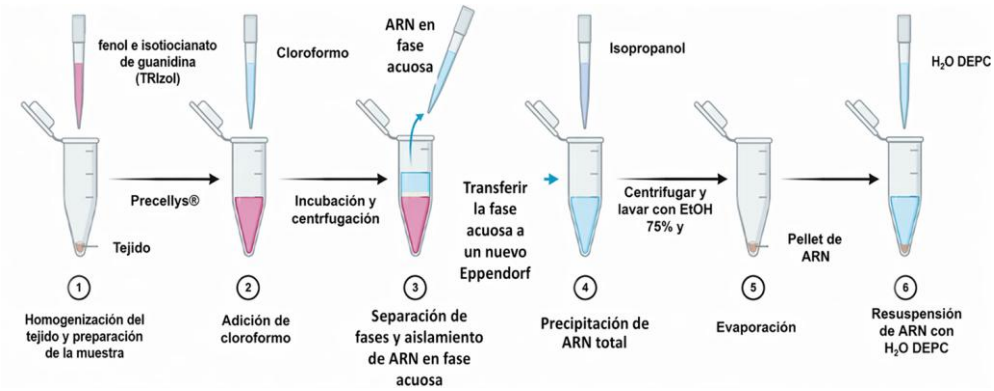


Figura 21. Proceso de extracción de ARN total de cerebelo y córtex cerebral.

Posteriormente, se sintetizó el ADNc a partir de 1 µg de ARN total utilizando un kit de RT de ADNc de alta capacidad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU) En la Tabla 3 se muestran los reactivos empleados en la retrotranscripción, y su función en el proceso de síntesis de ADNc.

Para realizar la reacción se utilizó el termociclador T100 TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, S.A) con las siguientes configuraciones: 10 min a 25 ºC, 120 min a 37 ºC, 5 min a 85 ºC y luego 4 ºC hasta almacenar a -20 ºC.

Tabla 3. Reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción.

REACTIVOS	Volumen (µL) por muestra
Tampón de RT 10X	2
25X dNTPs (100 mM)	0,8
Cebadores aleatorios de RT 10X	2
Enzima MultiScribe TM Reverse Transcriptase (MsRT)	1
Muestra	- µL (normalizado a 1 µg)
Agua libre de RNAsas (DEPC)	- µL (hasta un volumen final de 20 µL)

PCR en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR se realizó utilizando las sondas Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) especificadas en la Tabla 3. Específicamente se empleó el reactivo TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que contiene ADN polimerasa AmpliTaq Fast, uracilo-N glicosilasa (UNG), dNTPs con dUTP, y tampón optimizado.

Para realizar la reacción se utilizó 1 µl de ADNc, 5 µl reactivo TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0,5 µl de la sonda TaqMan específica para cada gen de interés o housekeeping (*Gapdh)* y H_2O libre de ARNasa hasta un volumen de 10 µl. A continuación, y tras someter la placa a una ligera centrifugación

a 1000 rpm 1 minuto con la centrifuga (Eppendorf™ Centrifuge 5430) la reacción se llevó a cabo con el sistema de detección Quant Studio 5 PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) configurado de la siguiente manera en cada paso:

- 50 ºC durante 2 minutos
- 95 ºC durante 2 minutos
- PCR (40 ciclos de amplificación): 95 ºC 1 segundo, 60 ºC 20 segundos

En todos los experimentos, se añadió un control negativo que utilizaba H_2O libre de ARNasa en lugar de ADNc y todas las muestras se realizaron por duplicado. Para el análisis de resultados se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permite cuantificar la expresión relativa de ARNm de un gen en una muestra respecto a un control, normalizando siempre con un gen de referencia como GAPDH. Primero se calcula el ΔCt, que es la diferencia entre el Ct del gen problema y el Ct del gen de referencia, y luego se obtiene el ΔΔCt, restando el ΔCt de la muestra control al ΔCt de la muestra problema. Con este valor se aplica la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que indica cuánto aumenta o disminuye la expresión del gen analizado en la muestra problema respecto al control.

En nuestro caso empleamos las sondas Taqman que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Sondas TaqMan empleadas en los estudios de expresión génica.

NOMBRE GEN	ABREVIATURA	REFERENCIA COMERCIAL
Beta-2-Microglobulina	*B2m*	Mm00437762_m1
Caspasa 3	*Casp3*	Mm01195085_m1
Caspasa 8	*Casp8*	Mm01255716_m1
Caspasa 9	*Casp9*	Mm00516563_m1
Catepsina S	*Ctss*	Mm00457902_m1
Complemento 4B	*C4b*	Mm00437890_m1
Complemento C1q Cadena A	*C1qa*	Mm00432142_m1
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	*Gapdh*	Mm99999915_g1
Lisozima C	*Lzp-s*	Mm00657323_m1
Proteína ácida gliar fibrilar	*Gfap*	Mm00546086_m1

3.12. Análisis por citometría de flujo de la producción de especies oxidativas

Para evaluar de forma cuantitativa los cambios inducidos por el EG en las distintas poblaciones celulares analizados, se realizó un análisis mediante citometría de flujo.

Todos los ensayos por citometría de flujo se realizaron usando el citómetro FACSAria III (BD Biosciences, East Rutherford, Nueva Jersey, Estados Unidos) ubicado en la Unidad de Citometría de Flujo dentro de la UCIM en Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Se usó el láser Violeta (405 nm) y todas las muestras se incubaron con un fluoróforo acoplado al anticuerpo CD45, cuyo nombre comercial es Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD45 Antibody (Biolegend ®, San Diego, U.S.A) que se excita a 405 nm y emite a 421 nm. La fluorescencia del 2'-7'diclorofluoresceína (DCF), MitoPY1 (por sus siglas en inglés, *Mitochondrial Peroxy Yellow* 1, MitoPY) se recogió en un filtro 527/32 507LP mientras que la de la dihidrorrodamina 123 (DHR 123) en un filtro 530/30 505LP. El software para la recogida de datos fue el FACSDiva 4.0 mientras que el análisis off-line de los datos se hizo con el software FLOWJO V.10.1.

Los eventos adquiridos por muestra fueron de 10,000 como condición de parada, con una velocidad de flujo lenta para evitar la aparición de dobletes.

Los fluorocromos empleados para el estudio de las especies oxidantes estaban todos ellos guardados a -20 ^{o}C, se incubaron todos ellos a 37 ^{o}C durante 20 min en un volumen de suspensión de lisado celular de 300 μL fueron:

- DCF (5 mM, ex 488 nm, em 525 nm, detector FL1 Log) para la detección de peróxidos citoplasmáticos (Gomes et al., 2005; Wardman, 2007).

- DHR 123 (5 mM, ex. 488 nm, em. 525 nm; detector FL1 Log) para detectar niveles de peróxido de hidrogeno, del radical hidroxilo y el anión peroxinitrito en leucocitos y mitocondrias (Gomes et al., 2005; Rothe et al., 1988; Wardman, 2007).
- MitoPY (1 mM, ex. 488 nm, em. 625 nm; detector FL3 Log) para detectar niveles del radical superóxido mitocondrial (Jávega et al., 2022).

En la Figura 22 se resume el procedimiento experimental.

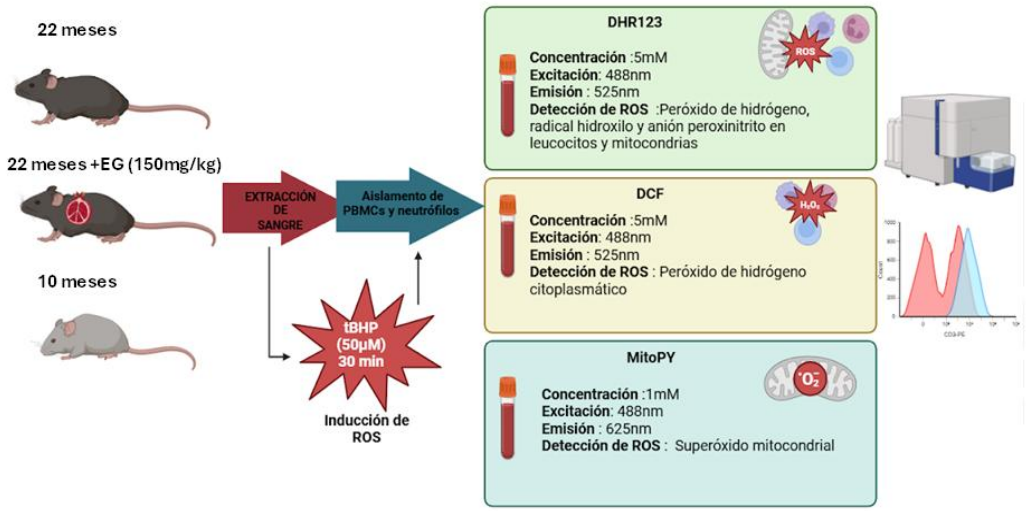


Figura 22. Diseño experimental del estudio de citometría de flujo en sangre periférica para determinar los niveles de ROS en condiciones basales y tratadas con tBHP (50 µM).

Protocolo experimental en células mononucleares de sangre periférica

El día del sacrificio se obtuvo sangre entera para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) de los ratones de 10 meses y 22 meses con y sin suplementación en un tubo con EDTA. Inmediatamente dichos tubos se trasportan a la sala de citometría donde se procede de la siguiente forma (Figura 22):

Marcaje monoclonal de leucocitos: Se separaron 50 µL de sangre en tubos de citometría y se trataron con 2 µL del conjugado Brilliant Violet 421™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) anti-mouse CD45, 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Lisis de eritrocitos: Transcurrido el tiempo de marcaje de leucocitos, para obtener células mononucleares de sangre periférica se empleó el método de separación por lisis de las células rojas sanguíneas (RBC por sus siglas en inglés) mediante el tampón de lisis de eritrocitos eBioscience™ 10x (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) el cual se añadirá a cada uno de los tubos con la sangre marcada con CD45 hasta alcanzar un volumen total de 3 mL. Llegado este punto, para el estudio de inducción de daño oxidativo, se añadió tert-butilhidroperóxido (t-BHP) 50 µM durante 30 min.

Marcaje con fluorocromos: Distribuímos 300 µL de sangre lisada a cada tubo de citometría donde después se añadieron los diferentes fluorocromos (DCF, DHR123 y MitoPY). En los controles negativos, no se añadió marcador, para poder descartar la auto florescencia; mientras que en

los tubos destinados a los controles positivos se añadió la Plumbagina (Pb) a una concentración final de 2,24 µg / mL para aumentar los niveles de O_2^- .

La Pb se debe añadir previamente al marcador fluorescente durante unos 30 min. Una vez que los tubos han recibido los tratamientos nombrados en el paso anterior, deben permanecer a 37 ºC durante 30 min en oscuridad con el fluorocromo correspondiente. Se realizaron duplicados técnicos.

Análisis por citometría de flujo: Las células mononucleares se seleccionaron en el citómetro de flujo mediante sus características morfológicas de tamaño (Forward Scatter, FS) y granularidad (Side Scatter, SS), en escala lineal procedente de la dispersión de luz y con el discriminador por tamaño (FS), con un valor angular alrededor de 80 ºC.

3.13. Estudio histológico del cerebelo

Los estudios histológicos del cerebelo en modelos murinos han sido esenciales para la comprensión de la estructura y función de esta región del sistema nervioso central en los mamíferos. El cerebelo, tradicionalmente asociado a la coordinación motora y al mantenimiento del equilibrio, también participa de manera activa en diversas funciones cognitivas y afectivas, gracias a su intrincada red de conexiones con la corteza cerebral y los núcleos subcorticales (Voogd, 1998).

En el contexto de envejecimiento, el análisis histológico del cerebelo constituye una herramienta fundamental para correlacionar las

modificaciones estructurales con las alteraciones funcionales asociados a la edad y para determinar si el EG ejerce efectos protectores.

Realización de cortes y tinción con hematoxilina y eosina

En el estudio histológico se incluyeron animales de 10 meses de edad (grupo adulto), grupo control de 22 meses (controles envejecidos) y grupo suplementado con EG a 22 meses (grupo envejecido suplementado).

1. **Fijación del tejido**

La fijación del tejido constituye una etapa crítica en el procesamiento histológico, cuyo propósito principal es preservar la arquitectura celular y tisular en un estado lo más próximo posible al natural.

En el presente trabajo se utilizó formaldehído en su forma acuosa, es decir, formalina al 4 %, que constituye el fijador universal de referencia en estudios histopatológicos. Este fijador actúa mediante la formación de enlaces cruzados covalentes entre grupos amino de proteínas, lo que estabiliza las estructuras celulares e impide su degradación (Fox et al., 1985). Esta reacción de reticulación mantiene la integridad de los tejidos sin alterar significativamente la morfología, permitiendo la conservación de detalles histológicos finos y la compatibilidad con la mayoría de los métodos de tinción convencionales, incluida la hematoxilina-eosina (H&E) (Bancroft & Gamble, 2008).

2. Corte del tejido

El corte de tejido se realizó empleando un microtomo, el cual es el instrumento utilizado para realizar cortes uniformes y delgados, en nuestro caso, realizamos cortes de 4 µM a partir de tejidos incluidos en bloques de parafina, mediante el sistema Leica RM2245 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) ubicado en el departamento de Patología Humana de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València. Posteriormente, estos cortes se montaron y secaron en portaobjetos hasta su tinción.

3. Tinción con Hematoxilina/Eosina

El principio de la tinción H&E se basa en las diferencias de afinidad entre los componentes ácidos y básicos de la célula. La hematoxilina, un colorante básico, se une a los componentes ácidos, principalmente los ácidos nucleicos del núcleo, tiñéndolos de un tono azul o violáceo. Por su parte, la eosina, un colorante ácido, tiene afinidad por los componentes básicos del citoplasma y la matriz extracelular, adquiriendo tonalidades rosadas o rojizas (Carson & Cappellano, 2015).

El protocolo utilizado siguió un procedimiento estandarizado que comprende:

1. Desparafinación y rehidratación: Eliminación de la parafina mediante xileno y rehidratación secuencial en alcoholes decrecientes hasta agua destilada.

2. Tinción nuclear con hematoxilina: Inmersión en hematoxilina durante aproximadamente 3 minutos.
3. Azulado del núcleo: Exposición breve a agua alcalina para estabilizar la coloración azul característica de la hematoxilina.
4. Tinción citoplasmática con eosina: Exposición a eosina al 1% durante 30 segundos y diferenciación opcional para optimizar el contraste.
5. Deshidratación, aclarado y montaje: Deshidratación mediante alcoholes ascendentes, aclarado en xileno y montaje con medio permanente Entellan®.
6. Secado final: Permanencia de los portaobjetos montados en estufa a 37 °C durante 24 horas para completar la fijación del montaje.

Cuantificación del estudio histológico

El cerebelo está compuesto por tres capas principales: la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granular. La capa molecular contiene dendritas de las células de Purkinje y axones de células granulares, así como interneuronas como las células estrelladas y en cesta. La capa de Purkinje se caracteriza por la presencia de las grandes células de Purkinje, las únicas células que envían información fuera de la corteza cerebelosa. Finalmente, la capa granular es la más interna y contiene la mayor densidad de neuronas en el cerebelo, siendo en su mayoría células granulares pequeñas (Cerminara et al., 2015; Voogd, 1998)

Los cortes histológicos teñidos con H&E fueron examinados empleando un microscopio Leica DMD108 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) mientras que para la cuantificación digital se recurrió al escaneo sistemático de las muestras mediante un escáner de portaobjetos Ventana iSCAN (Roche Diagnostics, Sant Cugat, España). El estudio morfométrico cuantitativo se llevó a cabo utilizando el software QuPath versión 0.5.1 (software Qwin 500, Cambridge, Reino Unido) una plataforma abierta de análisis de imágenes de patología digital (Bankhead et al., 2017).

En la presente tesis se determinaron los siguientes parámetros descritos en la Tabla 5, obteniendo así, una caracterización detallada y comparativa del estado histopatológico de los distintos grupos experimentales.

Tabla 5. Parámetros estudiados para el estudio histológico del cerebelo.

CAPA GRANULAR	CAPA MOLECULAR	CÉLULAS DE PURKINJE	VACUOLAS
Grosor de la capa granular (µm) Nº de células / Área de cuantificación (nº cel / μm^2).	Grosor de la capa molecular (µm) Nº de células / Área de cuantificación (nº cel / μm^2).	Nº de células de Purkinje (nº células) Nº de células / Área de capa de Purkinje (nº cel/ μm^2) Área de células de Purkinje (μm^2)	Nº relativo de vacuolas

3.14. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism v9, estableciendo un nivel de significación de $p < 0,05$. Los datos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM) o media ± desviación estándar (DE), según correspondiera.

Previamente, se evaluó la normalidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov, así como la homogeneidad de varianzas cuando fue necesario.

Para la comparación entre dos grupos independientes, se utilizó la prueba *t* de Student no pareada cuando los datos presentaban una distribución normal. En caso contrario, se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Cuando se compararon tres o más grupos independientes, se aplicó un análisis de la varianza de una vía (*one-way* ANOVA) para datos paramétricos. En aquellos experimentos con dos variables independientes, se utilizó un análisis de la varianza de dos vías (*two-way* ANOVA). En ambos casos, se realizaron pruebas post hoc para comparaciones múltiples, como la prueba de Tukey. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad, se emplearon pruebas no paramétricas equivalentes, como la prueba de Kruskal-Wallis.

En los estudios de supervivencia de C. *elegans*, las curvas de supervivencia se analizaron mediante la prueba de Log-Rank, también denominada Mantel-Cox.

RESULTADOS

1. Estudio del efecto de la suplementación con EG en un modelo de *C. elegans*

Como hemos comentado en la introducción, *C elegans* es un organismo modelo ampliamente utilizado en estudios de envejecimiento y en el ámbito de la nutrición que lo convierte en una herramienta poderosa para estudiar procesos biológicos relevantes.

Estas características nos llevaron a seleccionar este modelo para iniciar nuestros estudios, permitiendo una primera aproximación al efecto de nuestra suplementación con EG en el envejecimiento. Evaluaremos su impacto en términos de esperanza de vida y vitalidad en el nematodo *C. elegans*.

1.1. Estudio de esperanza de vida

El objetivo de este apartado fue estudiar el efecto del EG sobre la longevidad de *C. elegans* a diferentes concentraciones. Las dosis más altas de 1, 5 y 10 mg / mL de nuestro extracto mostraron curvas de supervivencia inferiores a la curva control (Figura 23).

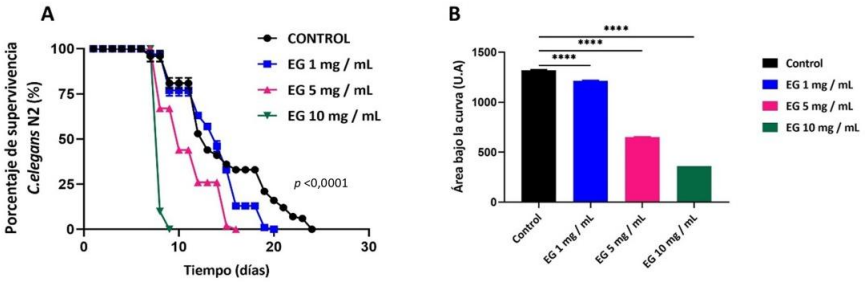


Figura 23. Efecto del EG a diferentes concentraciones altas sobre la longevidad en *C. elegans.* Datos correspondientes a dos ensayos independientes (n= 200 gusanos/condición). (A) Curvas de supervivencia de *C. elegans* cepa N2 tratadas con

distintas concentraciones de extracto de EG (1, 5 y 10 mg / mL) en comparación con el grupo control. Los datos se representan como porcentaje de supervivencia acumulada a lo largo del tiempo (días). (B) Representación del área bajo la curva correspondiente a cada grupo experimental. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (SEM). **** $p < 0,0001$ respecto al control:

Los gusanos alimentados con las dosis más bajas 0,005 y 0,01 mg / mL no presentaron cambios en la curva de longevidad (Tabla 6). El rango de dosis que presentaron una mayor supervivencia fueron 0,05, 0,1 y 0,5 mg / mL en comparación con los gusanos alimentados en condiciones control (Tabla 6) (Figura 24). Nuestros resultados nos indican que, las dosis de 0,05 y 0,1 mg / mL fueron las dosis más óptimas y terapéuticas (Figura 26, Tabla 6). Estas dosis presentaron un incremento de la vida media (día cuya supervivencia es del 50 %) de 6 días para la dosis de 0,05 mg / mL y 2 días para la dosis de 0,1 mg / mL respecto a la condición control. Además, mostraron una prolongación de la esperanza de vida final (día cuya mortalidad es del 100 %) siendo 2 días para la dosis de 0,05 mg / mL y de 1 día para la dosis de 0,1 mg / mL (Figura 24, Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de diferentes concentraciones de EG sobre la esperanza de vida en *C. elegans*.

Dosis de EG (mg / mL)	Efecto positivo sobre la esperanza de vida	Incremento de la vida media vs control (días)	Incremento de la esperanza de vida máxima vs control (días)
0,005	$p > 0,05$	0	0
0,01	$p > 0,05$	0	0
0,05	$p < 0,0001$	6	2
0,1	$p < 0,0001$	2	1
0,5	$p < 0,001$	2	0

Vida media: día en que la población tiene el 50 % de mortalidad. Esperanza de vida máxima: día en que la población tiene el 100% de mortalidad.

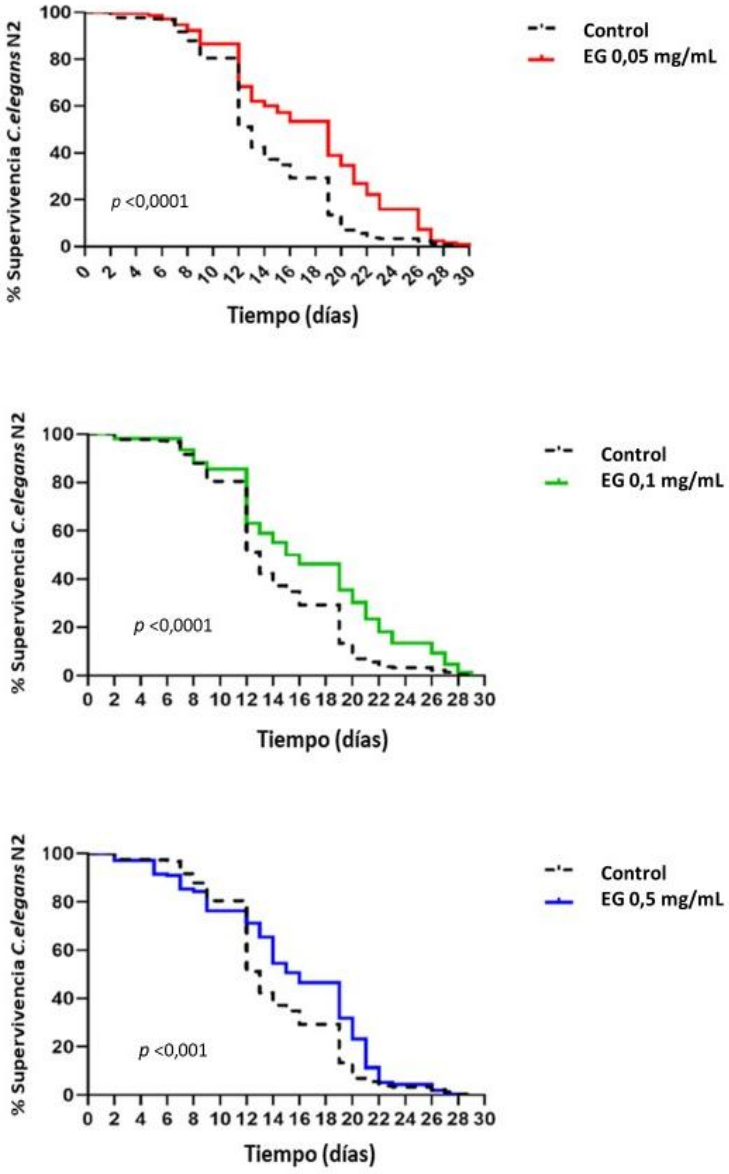


Figura 24. Efecto del EG a diferentes concentraciones bajas sobre la esperanza de vida de *C. elegans*. Los datos corresponden a dos experimentos independientes (N= 200 gusanos/condición).

1.2. Estudio de la vitalidad

Como se destacó en el apartado anterior, nuestra suplementación con EG mostró un efecto positivo en la esperanza de vida de los nematodos. Sin embargo, nuestro siguiente objetivo fue determinar si este efecto también se extendía a su vitalidad.

Para evaluar el efecto del EG sobre la vitalidad de *C. elegans*, se realizaron ensayos de movilidad de los nematodos cultivados en cada una de las diferentes dosis empleadas de EG (0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 mg / mL) durante los ocho primeros días de la etapa adulta del gusano. En primer lugar, los gusanos suplementados con EG de 0,1, 0,5 y 1 mg / mL no presentaron un efecto positivo en la motilidad de los gusanos (Figura 25).

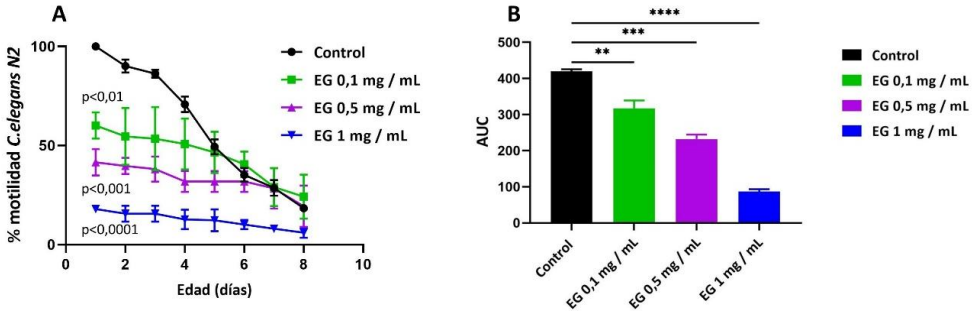


Figura 25. Efecto del EG a diferentes concentraciones sobre la vitalidad de *C. elegans*. Datos correspondientes a dos ensayos independientes (n= 200 gusanos/condición). ** *p* 0,01; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado con el grupo control.

Para las dosis inferiores de este extracto 0,005 y 0,01 mg / mL, no se observaron cambios significativos en la movilidad mientras que para la dosis

0,05 mg / mL se observó un aumento significativo de la vitalidad de los gusanos alimentados a esa dosis (Figura 26).

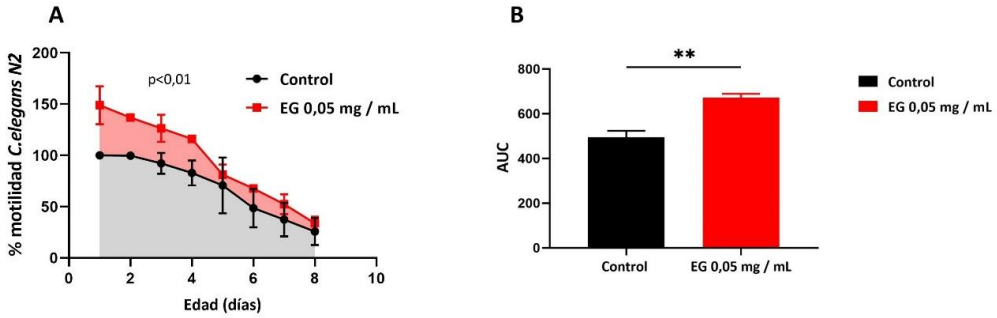


Figura 26. Estudio de la vitalidad con y sin suplementación con EG a concentraciones de 0,05 mg /mL en *C. elegans.* (A) Registro del estudio de motilidad durante los 8 primeros días de vida y (B) Área bajo la curva derivada de las dos curvas, nematodos sin suplementación (control, en color gris) y suplementados con EG (en color rojo). Los datos corresponden a la motilidad registrada por un sistema automatizado de registro de video y corresponden a dos experimentos independientes (N= 200 gusanos/condición). $^{**}p < 0,01$ comparado con el grupo control.

2. Estudio del efecto de la suplementación con EG en modelo murino envejecido

Después de observar cambios en la suplementación con EG en un modelo sencillo como *C. elegans,* decidimos estudiar el efecto de nuestro extracto en un modelo más complejo, eligiendo el modelo murino envejecido. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la cepa murina C57BL/6J empieza a adquirir el fenotipo de envejecimiento (en términos de fragilidad) a los 18 meses, siendo la edad a la que decidimos

realizar la suplementación con EG en ratones para responder a nuestra pregunta si el EG podría prevenir o mitigar los efectos del envejecimiento.

2.1. Estudio antropométrico y de seguimiento del peso corporal en ratones envejecidos suplementados con EG

2.1.1. Estudio de parámetros antropométricos

Se llevó a cabo un estudio antropométrico mediante el sistema DEXA en todos los grupos experimentales. Las medidas se realizaron a dos tiempos: antes del inicio de la suplementación (18 meses) y después de la suplementación durante 4 meses (22 meses), el día previo al sacrificio. Dicho estudio nos permitió estudiar de forma longitudinal los parámetros: % masa grasa, % masa magra, contenido óseo (g), densidad ósea (g / cm^2), volumen óseo (cm^3) y área ósea (cm^2). Como muestra la Tabla 7, no se observó ningún cambio significativo en los diferentes parámetros analizados, ni en términos de envejecimiento (ratones con edad de 18 meses comparados con 22 meses) ni tras finalizar la suplementación (ratones suplementados y no suplementados a edad de 22 meses).

Tabla 7. Composición corporal de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

Parámetro	18 meses	22 meses	22 meses + EG
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
% masa grasa	23,31 ± 5,19	18,06 ± 3,56	17,23 ± 2,83
% masa magra	69,45 ± 19,22	80,10 ± 3,55	80,93 ± 2,55

Contenido óseo (g)	0,90 ± 0,09	0,79 ± 0,05	0,78 ± 0,09
Densidad ósea (g/cm^2)	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Volumen óseo (cm^3)	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,19 ± 0,12
Área ósea (cm^2)	11,91 ± 0,78	11,31 ± 0,27	11,98 ± 1,35

EG=Extracto de granada; n= 13 ratones de edad 18 meses, n= 5 ratones de edad 22 meses y n= 4 ratones de edad 22 meses suplementado con EG.

2.1.2. Estudio de la evolución del peso corporal

Paralelamente al estudio antropométrico, se realizó un estudio de la evolución del peso corporal y se pesaron los ratones 3 veces a la semana durante los cuatro meses de suplementación. Como muestra la Figura 27A, el peso de los ratones a lo largo de la suplementación es diferente entre los dos grupos de estudio, ya que, se observó como a partir de los 20 meses, los ratones suplementados fueron más resistentes a la pérdida de peso involuntaria en comparación con los no suplementados.

En la Figura 27B observamos que el EG era capaz de revertir la pérdida de peso involuntaria asociada al envejecimiento, ya que, los ratones que recibieron el suplemento perdieron significativamente menos peso mensual que los ratones que no recibieron el EG.

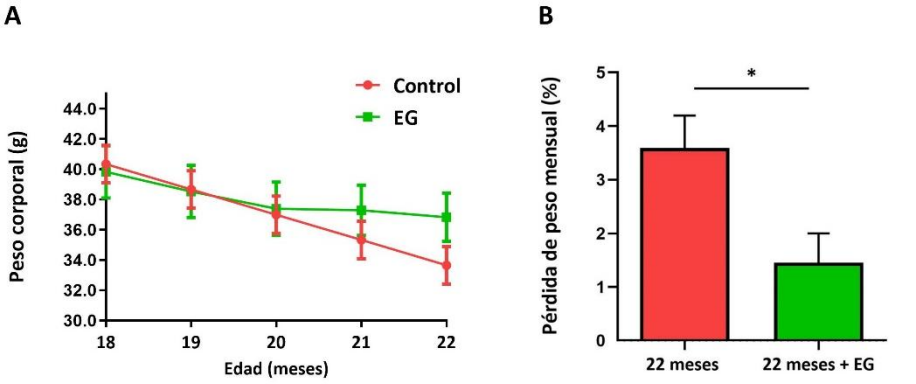


Figura 27. Efecto de la suplementación con EG sobre la pérdida de peso involuntaria en modelo murino envejecido. (A) Evolución de peso de los dos grupos experimentales de ratones durante los cuatro meses de suplementación. (B) Porcentaje de pérdida de peso mensual de los ratones de los dos grupos experimentales. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 8-9 por grupo). * $p < 0,05$. Comparado con el grupo de 22 meses sin suplemento.

2.2. Estudio hematológico y bioquímico en ratones envejecidos suplementados con extracto de granada

Los parámetros hematológicos y bioquímicos pueden proporcionarnos información importante sobre el estado general y sistémico, así como del metabolismo de ciertas biomoléculas que pueden darnos una aproximación inicial del estado de salud de nuestros ratones. Por ello, tras finalizar la suplementación (a los 22 meses de edad), se procedió a la extracción de sangre de los ratones pertenecientes tanto al grupo control (no suplementado) como al suplementado.

Nuestros resultados hematológicos obtenidos indican que la suplementación con EG, en general, no tuvo un gran impacto sobre los

parámetros analizados (Tabla 8) a pesar de un incremento en el porcentaje de monocitos.

Tabla 8. Parámetros hematológicos de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

Parámetros hematológicos	22 meses	22 meses + EG
	Media ± DE	Media ± DE
WBC (10^9/L)	4,27 ± 1,47	3,76 ± 1,63
Neutrófilos (10^9/L)	1,52 ±0,87	1,20 ± 5,03
Linfocitos (10^9/L)	2,40 ±1,13	2,00 ± 8,88
Eosinófilos (10^9/L)	0,15 ± 0,08	0,19 ± 3,69
Basófilos (10^9/L)	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,06
Monocitos (10^9/L)	0,23 ± 0,15	0,35 ± 0,16
Neutrófilos (%)	34,72 ± 9,80	33,45 ± 0,29
Linfocitos (%)	56,10 ± 10,06	50,50 ± 1,27
Eosinófilos (%)	4,53 ± 4,00	5,88 ± 0,11
Basófilos (%)	0,38 ± 0,14	0,35 ± 0,01
Monocitos (%)	4,27 ± 1,61	9,83 ± 4,32**
RBC (10^{12}/L)	7,79 ± 0,26	7,62 ± 0,55
HGB (g/dL)	10,98 ± 0,74	10,63 ± 0,94
HCT (%)	34,52 ± 1,99	33,85 ± 3,91
VCM (fL)	44,27 ± 2,06	44,38 ± 2,84
MCH (pg)	14,10 ± 0,87	13,93 ± 0,38
MCHC (g/dL)	17,08 ± 0,53	32,57 ± 16,29
RDW-CV (%)	16,66 ± 1,04	14,93 ± 1,16
PLT (10^9/L)	731,50 ± 208,47	1.592,25 ± 934,74
VPM (fL)	5,46 ± 0,09	5,57 ± 2,78

EG=Extracto de granada, WBC = Células Blancas Sanguíneas ‘’*White Blood Cells*’’ por sus siglas en inglés, RBC =Eritrocitos ‘’*Red Blood Cells*’’ por sus siglas en inglés, HGB= Hemoglobina, HCT = Hematocrito, VCM = Volumen corpuscular medio, HCM= hemoglobina corpuscular media ,CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular media, RDW=

amplitud de distribución eritrocitaria, PLT = Plaquetas por sus siglas en inglés, VPM = Volumen plaquetario medio .N= 6 ratones de edad 22 meses y n= 4 ratones de edad 22 meses suplementados con EG ** $p < 0,01$

El análisis bioquímico de sangre se llevó a cabo empleando un rotor analítico que permitió evaluar una serie de parámetros bioquímicos como: urea, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina y creatina fosfoquinasa, proteína total, enzimas hepáticos como la ALP (fosfatasa alcalina) y ALT (alanina transaminasa), además de glucosa y lactato (Tabla 9). En general, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la mayoría de los parámetros determinados, con la excepción de un aumento significativo de los niveles de lactato en el grupo suplementado.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

Parámetros bioquímicos	22 meses	22 meses + EG
	Media ± DE	Media ± DE
Urea (mg / dL)	58,51 ±34,18	62,40 ± 14,21
Bun	27,66 ± 15,76	31,42 ± 7,78
Alb (g / dL)	3,15 ±0,42	3,64 ± 0,47
Cpk (mg / dL)	189,00 ±57,00	216,00 ± 45,00
Alp (U/L)	53,85 ± 17,50	56,80 ± 21,39
Crea (U/L)	0,45 ± 0,19	0,53 ± 0,21
Alt (U/L)	32,85 ± 7,05	35,80 ± 15,07
Glu (mmol / L)	163,85 ± 58,93	185,60 ± 61,04
Tp (g / dL)	4,11 ± 1,02	5,02 ± 0,61
Lac (mmol / L)	3,22 ± 1,50	5,22 ± 1,30*

EG=Extracto de granada; Bun= Nitrogeno ureico; Alb= Albumina, Cpk= Creatina fosfoquinasa; Alp= Fosfatasa alcalina, Crea= Creatina, Alt= Alanina transaminasa; Glu= Glucosa; Tp= Proteína total; Lac= Lactato. n= 7 ratones de 22 meses y n= 4 ratones de 22 meses + EG. * $p < 0,05$. Comparado con el grupo de 22 meses sin suplemento.

2.3. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones envejecidos suplementados con EG

La PTG nos permitió profundizar en el metabolismo glucémico y determinar si nuestra suplementación lo modulaba.

En primer lugar, se llevó a cabo una PTG a todos los ratones de 18 meses previa a la suplementación. Tras los cuatro meses de suplementación se repitió la prueba a los dos grupos experimentales: con y sin suplemento. Como muestra la Figura 28A, la glucosa basal es significativamente mayor en los ratones de 18 meses, situándose alrededor de 100 mg / dL en este grupo y observándose una reducción a 85 mg / dL en los ratones de 22 meses de edad, tanto en el grupo sin suplemento como con suplemento. Las curvas derivadas de la prueba de PTG indicaron, en todos los grupos, un pico a los 15 y 30 minutos después de la inyección intraperitoneal de glucosa seguido de una disminución progresiva con el tiempo y además, que la curva de ambos grupos con edad de 22 meses mostraba una curva por debajo de la edad de 18 meses (Figura 28B). El análisis del área bajo la curva (AUC) de dichas curvas (Figura 28C) mostró una disminución del área debido al envejecimiento, siendo significativamente inferior en los ratones de 22 meses sin suplementar respecto a los valores obtenidos a 18 meses de edad. Sin embargo, el grupo suplementado, a pesar de obtener un AUC menor respecto a los ratones de 18 meses, es significativamente superior al AUC de los ratones no suplementados.

Por último, determinamos la ratio Gt120 / Gt0, que se refiere a la relación entre la glucosa a los 120 minutos y la glucosa basal (en ayunas)

obtenida durante una Prueba de Tolerancia a la Glucosa (PTG) y el cual es indicativo de la capacidad de recuperación de los niveles basales de glucosa (Figura 28D), siendo esta ratio similar (alrededor de 1) en los tres grupos experimentales y sin mostrar diferencias significativas.

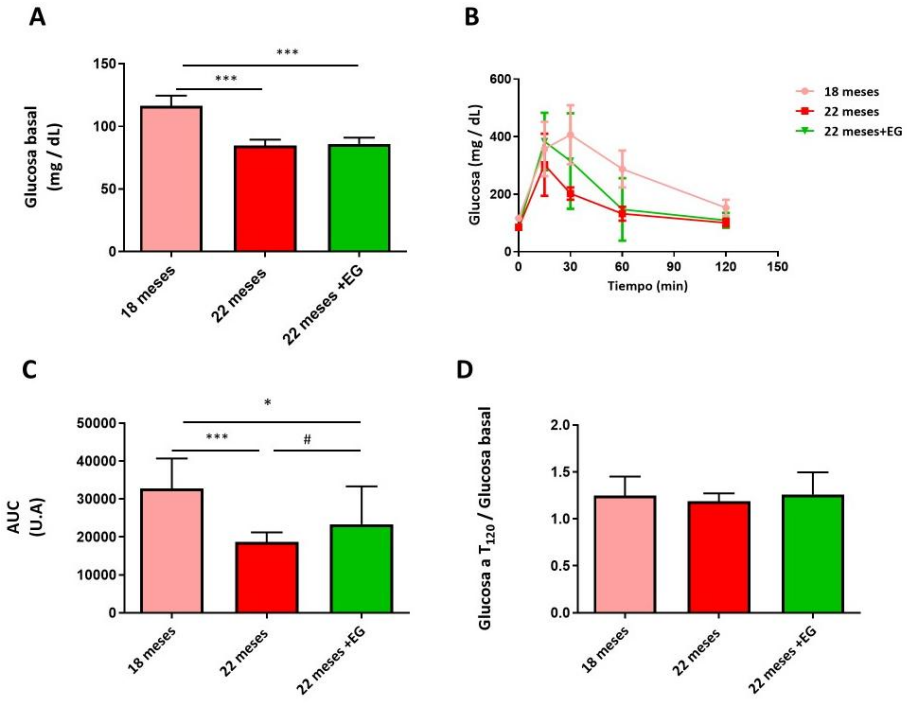


Figura 28. Prueba de tolerancia a la glucosa en modelo murino envejecido suplementado con EG. (A) Glucemia basal de ratones de 18 y 22 meses, con y sin EG. (B) Evolución temporal de la glucemia en ratones 18 meses, 22 meses con y sin suplemento de EG (C) Análisis del área bajo la curva (AUC) de glucemia (D) Ratio Gt120 /Gt0. Los resultados se expresan como media ± DE. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (comparación entre 18 meses vs grupos de 22 meses) y $^{\#}$ $p < 0,05$ (comparación entre 22 meses vs 22 meses + EG). Ratones de 18 meses (n =13), ratones de 22 meses sin suplemento (n = 4) y ratones 22 meses suplementados con EG (n = 4).

2.4. Estudios funcionales y pruebas físicas en ratones envejecidos suplementados con EG

Con el fin de estudiar el efecto de nuestro EG en la condición física de ratones envejecidos, se analizaron una serie de parámetros como la fuerza de agarre, la coordinación motora y la resistencia a la fatiga, siguiendo el protocolo experimental descrito en Material y Métodos.

Evaluación de la coordinación motora

Posteriormente, se realizó una evaluación del equilibrio y la coordinación motora mediante la prueba de Rotarod o tapiz rodante. Este dispositivo consiste en un cilindro giratorio en el que los ratones deben mantener la marcha estática mientras la velocidad aumenta de forma progresiva. Se registró el tiempo de latencia, definido como el intervalo durante el cual los animales permanecieron en movimiento antes de caer.

Los resultados mostraron que el envejecimiento afectó negativamente la coordinación motora, ya que los ratones de 22 meses de edad presentaron una reducción significativa en el tiempo de latencia en comparación con los resultados obtenidos a los 18 meses. Sin embargo, la suplementación con EG demostró un efecto protector: los ratones suplementados lograron mantener un rendimiento en el Rotarod muy similar

al observado a los 18 meses, mitigando así la pérdida de funcionalidad registrada en el grupo control (Figura 29).

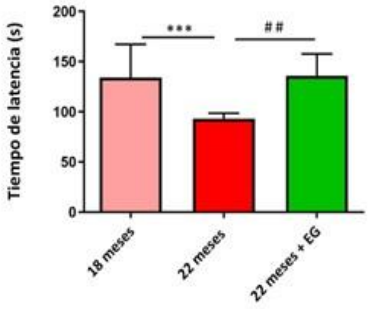


Figura 29. Efecto de la suplementación con EG sobre la coordinación motora evaluada con Rotarod en modelo murino envejecido. Los resultados se expresan como el tiempo de latencia medio ± DE (n = 8-9 por grupo). $^{\#\#}$ $p < 0{,}01$ (22 meses comparado con 22 meses + EG) y *** $p < 0{,}001$ (18 meses comparado con 22 meses).

Evaluación de la fuerza de agarre

En primer lugar, la fuerza de agarre se evaluó utilizando un dinamómetro. Tras realizar tres repeticiones con intervalos de descanso, se determinó que la fuerza de agarre no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados y que los valores de fuerza relativa eran similares entre grupos (Figura 30).

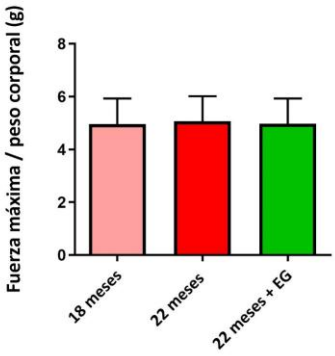


Figura 30. Efecto de la suplementación con EG sobre la fuerza de agarre en modelo murino envejecido. Los resultados se expresan como la fuerza máxima media ± DE (n = 8-9 por grupo).

Evaluación de la resistencia mediante la prueba de carrera continua con cinta

Por último, evaluamos la resistencia a la fatiga utilizando una cinta de carrera en la cual se incrementó progresivamente la velocidad hasta que los ratones alcanzaron la fatiga. Durante la prueba, se registraron la velocidad máxima alcanzada (Figura 31A) y el tiempo total en carrera hasta llegar a la extenuación (Figura 31B).

Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas ni en la velocidad máxima ni en el tiempo total en carrera antes de alcanzar la fatiga (Figura 31A y Figura 31B).

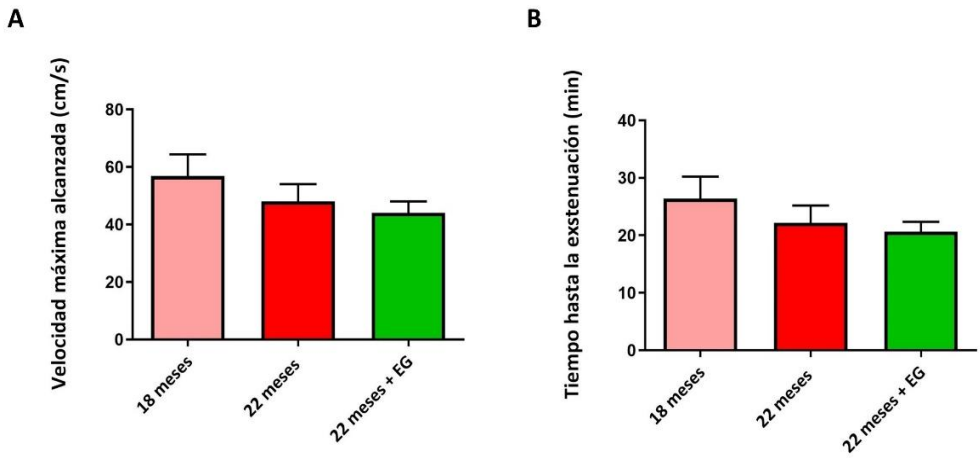


Figura 31. Efecto de la suplementación con EG sobre la resistencia a la fatiga medida con la cinta rodante en modelo murino envejecido. (A) Velocidad máxima alcanzada y (B) Tiempo empleado en alcanzar la extenuación. Los resultados se expresan como media ± DE (n = 8-9 por grupo).

Prueba de la escalera inclinada

Tras no observar efectos positivos del EG en la fuerza, pero sí en la coordinación motora, decidimos emplear una prueba funcional que integrara ambas capacidades físicas. Para ello, utilizamos una escalera inclinada en vertical, donde los ratones debían escalar cargando de forma incremental un peso proporcional a su peso corporal hasta alcanzar la fatiga.

En esta prueba, a diferencia de la anterior, el envejecimiento durante 4 meses no afectó significativamente la capacidad de los ratones para completarla, ya que los resultados obtenidos a los 22 meses fueron comparables a los registrados a los 18 meses. Sin embargo, los ratones suplementados con EG mostraron una mejora notable en su desempeño, siendo capaces de escalar con un lastre mayor que el soportado a los 18 meses (Figura 32). Además, esta mejoría fue evidente al comparar con el grupo control de la misma edad, cuyos ratones no lograron cargar tanto peso como el grupo suplementado.

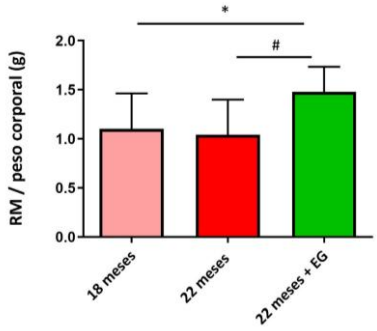


Figura 32. Efecto de la suplementación con EG sobre la fuerza y la coordinación motora evaluada con la prueba de la escalera inclinada en modelo murino envejecido. Los datos se expresan como el cociente del % máximo que son capaces de lastrar o repetición máxima (RM) relativizado a su peso corporal. Los resultados se expresan como la media ± DE (n = 8-9 por grupo). * p < 0,05 (18 meses comparado con 22 meses) y $^{\#}$ p <0,05 (22 meses comparado con 22 meses + EG).

2.5. Estudios cognitivos y de comportamiento

Estudio excavación y exploración

Para evaluar el estado cognitivo de nuestros ratones, realizamos una batería de tres pruebas de comportamiento diseñadas para ofrecer una visión general de su estado neurocognitivo y comportamental, así como su capacidad de respuesta frente al estrés.

La primera prueba consistió en actividades de excavación y enterramiento (Figuras 33A y 33B), dos tareas básicas realizadas por los roedores durante la exploración del entorno, comúnmente asociadas al bienestar físico y cognitivo. Medimos la cantidad de material (pellets) que los ratones fueron capaces de extraer del interior de un tubo, así como el porcentaje del material extraído que enterraron conscientemente en la viruta.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de material desplazado desde el interior del tubo hacia el exterior (Figura 33A) en los ratones de 22 meses (con y sin suplementación) en comparación con los valores registrados a los 18 meses. Sin embargo, al analizar el porcentaje de material enterrado, los ratones del grupo control mostraron valores similares a los obtenidos a los 18 meses. En contraste, la suplementación con EG durante 4 meses promovió una mejora significativa en esta tarea, con un aumento notable en el porcentaje de material enterrado por los ratones suplementados (Figura 33B).

La segunda prueba, diseñada para evaluar la capacidad exploratoria, fue el test de la superficie perforada (Figura 33C). En este ensayo, los ratones podían moverse libremente durante 5 minutos sobre una superficie con 16 agujeros en los que podían introducir el hocico. Existe una correlación directa entre el número de visitas a los agujeros y la capacidad exploratoria de los animales.

En nuestro estudio, el número de visitas a los agujeros fue ligeramente inferior a los 22 meses de edad en comparación con los 18 meses. Los ratones suplementados mostraron un mayor número de visitas en comparación con los ratones de la misma edad no suplementados, alcanzando valores muy similares a los registrados a los 18 meses. Estos resultados sugieren que la suplementación con EG puede mitigar los efectos del envejecimiento sobre la capacidad exploratoria en ratones envejecidos.

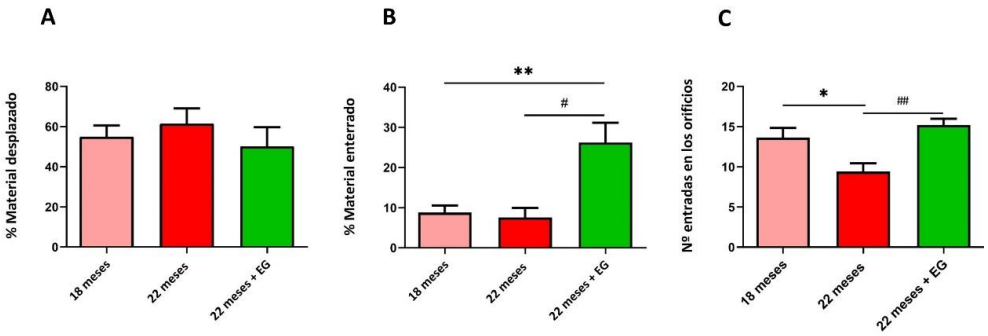


Figura 33. Efecto de la suplementación con EG en estudios del comportamiento exploratorio-excavación en modelo murino envejecido. (A) % Material desplazado en la prueba de excavación, (B) % Material enterrado respecto el desplazado en la prueba de excavación y (C) Número de visitas a los hoyos en la prueba de superficie perforada. Los resultados se expresan como media ± DE (n = 8-9 por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (18 meses comparado con 22 meses) $^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

Estudio ansiogénico

La tercera prueba cognitiva utilizada fue el test de brazos cruzados elevados, diseñado para evaluar el estado ansiogénico de los ratones y determinar si el suplemento era capaz de influir positivamente en esta respuesta. Se analizaron tanto valores absolutos (número de visitas y tiempo en los brazos) como relativos (porcentajes respecto a los valores totales).

A los 18 meses de edad, los ratones realizaron más visitas tanto a los brazos abiertos como a los cerrados (Figura 34A) en comparación con los 22 meses, donde el número de visitas se redujo a la mitad. Aunque esta reducción también se observó en el grupo suplementado, fue menos pronunciada.

El mismo patrón se registró en el número de visitas a los brazos cerrados (Tabla 10), que fueron más frecuentes a los 18 meses en comparación con los 22 meses. En este caso, no se evidenció un efecto positivo significativo tras la suplementación con EG.

En cuanto a las visitas a los brazos abiertos, solo el grupo de 22 meses de edad mostró una reducción estadísticamente significativa (Tabla 10), mientras que los ratones suplementados mantuvieron un número de visitas similar al registrado a los 18 meses (Figura 34B). En cuanto al tiempo que los ratones permanecieron en los brazos abiertos, no se observó ningún efecto significativo atribuible al envejecimiento. Sin embargo, la suplementación

con EG mostró un aumento significativo en el tiempo que los ratones permanecían en los brazos abiertos (Figura 34C, Tabla 10).

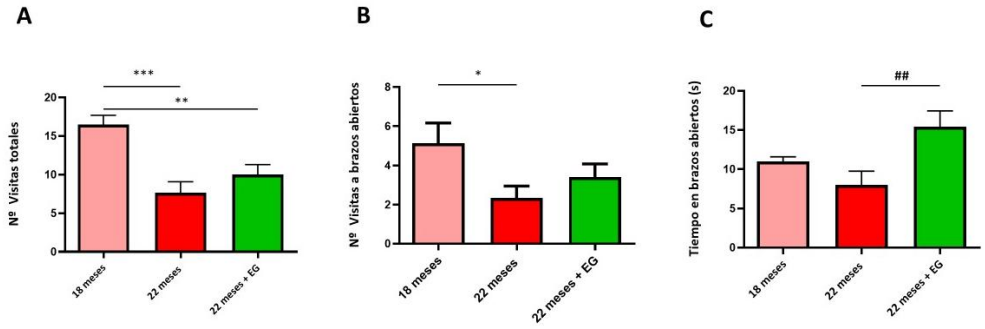


Figura 34. Efecto de la suplementación con EG en estudios del comportamiento para evaluar la ansiedad en modelo murino envejecido. (A) Número de visitas totales (B) Número de visitas a los brazos abiertos (C) Tiempo empleado por los ratones en los brazos abiertos. Los resultados se expresan como media ± SEM (n =20 ratones de 18 meses, n=10 ratones de 22 meses, n =9, ratones de 22 meses + EG). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, (18 meses comparado con 22 meses) $^{\#\#}$ $p < 0,01$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

En la Tabla 10 se resumen los parámetros de la prueba cognitiva de los brazos cruzados elevados.

Tabla 10. Parámetros estudiados en la prueba del laberinto elevado en brazos cruzados de un modelo murino envejecido suplementado con EG.

EPMT	18meses	22meses	22meses+EG
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Nº Total de entradas	17 ± 3	8 ± 3***	10 ± 3**
Nº Entradas a brazos abiertos	5 ± 2	2 ± 2*	3 ± 2
Nº Entradas a brazos cerrados	11 ± 3	5 ± 3**	7 ± 3
Porcentaje de entradas a brazos abiertos (%)	31,15 ± 12,97	31,11 ± 14,97	35,86 ± 15,93

Porcentaje de entradas a brazos cerrados (%)	68,63 ± 14,53	68,89 ± 14,97	64,14 ± 15,93
Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (%)	4,25 ± 2,37	3,39 ± 2,48	5,13 ± 2,27$^{\#\#}$
Tiempo en los brazos abiertos (s)	13 ± 2	10 ± 7	15 ± 7
Porcentaje de tiempo en zona central (%)	8,33 ± 3,45	6,33 ± 2,89	6,66± 2,42
Tiempo en zona central (s)	25 ± 10	19 ± 4	20 ± 7
Porcentaje de tiempo en los brazos cerrados (%)	87,42 ± 10,55	90,28 ± 15,23	88,21 ± 13,11
Tiempo en los brazos cerrados (s)	262 ± 26	271 ± 21	265 ± 18

*p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001 vs 18 meses y $^{\#\#}$ p < 0,01, 22 meses vs 22 + EG.

2.6. Estudio del estado oxidativo en sangre total, plasma, cerebelo y córtex cerebral de ratones envejecidos suplementados con extracto de granada

2.6.1. Determinación de la ratio GSH/GSSG en sangre total

El glutatión desempeña un papel importante en la neutralización de los radicales libres y ROS que pueden dañar las células y contribuir al envejecimiento y a la aparición de diversas enfermedades. La Figura 35 muestra el efecto de la suplementación con EG sobre los niveles de glutatión en sangre, tanto en su estado reducido (GSH) (Figura 35A) como en su estado oxidado (GSSG) (Figura 35B).

Los resultados reflejan el impacto oxidante del envejecimiento, evidenciado por un aumento en los niveles de GSSG. Sin embargo, este efecto fue revertido en los ratones suplementados, cuyos niveles de GSSG y GSH a los 22 meses fueron comparables a los de los ratones adultos jóvenes de 10 meses.

La ratio GSH / GSSG es un buen indicador del estado redox de la sangre y, su disminución es un marcador de envejecimiento de órganos y sistemas. En la Figura 35C se observa que la ratio se reduce con la edad debido al aumento de la oxidación, y que se revierte esta disminución cuando los animales son suplementados con el extracto de granada.

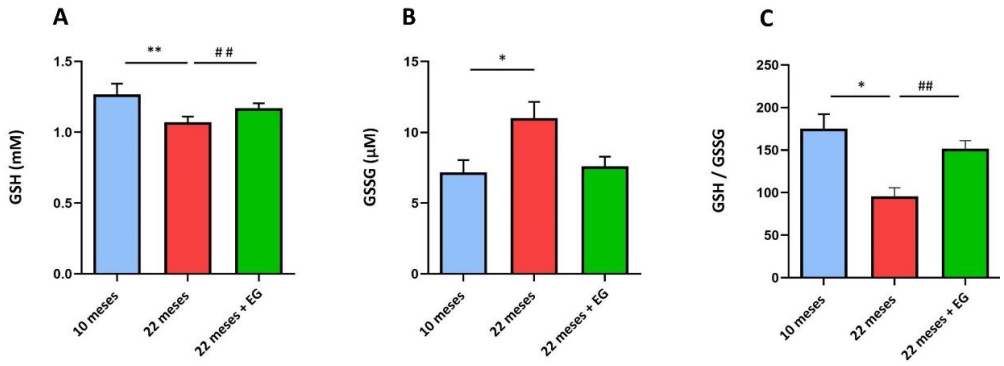


Figura 35. Efecto de la suplementación con EG sobre el estado redox del glutatión en sangre total de un modelo murino envejecido. (A) Niveles de GSH, (B) Niveles de GSSG y (C) Ratio GSH/GSSG en sangre de ratones jóvenes de 10 meses de edad y envejecidos de 22 meses de edad con y sin suplementación con EG. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 5 - 6 por grupo). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, (10 meses comparado con 22 meses) $^{\#\#}$ $p < 0,01$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

2.6.2. Determinación de la peroxidación lipídica en plasma, cerebelo y córtex cerebral

La determinación de los niveles de glutatión reducido y oxidado en sangre nos llevó a ampliar el estudio de los procesos de oxidación. Por ello, decidimos incluir la evaluación de la peroxidación lipídica en plasma, cerebelo y córtex mediante la medición de la concentración de malondialdehído (MDA) en muestras de estos tejidos al finalizar la suplementación. En primer lugar, considerando el efecto previamente observado del EG sobre el glutatión en sangre total, analizamos la peroxidación lipídica en muestras de plasma midiendo la concentración de MDA (Figura 36). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas, y se evidenció que los ratones de 22 meses de edad tenían niveles más altos de MDA que los adultos de 10 meses. Mientras que, los ratones suplementados con EG revertían este aumento en la peroxidación lipídica asociado al envejecimiento observado.

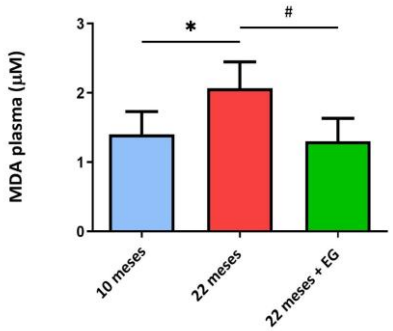


Figura 36. Efecto de la suplementación con EG sobre la peroxidación lipídica en el plasma de un modelo murino envejecido. Los niveles de MDA (µM) se midieron mediante HPLC en muestras de plasma de ratones de 10 y 22 meses de edad con y sin suplemento con EG. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 4 – 7 por grupo). * $p < 0,05$ (10 meses comparado con 22 meses) # $p < 0,05$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

Por otro lado, los niveles de MDA en el cerebelo fueron más elevados en los ratones de 22 meses no suplementados en comparación con los ratones adultos de 10 meses (Figura 37A), lo que indica un aumento de la peroxidación lipídica asociado al envejecimiento. Cabe destacar que, en los ratones suplementados con EG, este incremento se revirtió de forma significativa, alcanzándose concentraciones de MDA claramente inferiores a las observadas en los ratones de la misma edad que no recibieron suplementación. Este mismo análisis se realizó posteriormente en el córtex cerebral (Figura 37B). A diferencia de lo observado en el cerebelo, en esta región no se detectaron cambios relevantes: ni el envejecimiento ni la suplementación con EG produjeron variaciones significativas, ya que las concentraciones de MDA fueron similares entre los ratones de 10 y 22 meses, tanto en el grupo no suplementado como en el grupo suplementado.

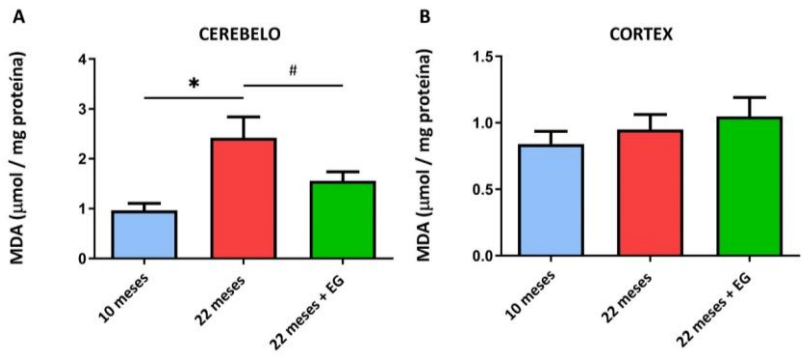


Figura 37. Efecto de la suplementación con EG sobre la peroxidación lipídica en el cerebelo y córtex cerebral de un modelo murino envejecido. Los niveles de MDA (µmol / mg de proteína) se midieron mediante HPLC en homogenados de cerebelo (A) y en homogenados de córtex cerebral (B) en ratones de 10 y 22 meses de edad con y sin suplemento con EG. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 4 – 7 por grupo). *p < 0,05, (10 meses comparado con 22 meses) # p < 0,05, (22 meses comparado con 22 meses + EG).

2.7. Estudio de la expresión génica mediante RT-PCR en el cerebelo y el córtex cerebral

2.7.1. Estudio de expresión génica de biomarcadores de envejecimiento cerebral

Los resultados muestran que el envejecimiento se asocia con un aumento generalizado de la expresión de genes relacionados con inflamación, activación glial y sistema del complemento. En concreto, los animales de 22 meses presentaron una mayor expresión de *C1qa, C4b, Ctss, Gfap y Lzp-s* respecto al grupo de 10 meses. Este incremento fue estadísticamente significativo para casi todos los genes estudiados. Tras la suplementación con EG se redujo la expresión de estos marcadores en los animales de 22 meses, con diferencias significativas frente a este grupo envejecido no suplementado. En el caso de *Ctss,* la reducción fue parcial y no alcanzó la significación estadística (Figura 38A-E).

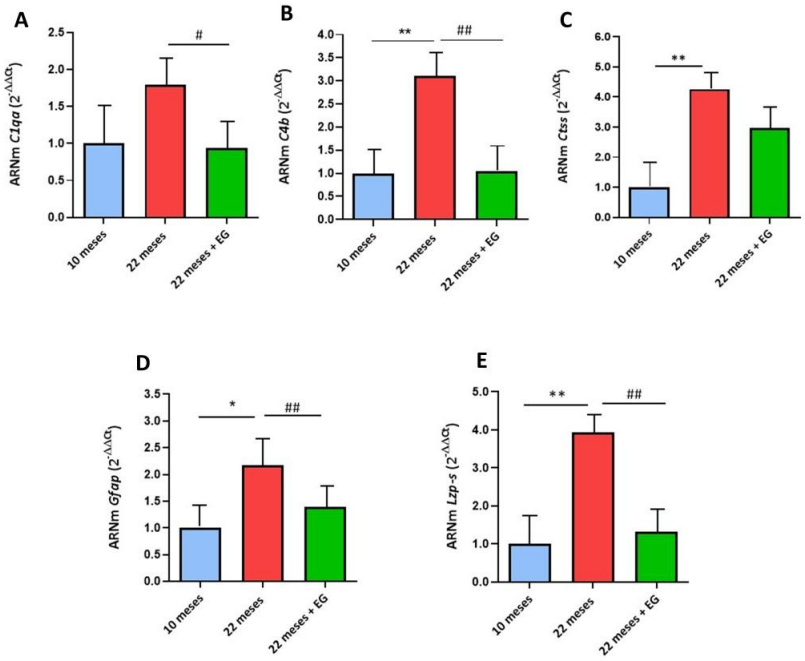


Figura 38. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de envejecimiento en el cerebelo de un modelo murino envejecido. (A*) C1qa*, (B) *C4b* (C*) Ctss,* (D) *Gfap,* (E) *Lzp*-s. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 7 - 10 por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (10 meses comparado con 22 meses) $^{\#}$ $p < 0,05$, $^{\#\#}$ $p < 0,01$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

A continuación, decidimos comparar el perfil de expresión de los mismos genes a nivel de la corteza cerebral (Figura 39). Los resultados mostraron que el efecto del envejecimiento se manifestó en una sobreexpresión generalizada significativa de todos los marcadores en los ratones de 22 meses no suplementados en comparación con los niveles detectados en ratones de 10 meses. No obstante, en este tejido, la suplementación con EG no logró revertir la sobreexpresión de estos genes. Los ratones de 22 meses suplementados mostraron niveles de expresión

similares a los observados en los ratones de su misma edad no suplementados (Figura 39A-E).

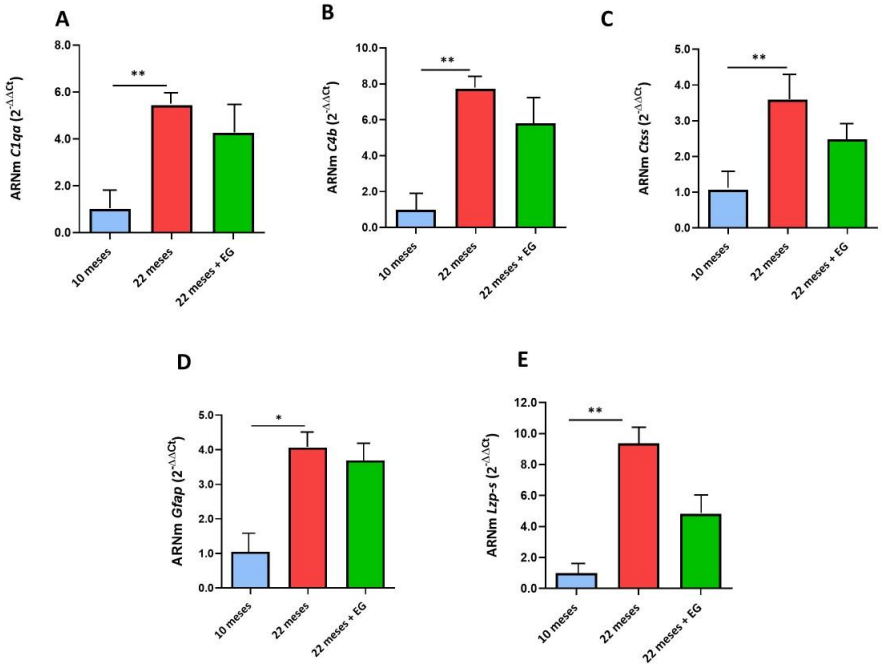


Figura 39. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de envejecimiento en el córtex cerebral de un modelo murino envejecido. (A*) C1qa*, (B) *C4b* (C*) Ctss,* (D) *Gfap,* (E) *Lzp*-s. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 7 - 10 por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (10 meses comparado con 22 meses).

2.7.2. Estudio del gen *B2M* involucrado en el deterioro cognitivo

Teniendo en cuenta la asociación entre los niveles sistémicos de *B2m* y el deterioro cognitivo y habiendo identificado la *B2m* como un posible factor proenvejecimiento asociado con una disminución de la neurogénesis, planteamos la hipótesis de que la expresión del gen *B2m* podría estar afectada en cerebelo y córtex cerebral de nuestros ratones, los cuales, tienen defectos en la coordinación motora y en el comportamiento.

Tras el análisis de la expresión génica, los resultados obtenidos siguen la misma tendencia descrita para los genes asociados al envejecimiento (apartado 2.7.1). En particular, se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión del gen *B2m* en el grupo suplementado con EG en comparación con el grupo envejecido no suplementado (Figura 40A).

No obstante, tal como se muestra en la Figura 40B, la suplementación con EG no produjo una reducción significativa de la expresión de *B2m* en el córtex cerebral, región en la que este gen se encuentra sobreexpresado en los ratones envejecidos no suplementados. Por tanto, el posible efecto protector atribuido a la modulación de *B2m* por el EG parece ser específico del cerebelo.

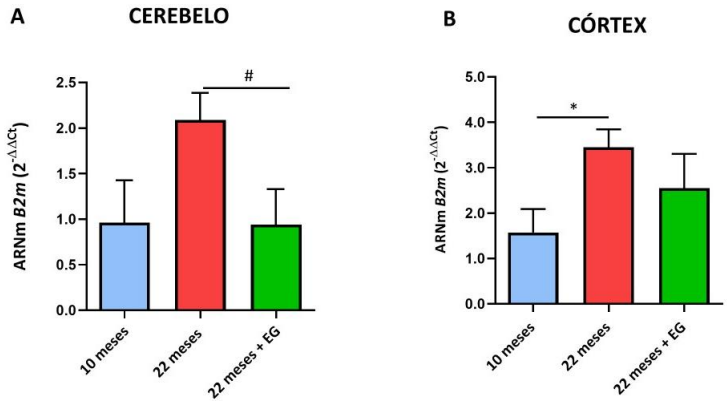


Figura 40. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de *B2m* en cerebelo y córtex cerebral de un modelo murino envejecido. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 5 - 6 por grupo). * $p < 0,05$ (10 meses comparado con 22 meses), # $p < 0,05$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

2.7.3. Estudio de expresión génica sobre marcadores de apoptosis

Tras el estudio de expresión génica con genes relevantes en el envejecimiento, realizamos un análisis de relaciones entre dichos biomarcadores con procesos biológicos asociados. Los diferentes genes convergían en distintos procesos fisiológicos relacionados con la cognición (memoria, aprendizaje, neurotransmisión, trasmisión sináptica del glutamato, plasticidad sináptica, neurogénesis y homeostasis de células gliales) así como en procesos celulares como el estrés oxidativo, la inflamación, daño celular, citotoxicidad, senescencia y muerte celular, respiración mitocondrial, activación del complemento y regulación del citocromo c mitocondrial.

Sin embargo, todos los genes se asociaron con un solo proceso celular, la muerte celular programada o apoptosis (Figura 41).

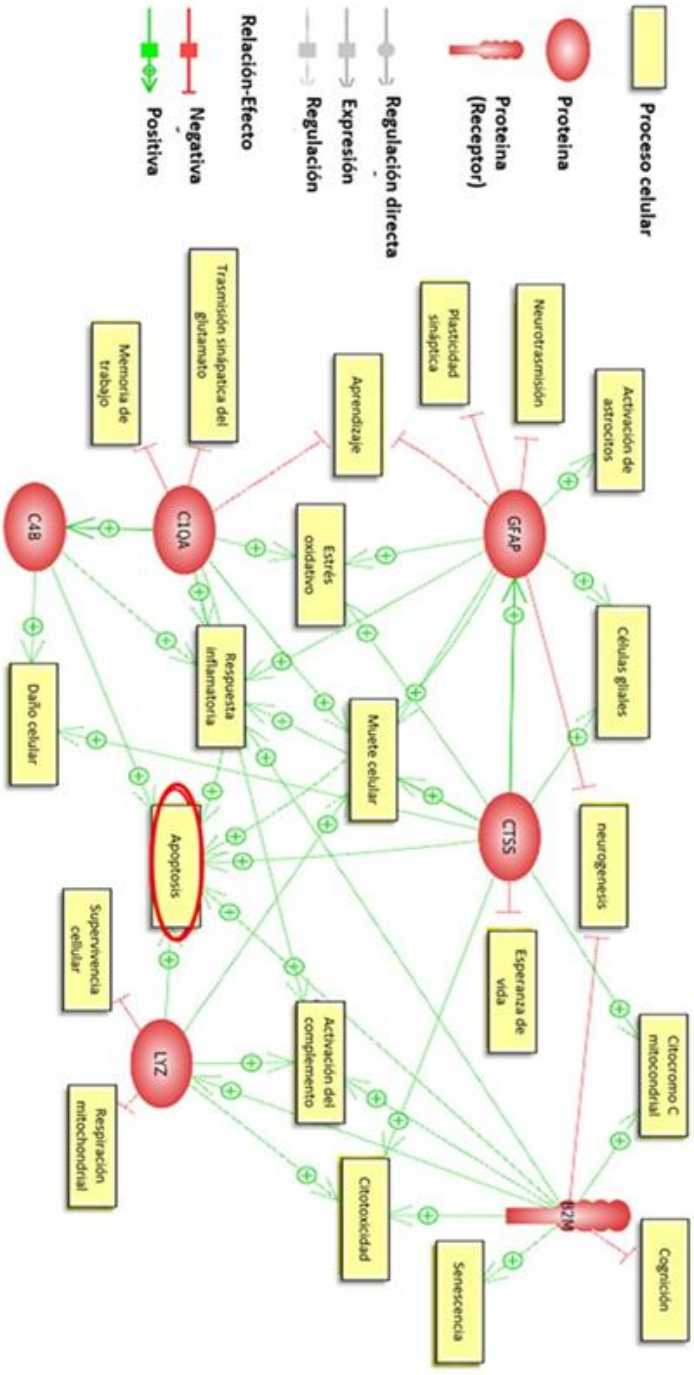

Proceso celular
Proteina
Proteina (Receptor)
Regulación directa
Expresión Regulación
Relación-Efecto
Negativa
Positiva
Trasmisión sinápatica del glutamato
Memoria de trabajo
Plasticidad sinaptica
Neurotrasmisión
Activación de astrocitos
Aprendizaje
C4B
C1QA
GFAP
Estrés oxidativo
Células gliales
Respuesta inflamatoria
Daño celular
Muerte celular
Apoptosis
CTSS
neurogenesis
Esperanza de vida
Supervivencia celular
LYZ
Activación del complemento
Citocromo C mitocondrial
Respiración mitochondrial
Citotoxicidad
B2M
Senescencia
Cognición

Figura 41. Conexiones entre los procesos celulares y biomarcadores de envejecimiento y deterioro cognitivo. La línea continua significa expresión y la línea discontinua significa regulación. Las relaciones están coloreadas por el efecto. El rojo expresa un efecto supresor sobre el proceso celular y el verde indica que el proceso es promovido por dicho gen.

Para profundizar en la vía de la apoptosis decidimos, en primer lugar, determinar los niveles de expresión de algunos de sus genes representativos de esta cascada de señalización como *Casp 3, Casp8 y Casp9*. Como muestra la Figura 42, encontramos una mayor expresión génica de *Casp3, Casp8* y *Casp9* en los ratones de 22 meses que no recibieron el suplemento, respecto a ratones de 10 meses en cerebelo (Figura 42A-C).

A su vez, los ratones que recibieron el EG presentaron niveles de expresión génica menores en todos los marcadores de la apoptosis comparado con los ratones del grupo de 22 meses no suplementado, siendo la suplementación con EG, capaz de mitigar la apoptosis ligada al envejecimiento y revertir, de forma significativa en las tres caspasas estudiadas.

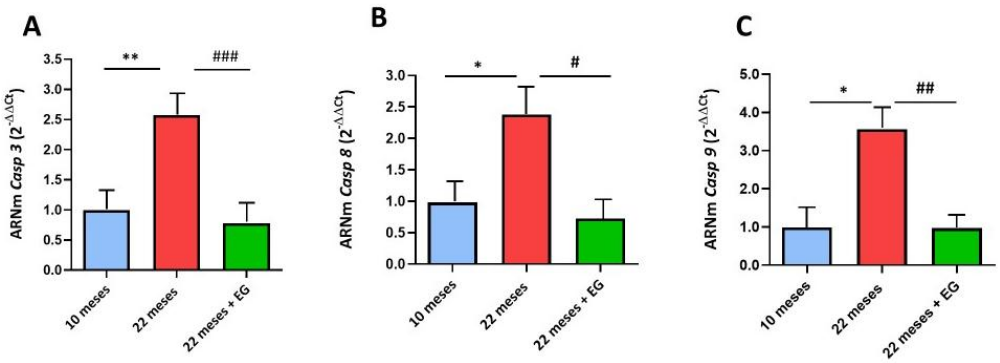


Figura 42. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de apoptosis en el cerebelo de un modelo murino envejecido. (A) *Casp3*, (B) *Casp8* y (C) *Casp9*. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 6 – 8 por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (10 meses comparado con 22 meses) $^{\#}$ $p < 0,05$, $^{\#\#}$ $p < 0,01$, $^{\#\#\#}$ $p < 0,001$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

A continuación, realizamos las mismas determinaciones en el córtex cerebral (Figura 43A-C), y sorprendentemente, las caspasas mediadoras de la apoptosis no se vieron sobrexpresadas en los ratones de 22 meses comparadas con los de 10 meses. El EG tampoco tuvo efecto en la expresión génica de estas caspasas en ningún grupo experimental.

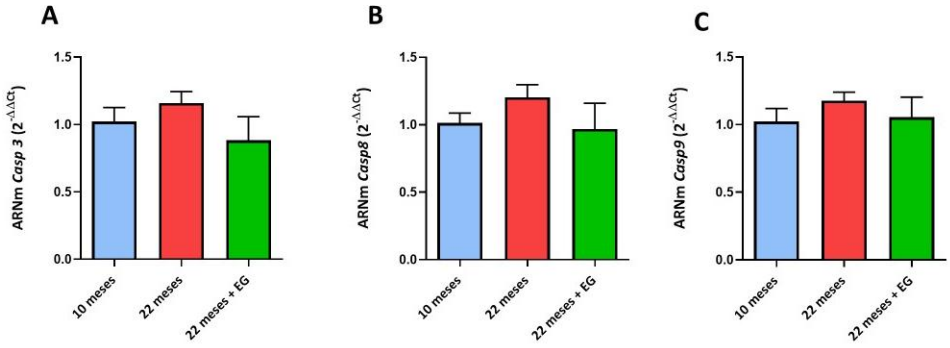


Figura 43. Efecto de la suplementación con EG sobre la expresión génica de biomarcadores de apoptosis en el córtex cerebral de un modelo murino envejecido. (A) *Casp3*, (B) *Casp8* y (C) *Casp9*. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 6 – 8 por grupo).

2.8. Estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante citometría de flujo

2.8.1. Estudio de niveles basales de ROS citoplasmáticas y mitocondriales en sangre periférica

Seguidamente se realizó una caracterización del estado redox de las células leucocitarias. Para alcanzar dicho objetivo se estudió la presencia de ROS, tales como peróxidos intracelulares, el radical hidroxilo, el anión peroxinitrito y el superóxido en leucocitos tanto a nivel citoplasmático como

mitocondrial, empleando los fluorocromos DCF, DHR 123 y MitoPY en sangre.

En primer lugar, los resultados mostraron, en el caso de la presencia de peróxidos intracelulares a través de DCF, una disminución en la intensidad de fluorescencia de los leucocitos de los ratones suplementados respecto a los ratones envejecidos no suplementados (Figura 44A). Este mismo efecto se observó para linfocitos y monocitos, y neutrófilos (Figura 44B-C).

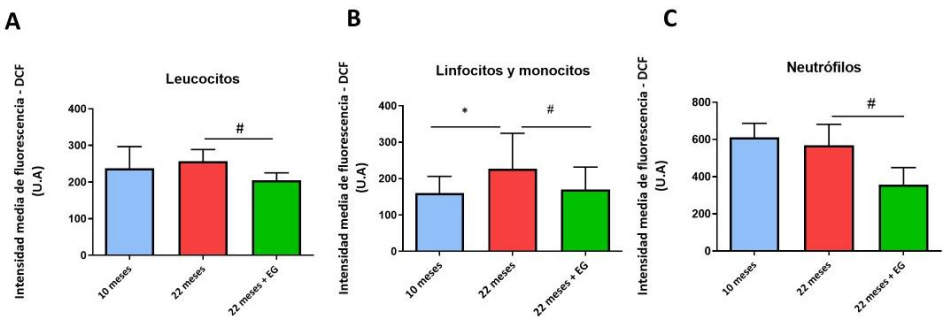


Figura 44. Niveles intracelulares de peróxidos marcados con DCF en sangre total en modelo murino envejecido. Cuantificación de los niveles de peróxido de hidrogeno de leucocitos (A), linfocitos y monocitos (B), y neutrófilos (C) en ratones de 10 meses y de 22 meses con y sin suplemento de EG. Los resultados se expresan como media ± SD N=3-4 por grupo. * $p < 0,05$ (10 meses comparado con 22 meses) $^{\#}$ $p < 0,05$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

En cuanto a la fluorescencia del marcador DHR123 específico del radical hidroxilo y el anión peroxinitrito, no se observaron cambios en los leucocitos en su conjunto (Figura 45A). Sin embargo, en linfocitos, monocitos y neutrófilos se detectó más fluorescencia en las células de los ratones envejecidos de 22 meses sin suplementar mientras que el EG logró reducir

los niveles a valores muy similares a los detectados en la sangre de los ratones de 10 meses (Figura 45B -C).

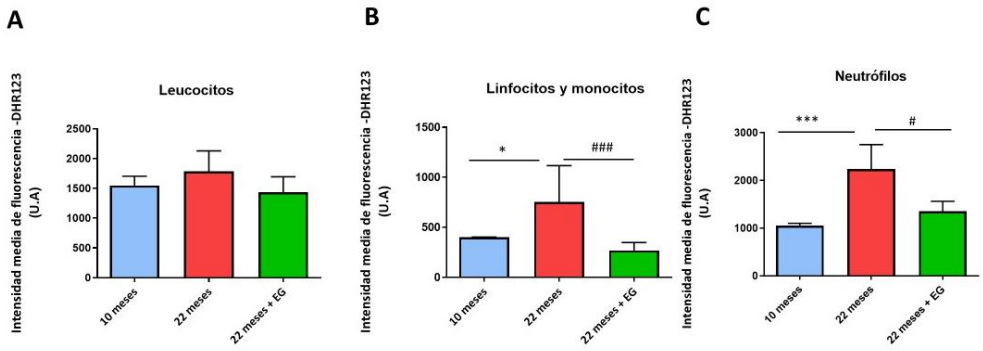


Figura 45. Niveles intracelulares de radical hidroxilo y el anión peroxinitrito marcados con DHR123 en sangre total en modelo murino envejecido. Cuantificación de los niveles de radical hidroxilo y el anión peroxinitrito de leucocitos (A), linfocitos y monocitos (B) y neutrófilos (C) en ratones de 10 meses y de 22 meses con y sin suplemento de EG. Los resultados se expresan como media ± SD N=3-4 por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (10 meses comparado con 22 meses) $^{\#}$ $p < 0,05$ $^{\#\#\#}$ $p < 0,001$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

Por último, la intensidad media de fluorescencia de MitoPY fue mayor en el grupo de 22 meses respecto al grupo de 10 meses en las tres poblaciones celulares analizadas (Figura 46A-C). Solamente, en neutrófilos, la suplementación con EG redujo significativamente estos valores (Figura 46C).

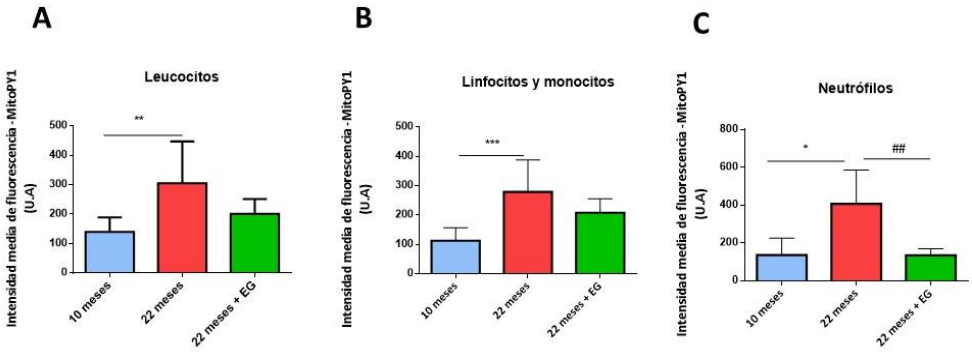


Figura 46. Niveles de superóxidos mitocondriales marcados con MitoPY en sangre total en modelo murino envejecido. Cuantificación de los niveles de superóxidos mitocondriales de leucocitos (A), linfocitos y monocitos (B) y neutrófilos (C) en ratones de 10 meses y de 22 meses con y sin suplemento de EG. Los resultados se expresan como media ± SD N=3-4 por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (10 meses comparado con 22 meses) $^{\#\#}$ $p < 0.01$ (22 meses comparado con 22 meses + EG).

2.8.2. Estudio de niveles inducidos de ROS citoplasmáticos y mitocondriales en sangre periférica tratada con un agente prooxidante

En otro estudio, provocamos un estrés o daño oxidativo mediante el empleo de un agente prooxidante, el tBHP, que se añadió a muestras de sangre total de nuestros ratones con el fin de medir o estudiar la respuesta a dicho estrés por parte de las células leucocitarias desde el punto de vista de síntesis de ROS. De esta forma pudimos realizar una aproximación al estudio de la capacidad de resiliencia y la susceptibilidad de estas células frente a un daño inducido.

En nuestros resultados, observamos un papel protector del EG, como muestra la Figura 47. En los tres tipos celulares se observaron diferencias

significativas entre los grupos experimentales estudiados (Figura 47A-C). El grupo tratado con tBHP (50 µM) presentó un incremento significativo de la fluorescencia respecto al grupo control de 22 meses, mientras que el grupo suplementado con EG + tBHP (50 µM) mostró valores significativamente menores en comparación con el grupo no suplementado pero con daño oxidativo (Figura 47A-C).

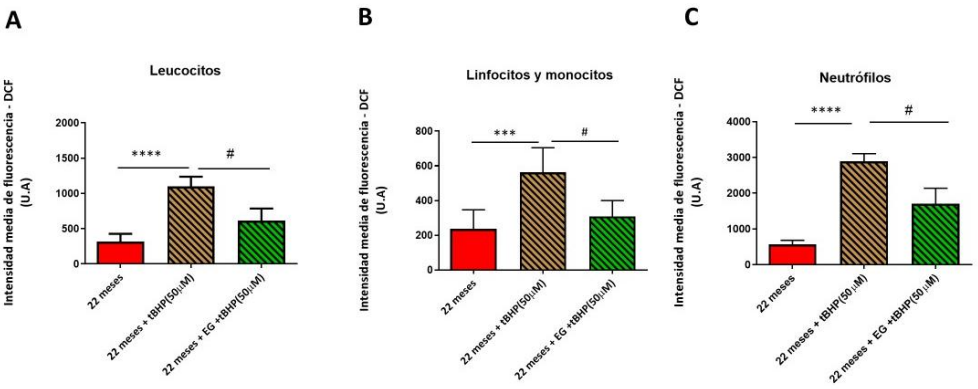


Figura 47. Niveles intracelulares de peróxidos marcados con DCF en sangre total tratada con tBHP (50 µM) en modelo murino envejecido. Cuantificación de los niveles de peróxido de hidrogeno de leucocitos (A), linfocitos y monocitos (B), y neutrófilos (C) en ratones de 10 meses y de 22 meses con y sin suplemento de EG. Los resultados se expresan como media ± SD N=3-4 por grupo. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (22 meses comparado con 22 meses+ tBHP 50 µM) y $^{\#}$ $p < 0,05$ (22 meses + tBHP 50 µM comparado con 22 meses + EG + tBHP 50 µM).

Por otro lado, realizamos el mismo experimento con el fluorocromo DHR123 y los resultados mostraron que la intensidad de fluorescencia aumentó significativamente tras el tratamiento con tBHP en todas las

poblaciones leucocitarias, pero no se observó ninguna protección con el EG (Figura 48A-C).

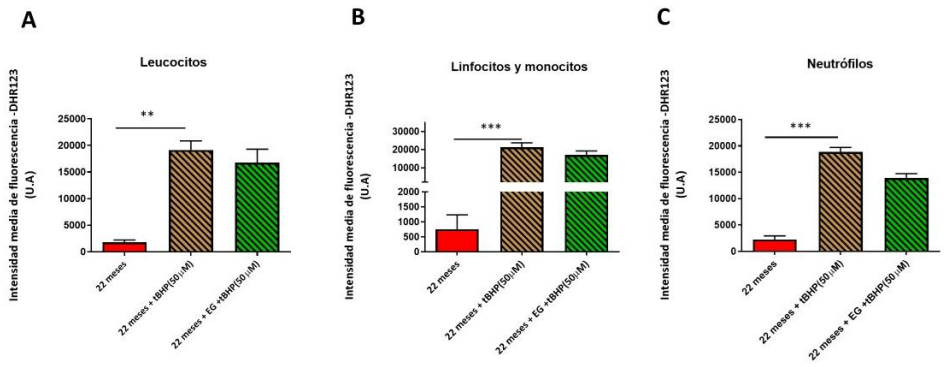


Figura 48. Niveles intracelulares de radical hidroxilo y el anión peroxinitrito marcados con DHR123 en sangre total tratada con tBHP (50 µM) en modelo murino envejecido. Cuantificación de los niveles de radical hidroxilo y el anión peroxinitrito de leucocitos (A), linfocitos y monocitos (B), y neutrófilos (C) en ratones de 10 meses y de 22 meses con y sin suplemento de EG. Los resultados se expresan como media ± SD N=3-4 por grupo. ** $p <$ 0,01, *** $p <$ 0,001 (22 meses comparado con 22 meses+ tBHP 50 µM).

En cuanto al estado oxidativo mitocondrial de leucocitos, linfocitos y monocitos (Figura 49A y B), el EG no ejerció el papel protector observado al no haber diferencias significativas respecto a la fluorescencia del MitoPY entre la sangre de los ratones suplementados y no suplementados de 22 meses. Sin embargo, se observó que el EG ejercía un papel protector en los neutrófilos, ya que éstos presentaron menor cantidad de ROS si provenían de la sangre de los ratones suplementados, siendo más resilientes al daño oxidativo inducido (Figura 49C).

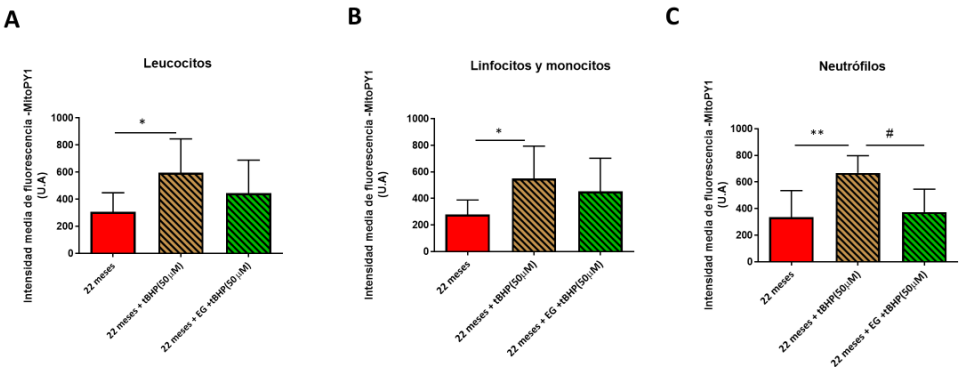


Figura 49. Niveles de superóxidos mitocondriales marcados con MitoPY en sangre total tratada con tBHP (50 µM) en modelo murino envejecido. Cuantificación de los niveles de superóxidos mitocondriales de leucocitos (A), linfocitos y monocitos (B), y neutrófilos (C) en ratones de 10 meses y de 22 meses con y sin suplemento de EG. Los resultados se expresan como media ± SD N=3-4 por grupo. $^{*}p < 0,05$ $^{**}p < 0,01$ (22 meses comparado con 22 meses+ tBHP 50 µM) y $^{\#}p < 0,05$ (22 meses + tBHP 50 µM comparado con 22 meses + EG + tBHP 50 µM).

2.9. Estudio histológico del cerebelo

A medida que un organismo envejece, sus tejidos sufren varios cambios estructurales que son negativos para la función normal del tejido, como la pérdida de capacidad regenerativa o la fibrosis. Para estudiar estos cambios en los animales suplementados con EG, realizamos un estudio histológico en el cerebelo mediante la tinción de hematoxilina/eosina con muestras de cerebelo obtenidas 4 meses después del inicio de la suplementación con EG, y añadiendo un grupo adulto de 10 meses como control.

Principalmente, nos centramos en estudiar aquellas regiones donde se han descrito los cambios más importantes durante el envejecimiento cerebral, implicando la determinación de la densidad celular (células / área

de tejido) en la capa glomerular y molecular, además del diámetro de las mismas. También profundizamos en el estudio de las células de Purkinje mediante su cuantificación, y la determinación de su área y perímetro celular, así como la localización de células de Purkinje heterotípicas. Por último, se identificó la presencia de vacuolas en las distintas capas (Figura 50).

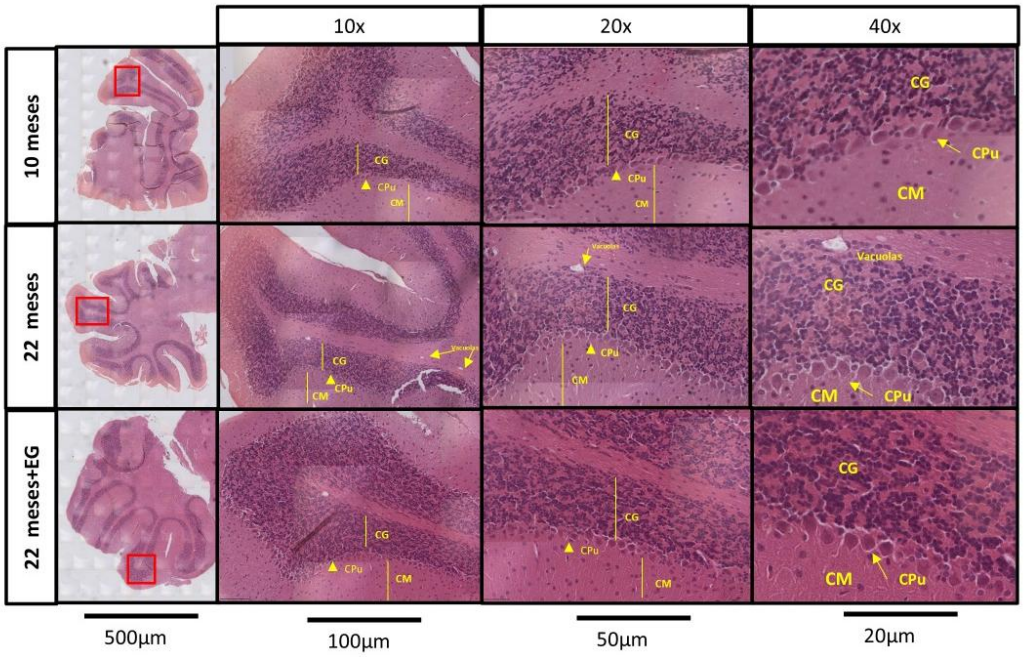


Figura 50. Imagen representativa de cortes histológicos de los cerebelos estudiados en modelo murino envejecido. Se obtuvieron cortes de cerebelos n=3 por cada grupo. CG=Capa granular, CM=Capa Molecular, CPu=Células de Purkinje.

En la capa granular, ambos grupos envejecidos (ratones 22 meses con y sin EG) mostraron un aumento significativo de la densidad celular en comparación con los ratones adultos de 10 meses (Figura 51A). Este cambio sugiere alteraciones estructurales asociadas al envejecimiento. Este mayor

número de células estuvo acompañado de diferencias significativas en el grosor de esta capa en los ratones envejecidos no suplementados. Sin embargo, dicho efecto fue parcialmente revertido tras el tratamiento con EG cuyo grosor es similar a los ratones adultos (Figura 51B).

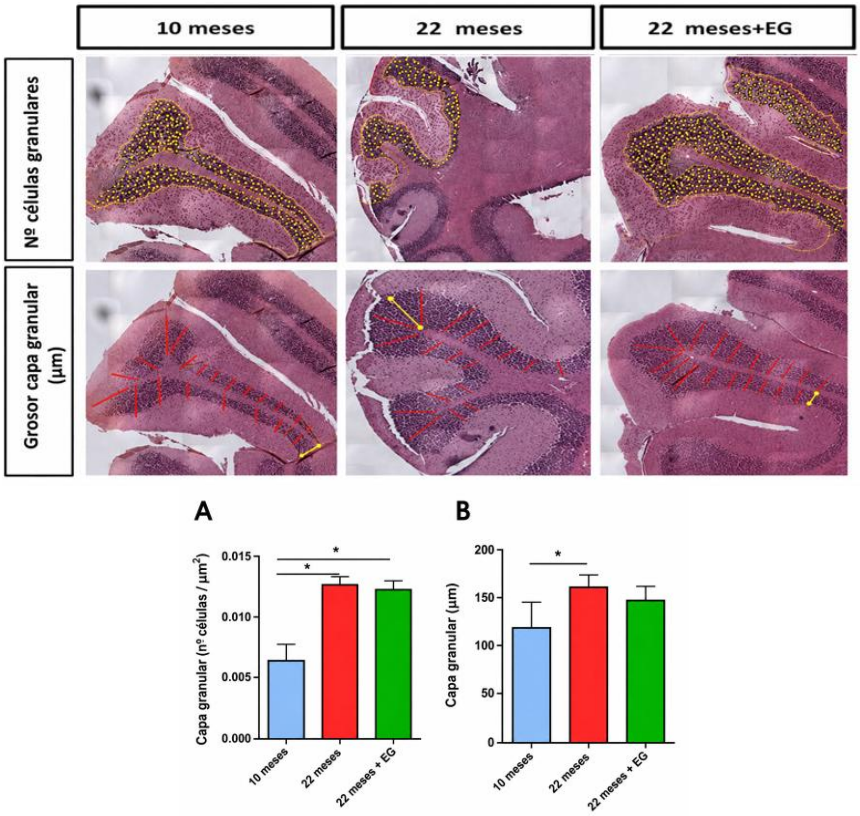


Figura 51. Estudio de la capa granular del cerebelo en modelo murino envejecido suplementado con EG. (A) la densidad celular como Nº de células / Área de cuantificación (nº cel / µm^2) y (B) grosor de la capa granular (µm) mediante sistema automático con el software QuPath predefiniendo los parámetros celulares y trazando segmentos representativos en los cortes histológicos teñido con hematoxilina-eosina. Las imágenes a 10x y tamaño muestral para los ratones de 10 meses n=4, 22 meses n=3 y 22 meses + EG n=3. * $p < 0,05$ vs 10 meses.

En la capa molecular, los cambios asociados al envejecimiento fueron más evidentes. Los ratones envejecidos mostraron un aumento de la

densidad celular (Figura 52A) y una tendencia no significativa hacia una reducción del grosor de esta capa en comparación con los ratones adultos (Figura 52B). Estos cambios histológicos sugieren alteraciones degenerativas. Por el contrario, los ratones envejecidos suplementados con EG presentaron una morfología más conservada, tanto en la densidad celular como en el grosor de la capa molecular, los cuales mostraron valores intermedios respecto a los grupos adulto y envejecido no suplementado (Figura 52A y52 B).

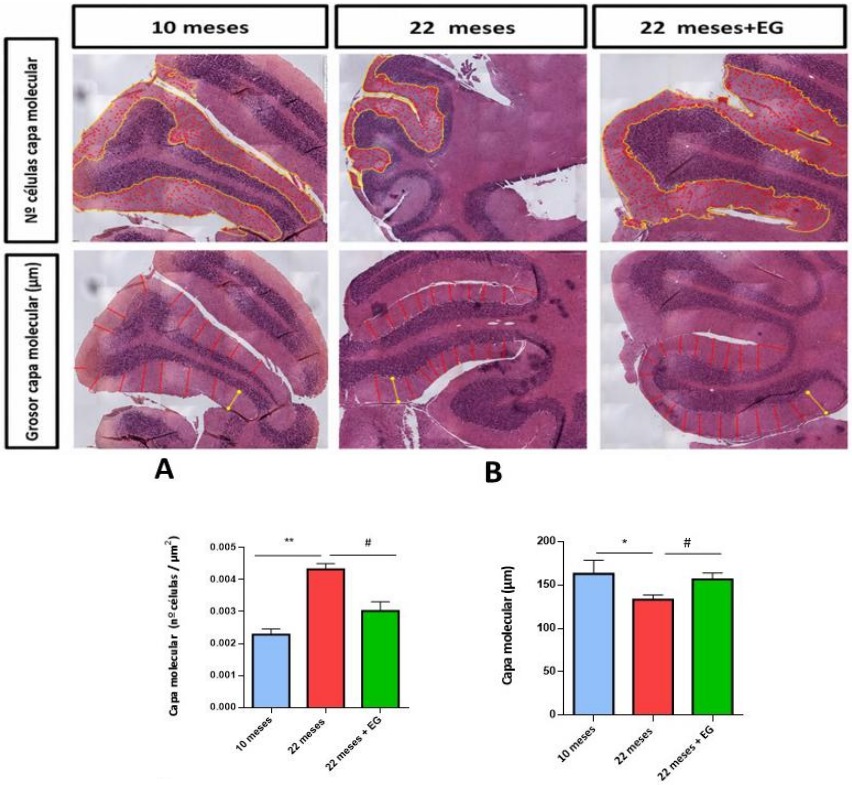


Figura 52. Estudio de la capa molecular del cerebelo en modelo murino envejecido suplementado con EG. (A) la densidad celular como Nº de células / Área de cuantificación (nº cel / µm^2) y (B) grosor de la capa granular (µm) mediante sistema automático con el software QuPath predefiniendo los parámetros celulares y trazando segmentos representativos en los cortes histológicos teñido con hematoxilina-eosina. Las imágenes a 10x y tamaño muestral para los ratones de n=4, 22 meses n=3 y 22 meses + EG n=3* $p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ vs 10 meses $^{\#}$ $p < 0,05$ 22 meses vs 22 meses+ EG.

Para profundizar en la preservación estructural, se analizaron las células de Purkinje. La suplementación con EG evitó el incremento del área celular típicamente observado durante el envejecimiento (Figura 53B). El área media de las células de Purkinje en los ratones envejecidos tratados con EG fue comparable a la observada en los controles adultos. Por el contrario, los ratones envejecidos no suplementados mostraron una hipertrofia celular significativa (Figura 53B).

De manera similar, los ratones tratados con EG mantuvieron una mayor densidad de células de Purkinje en comparación con los controles envejecidos, los cuales presentaron una marcada pérdida celular (Figura 53C). Asimismo, aunque se observó una tendencia al aumento del perímetro celular con la edad, las diferencias entre grupos no alcanzaron significación estadística (Figura 53A).

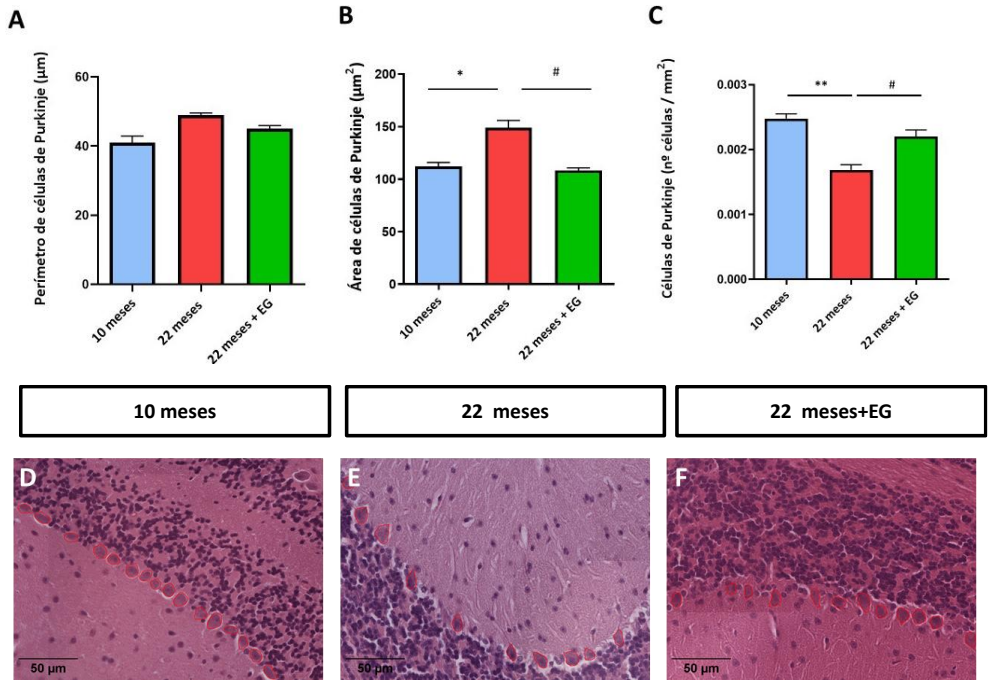


Figura 53. Estudio de las células de Purkinje en modelo murino envejecido suplementado con EG. Imágenes representativas de los tres grupos experimentales (40x) (D-F) donde se determinó, (A) el perímetro (B) el área y (C) densidad celular. Tamaño muestral para los ratones de 10 meses n=4, 22 meses n=3 y 22 meses + EG n=3. $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ vs 10 meses $^{\#}$ $p < 0,05$ 22 meses vs 22 meses+ EG.

Los cambios histológicos asociados al envejecimiento en las células de Purkinje, como la disminución en el número celular y las alteraciones en la morfología, fueron visibles microscópicamente. En los ratones tratados con EG se observó una reversión parcial de estas alteraciones (Figura 53D-F).

En conjunto, el envejecimiento se asoció con alteraciones en el área celular y una menor densidad celular de las células de Purkinje, mientras que la suplementación con EG preservó estos parámetros.

En la Figura 54 se observan diferencias morfológicas en la organización de la capa de Purkinje entre los distintos grupos experimentales. El panel A, correspondiente al grupo adulto de 10 meses, muestra una capa de Purkinje relativamente homogénea, con células alineadas de forma continua en la interfase entre la capa molecular y la capa granular, y con escasa presencia de células de Purkinje heterotópicas (CPHs).

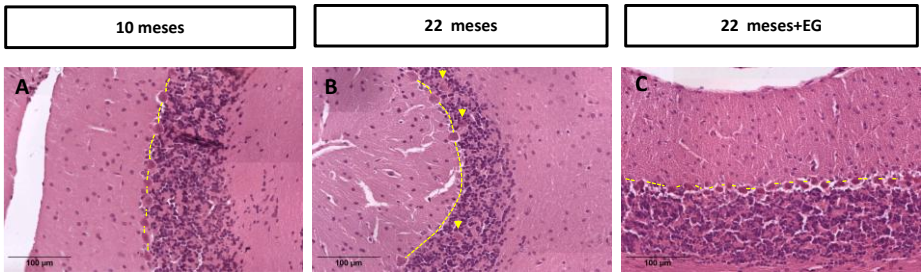


Figura 54. Presencia de CPH en los cerebelos del modelo murino envejecido suplementado con EG. Micrografías representativas que muestran la integridad de la capa de células de

Purkinje (línea discontinua amarilla) en ratones adultos (A), envejecidos (B) y envejecidos tratados con EG (C). Se observan células de Purkinje heterotópicas con una posición anormal dentro de la capa granular en el cerebelo del ratón envejecido (B, flechas amarillas). Barra de escala: 100 µm. Las imágenes corresponden a ratones de 10 meses n=4, 22 meses n=3 y 22 meses + EG n=3.

En contraste, en la Figura 54B, los animales envejecidos sin suplementación, se observó una mayor presencia de CPHs fuera de su localización habitual, junto con una pérdida de continuidad y organización de la capa de Purkinje. Además, las células remanentes presentan una morfología irregular, aspecto retraído, citoplasma intensamente teñido y se encuentran rodeadas por un neuropilo vacuolado. Por su parte, en la Figura 54C, correspondiente a los animales envejecidos suplementados, mostró una conservación parcial de la organización observada en el grupo adulto, con una menor presencia de CPHs en las capas adyacentes y una mayor continuidad de la capa de células de Purkinje respecto al grupo envejecido sin suplementación.

Por último, se cuantificó el número de vacuolas presentes en los cortes de cerebelo seleccionados, dado que su aparición tanto en las capas granular y molecular como entre las células de Purkinje constituye un indicador de disfunción y envejecimiento del tejido (Figura 55).

En los cerebelos de los ratones envejecidos de 22 meses del grupo no suplementado se observó la presencia de vacuolas aisladas, así como vacuolas intercaladas entre las células de Purkinje (Figura 55A y 55C). Este número fue menor en los ratones suplementados de la misma edad (Figura 55A y 55D) y prácticamente inexistente en los cerebelos de los ratones adultos de 10 meses (Figura 55A y 55B).

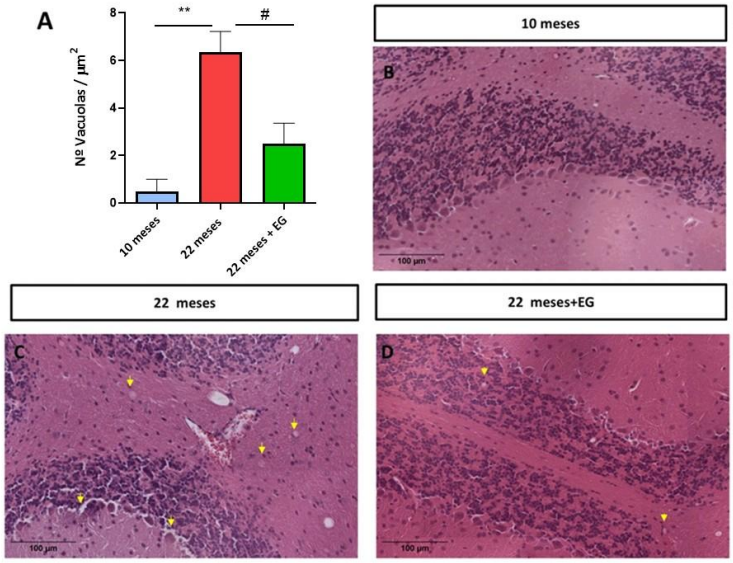


Figura 55. Presencia de vacuolas en el cerebelo del modelo murino envejecido suplementado con EG. Cuantificación de vacuolas (A), y micrografías representativas de secciones cerebelosas teñidas con hematoxilina y eosina (B-D). Escala: 100 µm. Las imágenes corresponden a ratones de 10 meses n=4, 22 meses n=3 y 22 meses + EG n=3.

DISCUSIÓN

1. La suplementación con EG prolonga la vida y promueve la vitalidad en el modelo *C. elegans*

El nematodo *C. elegans* constituye uno de los modelos experimentales más relevantes en biología del envejecimiento, genética, neurociencia, nutrición y biología celular. Su utilización sistemática ha generado un corpus de más de 39. 000 publicaciones en la base PubMed hasta 2026, desde los primeros trabajos de Victor Nigon y Ellsworth C. Dougherty en 1949, que documentaron los patrones reproductivos de este *Rhabditidae* en laboratorios de París y California (Nigon & Dougherty, 1950). Dichos patrones, junto con otras características, como su pequeño tamaño (~1 mm de longitud en el adulto hermafrodita), ciclo vital breve (2-3 semanas) y generación aproximada de 3 días, lo convierten en un organismo idóneo para experimentación de alto rendimiento (alta productividad de datos) y para la investigación de procesos celulares y moleculares en envejecimiento y nutrición.

En la presente tesis doctoral, se ha decidido emplear *C. elegans* para evaluar la suplementación de un extracto estandarizado de granada comercializado como POMANOX P30® (Euromed S.A, Barcelona) administrado en concentraciones crecientes que oscilan entre 0,005 y 10 mg/mL. Esta elección se fundamenta por: (i) la simplicidad del modelo facilita la manipulación, cuantificación y repetición de ensayos; (ii) permite el estudio integrado de vida, motilidad (vitalidad) y mecanismos moleculares de envejecimiento; (iii) la evidencia previa sugiere que los polifenoles de la

granada presentan actividad biológica favorable sobre la longevidad y la homeostasis celular.

Nuestro EG contiene elevados niveles de polifenoles, especialmente punicalaginas, antocianinas y ácido elágico, que ejercen función antioxidante. Dados los conocimientos actuales sobre el envejecimiento celular, el estrés oxidativo representa uno de los mecanismos primarios implicados en el deterioro celular y la pérdida de funcionalidad biológica. En *C. elegans*, se ha demostrado que la ingestión de granada reduce la acumulación intracelular de ROS, incrementando la resistencia frente al daño oxidativo y prolongando la vida media del organismo (Ryu et al., 2016; Serna et al., 2024; J. Zheng et al., 2017).

Nuestros resultados destacan que la suplementación con EG no solo prolonga la longevidad, sino que también mejora la vitalidad del nematodo, evaluada mediante ensayos de motilidad. No obstante, es relevante recalcar que la dosis empleada es un factor crítico. En nuestro modelo, concentraciones elevadas de EG (1, 5 y 10 mg/mL) indujeron efectos tóxicos, reduciendo tanto la esperanza de vida como la motilidad, lo cual coincide con el fenómeno de hormesis descrito para numerosos compuestos bioactivos (Patel et al., 2008).

En particular, la dosis de 0,05 mg/mL incrementó de forma significativa la vida media y máxima, así como la vitalidad (motilidad), mientras que concentraciones intermedias (0,1–0,5 mg/mL) prolongaron la vida sin mejoras apreciables en la motilidad.

En cuanto a los mecanismos moleculares subyacentes que podrían estar implicados en dicho efecto, se consideran múltiples vías de señalización. En primer lugar, la vía de señalización de la insulina/IGF-1 desempeña un papel en la regulación del envejecimiento en *C. elegans*. La reducción de la actividad de esta vía favorece la entrada nuclear de la proteína de caja Forkhead (DAF-16), activando genes de defensa frente al estrés, reparación de ADN, y resistencia al daño oxidativo (Prasanth et al., 2019).

Además, existe una evidencia creciente que vincula los polifenoles de granada con una mejora de la función mitocondrial, incluyendo una mayor eficiencia en la producción de ATP y una reducción del daño oxidativo acumulado en componentes mitocondriales (Bratic & Trifunovic, 2010). Dado que la mitocondria desempeña un papel central en la regulación del envejecimiento y de la función neuromuscular en *C. elegans*, es razonable proponer que EG contribuya a la preservación de la motilidad mediante la estabilización de la bioenergética celular y la atenuación del deterioro mitocondrial asociado a la edad. Este mecanismo resulta particularmente relevante, ya que el declive locomotor en *C. elegans* se ha correlacionado estrechamente con la pérdida de integridad mitocondrial y con un aumento del estrés oxidativo a nivel neuromuscular (Lei et al., 2024).

Otro mecanismo potencialmente implicado es la autofagia, proceso esencial para la eliminación de proteínas y orgánulos dañados y para el mantenimiento de la homeostasis celular. La inhibición de la vía TOR favorece la activación de este proceso durante el envejecimiento. Asimismo, el factor de transcripción SKN 1, homólogo del Nrf2 en mamíferos, regula genes

antioxidantes y de detoxificación, y su activación ha sido postulada como otro mecanismo por el cual los polifenoles de granada podrían prolongar la vida útil del nematodo (Deng et al., 2020). En esta línea, estudios recientes han mostrado que extractos de hoja de granada activa la vía HLH-30/TFEB junto con DAF-16 y SKN-1 para promover la longevidad saludable en *C. elegans* (Todorova et al., 2024).

Adicionalmente, la modulación de la inflamación innata, la homeostasis proteica (por ejemplo, plegamiento correcto de proteínas, vía de respuesta al retículo endoplásmico) y la calidad del músculo y del sistema nervioso constituyen características fundamentales para determinar no sólo la duración de la vida, sino también la calidad funcional de la misma. En este sentido, la pérdida de motilidad en *C. elegans* se asocia directamente con la degeneración muscular y la disfunción neuronal por envejecimiento; ensayos clásicos como los de Herndon y colaboradores a inicios del siglo XXI establecieron la conexión entre deterioro neuromuscular y motilidad reducida, posicionando la evaluación de la movilidad como un marcador de envejecimiento saludable (Herndon et al., 2002).

En línea con estas observaciones, nuestros resultados indican que la suplementación con EG prolonga la vida útil y mejora la vitalidad del nematodo. Sin embargo, los efectos deletéreos observados a concentraciones elevadas de EG refuerzan la existencia de una respuesta bifásica dosis-dependiente. A dosis altas, estos compuestos podrían ejercer efectos prooxidantes, alterar el equilibrio metabólico o interferir con rutas celulares esenciales, superando la capacidad adaptativa del organismo. Este

comportamiento subraya la existencia de una ventana terapéutica estrecha y pone de manifiesto la importancia crítica de la dosis en la evaluación del potencial geroprotector de EG.

En conclusión, la suplementación con EG en *C. elegans* demuestra una doble acción beneficiosa: la extensión de la vida media y máxima, así como la mejora de la vitalidad. No obstante, es imprescindible que se administre la dosis adecuada para observar los efectos beneficiosos. Los mecanismos implicados pese a no ser estudiados en este trabajo, podrían constituir líneas futuras y abarcan la vía insulina/IGF-1 / DAF-16, activación de SKN-1/Nrf2, inducción de autofagia mediante inhibición de TOR y mejora de la homeostasis proteica y motora.

2. La suplementación con EG mejora la coordinación motora, además de atenuar la pérdida de peso involuntaria asociada a la edad sin alterar los parámetros antropométricos en el modelo murino

El deterioro de la coordinación motora constituye uno de los rasgos funcionales más característicos del envejecimiento, comprometiendo la movilidad, la capacidad para realizar actividades básicas de la vida diaria y, en última instancia, la independencia funcional en edades avanzadas. Este declive tiene un origen multifactorial que integra alteraciones musculoesqueléticas, neurodegenerativas y sensoriales.

En el plano periférico, el envejecimiento se acompaña de una pérdida progresiva de masa y fuerza muscular (sarcopenia) que incluye tanto una reducción del número total de fibras musculares como un deterioro cualitativo de su función (Cruz-Jentoft et al., 2019). En particular, la atrofia selectiva de las fibras de contracción rápida (tipo II), esenciales para generar fuerza explosiva y responder a perturbaciones posturales, contribuye de manera notable a la disminución de la potencia muscular y al incremento del riesgo de caídas.

En este contexto, los resultados del presente estudio confirman que los ratones envejecidos exhiben alteraciones funcionales coherentes con el fenotipo motor asociado al envejecimiento, validando así la idoneidad del modelo empleado para evaluar intervenciones nutricionales orientadas a frenar el deterioro neuromuscular. Entre los hallazgos más relevantes destaca el aumento significativo del tiempo de actividad en el Rotarod, una

prueba que evalúa simultáneamente equilibrio dinámico, coordinación intermuscular y capacidad de adaptación motora, todos ellos procesos que se ven notablemente comprometidos con la edad (Shoji et al., 2016).

La mejora observada en el Rotarod sugiere que la suplementación con EG podría ejercer efectos beneficiosos tanto a nivel central como periférico. A nivel central, implica circuitos cerebelosos, corteza motora y vías espinocerebelosas, estructuras que experimentan deterioro progresivo con la edad, caracterizado por pérdida sináptica, degeneración neuronal y alteraciones en la coordinación intermuscular (Morrison & Baxter, 2012; Surmeier, 2007). En este sentido, los polifenoles de la granada han demostrado favorecer la estabilidad sináptica, mejorar la función neuronal y modular vías de señalización implicadas en el control motor (Panche et al., 2016), lo que resulta coherente con los resultados obtenidos.

De forma complementaria, el rendimiento en la prueba de la escalera inclinada proporciona información adicional sobre la función neuromuscular. Esta prueba combina la necesidad de generar fuerza con la coordinación precisa de extremidades, constituyendo un biomarcador funcional ampliamente utilizado en estudios de envejecimiento (Cummings et al., 2007; Pliner et al., 2020). La mayor capacidad para transportar lastre en los animales suplementados indica no solo una mejora de la fuerza muscular, sino también de la integración sensoriomotora esencial para la ejecución de movimientos complejos. Asimismo, el aumento del rendimiento en la escalera inclinada sugiere una mejora en la eficiencia neuromuscular. Durante el envejecimiento, la unión neuromuscular experimenta

fragmentación, reducción de la densidad de receptores nicotínicos y pérdida de unidades motoras funcionales comprometiendo la fuerza y el control del movimiento (Hicks et al., 2021; Jung et al., 2015). Estudios previos indican que los polifenoles pueden ejercer efectos protectores sobre el nervio periférico y el músculo, preservando la transmisión neuromuscular y mitigando el deterioro asociado a la edad (Potter et al., 2020), lo cual es consistente con el mejor rendimiento observado en tareas que combinan fuerza y coordinación. En contraste, la suplementación con EG no produjo mejoras en la fuerza de agarre ni en la resistencia evaluada mediante carrera en tapiz rodante. Este resultado sugiere que los efectos beneficiosos del extracto no se extienden a la fuerza máxima aislada ni a la resistencia aeróbica, sino que se concentran en procesos que requieren integración neuromuscular compleja, como la coordinación motora y la sincronización intermuscular.

Por otro lado, el envejecimiento en roedores se asocia con cambios relevantes en la composición corporal (reducción de la masa libre de grasa, incremento relativo de la adiposidad) así como con alteraciones en la ingesta alimentaria y en la eficiencia metabólica (Palliyaguru et al., 2021b). En etapas avanzadas de la vida, muchos animales presentan disminuciones de la ingesta acompañada de una progresiva pérdida de masa muscular, lo cual contribuye a la reducción general del peso corporal, apareciendo así la sarcopenia (Miller & Wolfe, 2008).

La sarcopenia, entendida como la pérdida progresiva y generalizada de masa y función musculoesquelética relacionada con la edad, constituye una

manifestación central de este deterioro y se asocia con una mayor morbilidad, fragilidad y disminución de la calidad de vida (Santilli et al., 2014). En esta línea, la ausencia de diferencias significativas en los parámetros evaluados mediante DEXA indica que la mitigación de la pérdida de peso observada en los animales suplementados no se debe a un incremento sustancial de la masa magra o grasa. En cambio, podría reflejar una mejor regulación de la homeostasis energética, una reducción de procesos catabólicos mediados por inflamación o un aumento de la eficiencia metabólica. Estas posibles vías son coherentes con los efectos atribuidos a los compuestos fenólicos presentes en la granada, conocidos por modular el estrés oxidativo, la inflamación y la función mitocondrial (D. Wang et al., 2020; Y. Wang et al., 2025).

En conjunto, los resultados sugieren que la suplementación con EG ejerce un efecto convergente sobre distintas rutas fisiológicas relacionadas con la función motora, incluyendo la protección neuronal, la mejora de la integración sensoriomotora y el mantenimiento de un peso corporal funcional. Esta acción podría contribuir a retrasar la aparición de signos tempranos de fragilidad. Este marco coincide con modelos contemporáneos que conceptualizan el envejecimiento como un proceso sistémico en el que la coordinación motora, la masa corporal funcional y la integridad neuromuscular se deterioran simultáneamente. En este contexto, la suplementación con EG podría modular de manera eficaz varios de estos procesos, explicando la mejora global del fenotipo motor observada en los ratones envejecidos.

3. La suplementación con EG modula la conducta espontánea y de comportamiento en el envejecimiento murino

El análisis del comportamiento en ratones envejecidos constituye una herramienta fundamental para comprender el impacto del envejecimiento fisiológico sobre el sistema nervioso central y la conducta. El envejecimiento se asocia de forma consistente con un deterioro progresivo de dominios cognitivos clave, en particular del aprendizaje y la memoria (Vidal-Piñeiro et al., 2025). Numerosos estudios han demostrado que los animales de edad avanzada presentan un rendimiento reducido en pruebas estandarizadas como el laberinto acuático de Morris, donde muestran mayor latencia para localizar la plataforma oculta y una menor retención de la localización en ensayos de memoria (Lamberty & Gower, 1992; Shoji et al., 2016). Este deterioro cognitivo se vincula con alteraciones dependientes de la edad en la plasticidad sináptica hipocampal, incluidas reducciones en la potenciación a largo plazo, pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales y una disminución de la neurogénesis adulta asociada a procesos oxidativos e inflamatorios (Burke & Barnes, 2006). Además, el envejecimiento compromete la formación de recuerdos tanto a corto plazo (memoria de trabajo) como a largo plazo (consolidación), lo que refleja una afectación combinada de circuitos hipocampales y prefrontales (Reinhart & Nguyen, 2019).

Con el objetivo de obtener una evaluación más amplia que incorpore no solo cognición, en el presente estudio se emplearon baterías conductuales basadas en comportamientos espontáneos. El *burrowing* test

constituye una de las pruebas más informativas, ya que evalúa la capacidad del animal para excavar o desplazar sustrato, comportamiento conservado filogenéticamente y dependiente de la motivación intrínseca y la integridad motora (Deacon, 2006, 2009). Esta prueba ha mostrado sensibilidad para detectar deterioro funcional temprano en modelos de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, donde la reducción en el material desplazado se relaciona con alteraciones motoras, déficits motivacionales y fenómenos tipo apatía (Sheta et al., 2024).

En el envejecimiento fisiológico, también se ha descrito una disminución progresiva de la conducta, interpretada como un indicador combinado de deterioro motor, apatía y reducción del bienestar, potencialmente asociado a inflamación neurogénica e incremento del "*inflammaging*" (Jirkof, 2014). En nuestro modelo experimental analizamos dos parámetros derivados del burrowing test: (i) el material desplazado y (ii) la capacidad de enterrar pellets. No se detectaron diferencias significativas en el material desplazado entre los 18 y los 22 meses, ni entre los grupos control y suplementado con EG. Este resultado sugiere que el intervalo temporal evaluado podría no ser suficiente para detectar un deterioro robusto mediante esta técnica, en línea con estudios que indican que las diferencias más marcadas aparecen tras periodos más prolongados de envejecimiento (≥6 meses) o en cepas más susceptibles (Geiszler et al., 2016). Además, la duración limitada del ensayo (≤ 2 horas) podría haber reducido la sensibilidad de la prueba (Deacon, 2009).

Sin embargo, el análisis del dato de la capacidad para enterrar pellets reveló un hallazgo relevante, ya que, los animales suplementados con EG mostraron una mejora significativa tanto respecto a ratones de 18 meses como frente a los ratones de 22 meses no suplementados. El enterramiento es un comportamiento que exige coordinación motora fina, planificación secuencial y un grado significativo de motivación. Por ello, la mejora observada sugiere un potencial efecto neuroprotector o neuromodulador del EG sobre redes motivacionales y motoras alteradas durante el envejecimiento.

Una explicación plausible es la acción de los polifenoles de la granada sobre el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Se ha demostrado que estos compuestos reducen el daño oxidativo cerebral, modulan la activación microglial y preservan la plasticidad sináptica en modelos murinos de envejecimiento y neurodegeneración (Aleksandrova et al., 2023; W. Wang et al., 2024). En consonancia, nuestros resultados muestran que los animales envejecidos suplementados mantienen una conducta de enterramiento más eficiente, lo cual sugiere que la reducción del estrés oxidativo en el cerebelo y la modulación neuroinflamatoria pueden expresar beneficios conductuales antes de que se manifiesten déficits motores más severos (Sajdel-Sulkowska et al., 2007).

Para complementar este análisis, se empleó el *hole board* test, una prueba clásica para evaluar exploración dirigida a la novedad y niveles basales de ansiedad (Barth & Mody, 2014; Foreman et al., 2009). En esta prueba, el número de *head-dips* se interpreta como un índice de curiosidad

o motivación exploratoria y actividad mesolímbica. En modelos envejecidos, se ha descrito que los animales realizan menos *head-dips*, reflejando reducción de motivación exploratoria y aumento de la inhibición ante ambientes novedosos, cambios asociados a la disfunción de sistemas monoaminérgicos y a alteraciones en la conectividad prefrontal-hipocampal (Ennaceur, 2014; Holmes et al., 2002). En nuestros resultados, los ratones de 22 meses mostraron esta reducción esperada, mientras que los suplementados con EG mantuvieron niveles de exploración comparables a los observados a los 18 meses, sugiriendo un efecto protector frente al declive exploratorio asociado al envejecimiento.

Finalmente, se utilizó el EPMT para evaluar la ansiedad. El envejecimiento suele asociarse con incrementos en la ansiedad basal y a cambios en la respuesta al estrés, relacionados con alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Bettio et al., 2017; Shoji et al., 2016). En nuestro estudio, los animales de 22 meses mostraron los cambios típicos de envejecimiento con una menor exploración en los brazos abiertos. En los animales suplementados con EG se observó una mayor permanencia relativa en los brazos abiertos (Walf & Frye, 2007). Este perfil sugiere una posible modulación de la conducta ansioso-exploratoria. Sin embargo, su interpretación debe realizarse con cautela, ya que la reducción de la actividad total puede influir en la frecuencia de entradas y dificultar la distinción entre efectos ansiolíticos y cambios en la locomoción general. No obstante, el aumento del tiempo relativo en brazos abiertos es compatible con una menor evitación de entornos aversivos.

Este resultado es congruente con estudios que demuestran que los polifenoles del EG ayudan a la regulación emocional y motivacional, favoreciendo la plasticidad sináptica y la función dopaminérgica mesocorticolímbica (Aleksandrova et al., 2023; Tzekaki et al., 2025).

En conjunto, los resultados indican que la suplementación con EG ejerce efectos beneficiosos conductuales que cambian con el envejecimiento, incluyendo la motivación, la exploración y la respuesta al estrés. Estos efectos parecen reflejar una modulación integrada de circuitos neuronales vulnerables al envejecimiento, más que una mejora aislada de funciones específicas.

4. La suplementación con EG modula el metabolismo de la glucosa sin alterar los parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones envejecidos

El envejecimiento se asocia con alteraciones metabólicas que incluyen resistencia a la insulina, hiperglucemia basal y una reducción progresiva de la eficiencia metabólica. Estas modificaciones, se han descrito tanto en humanos como en modelos animales, y están vinculadas con inflamación crónica, disfunción mitocondrial y cambios endocrinos propios de la senescencia fisiológica (Junnila et al., 2013; Milman et al., 2016).

En este contexto, resulta relevante determinar si la suplementación con EG ejerce efectos beneficiosos sobre la regulación glucémica y el equilibrio sistémico en animales envejecidos.

Nuestros resultados obtenidos evidencian que el envejecimiento modula de manera significativa la homeostasis glucémica, observándose en los animales de 22 meses una disminución tanto de la glucosa basal como de la excursión glucémica tras la sobrecarga, lo que se traduce en una reducción significativa del AUC en comparación con los animales de 18 meses, mientras que la capacidad de recuperación tardía (índice T120 / glucosa basal) se mantiene sin cambios relevantes entre los grupos.

Este patrón sugiere que las diferencias asociadas a la edad se concentran principalmente en la fase temprana de la respuesta a la carga de glucosa, posiblemente vinculadas a modificaciones en la secreción inicial de insulina, en la captación periférica o en la producción hepática de glucosa más que en la depuración tardía sostenida. Esta interpretación es coherente con modelos que describen una afectación selectiva de la dinámica insulínica durante el envejecimiento (Barzilai et al., 2012; Lien et al., 2025).

Asimismo, el tratamiento con EG muestra un efecto modulador parcial, generando valores intermedios en la dinámica glucémica y en el AUC sin restablecer completamente el perfil observado en animales más jóvenes. Este resultado sugiere un efecto modulador sobre la homeostasis glucémica, posiblemente relacionado con mejoras en la señalización insulínica, la función mitocondrial o el estado redox celular, todos ellos procesos implicados en los denominados *hallmarks* del envejecimiento.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el envejecimiento en este modelo no se asocia necesariamente con un deterioro progresivo de la tolerancia a la glucosa, sino a una reorganización funcional de la respuesta

glucémica, y que la intervención con EG podría contribuir a modular parcialmente estos cambios.

Los compuestos bioactivos presentes en la granada (principalmente polifenoles tales como punicalaginas y ácido elágico) han sido implicados en la modulación del metabolismo glucídico, la mejora de la sensibilidad a la insulina y la atenuación del estrés oxidativo e inflamación (Alami et al., 2023). Asimismo, se ha descrito que los extractos de granada pueden inhibir enzimas digestivas como la α-amilasa y la α-glucosidasa, lo que ralentiza la absorción de glucosa y contribuye al control glucémico postprandial (Bastida et al., 2021). Finalmente, se postula que estos polifenoles podrían influir sobre la microbiota intestinal, promoviendo un perfil bacteriano que favorezca la regulación metabólica de la glucosa, aunque esta hipótesis requiere mayor validación experimental.

Además del metabolismo glucídico, el envejecimiento se acompaña de alteraciones hematológicas que incluyen modificaciones en la proporción de subpoblaciones leucocitarias, tendencia a la anemia leve y cambios en parámetros eritrocitarios y plaquetarios (De Haan & Lazare, 2018). Evaluar el impacto del EG sobre estos parámetros es esencial para determinar la seguridad sistémica de la suplementación. Los parámetros hematológicos analizados muestran que no existen diferencias significativas entre los animales de 22 meses suplementados y no suplementados en la mayoría de las variables evaluadas. Los recuentos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos se mantienen dentro de rangos

comparables entre grupos, sin indicios de inmunomodulación relevante atribuible al extracto.

Sin embargo, la suplementación con EG produjo un incremento significativo del porcentaje de monocitos circulantes. Sin embargo, este hallazgo se observó junto a una disminución del estrés oxidativo sistémico, una mejora del estado redox y una reducción de marcadores neuroinflamatorios y apoptóticos cerebelosos. Por ello, el aumento de monocitos no parece reflejar una respuesta inflamatoria perjudicial, sino una posible modulación de la inmunidad innata relacionada con funciones de vigilia inmunológica y reparación tisular. Esta interpretación concuerda con la plasticidad funcional de los monocitos y macrófagos, capaces de ejercer funciones tanto inflamatorias como reparadoras según el contexto fisiológico (Ogle et al., 2016; Vannella & Wynn, 2017), así como con los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios previamente descritos para los polifenoles de la granada (Rosenblat et al., 2006).

En el componente eritrocitario (RBC, HGB, HCT, VCM, MCH, MCHC, RDW-CV), tampoco se observan variaciones entre los grupos, lo que indica que la suplementación no afecta la eritropoyesis ni la concentración de hemoglobina.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que indican que los extractos de granada suelen presentar un adecuada tolerabilidad y no inducir alteraciones hematológicas significativas, ni con dosis elevadas (Viuda-Martos et al., 2010).

Además de la evaluación de la tolerancia a la glucosa y de los parámetros hematológicos, se analizaron diversos marcadores bioquímicos con el objetivo de determinar si la suplementación con EG inducía cambios sistémicos relevantes en la función renal, hepática, muscular o metabólica de los ratones envejecidos.

La evaluación bioquímica incluyó marcadores de función renal (urea, BUN, creatinina), hepática (ALT, ALP, albúmina, proteínas totales), muscular (CPK) y metabolitos energéticos (glucosa, lactato). Ninguno de los parámetros renales mostró diferencias entre grupos, indicando ausencia de nefrotoxicidad asociada al tratamiento. De forma concordante, estudios previos han demostrado que la suplementación con EG no altera la función renal ni eleva niveles de creatinina o urea (Cerdá et al., 2003; Tzulker et al., 2007). Los marcadores hepáticos ALT y ALP tampoco presentaron variaciones, y la albúmina se mantuvo estable entre grupos. Estos datos sugieren que el EG no produce hepatotoxicidad, un hallazgo ampliamente corroborado por estudios de toxicidad subcrónica y crónica en roedores (Afaq et al., 2005).

La estabilidad de CPK indica que el extracto no induce daño muscular, coherente con la naturaleza antioxidante de los polifenoles, que pueden incluso proteger frente a procesos catabólicos musculares asociados al envejecimiento.

El único parámetro que mostró un incremento significativo fue el lactato plasmático. Aunque su interpretación requiere prudencia, se trata de un hallazgo aislado que no se acompaña de alteraciones renales, hepáticas

o musculares. Otros estudios han demostrado que extractos de granada no alteran significativamente el metabolismo del lactato ni generan acidosis metabólica (Belyani et al., 2025), por lo que este resultado pensamos que puede estar asociado a una respuesta aguda en el sacrificio, más que un efecto patológico directo.

En conjunto, la ausencia de alteraciones relevantes en los parámetros bioquímicos y hematológicos indica que la suplementación con EG presenta una adecuada tolerabilidad en el contexto de administración crónica en animales envejecidos.

5. La suplementación con EG muestra un efecto antioxidante sistémico mejorando la ratio GSH/GSSG sanguínea y reduciendo la peroxidación lipídica cerebelosa

El envejecimiento biológico se relaciona con la pérdida progresiva de la homeostasis celular, causada en gran parte por el estrés oxidativo crónico. Desde la década de 1950, Harman y Gerschman propusieron que el metabolismo aeróbico genera radicales libres que dañan lípidos, proteínas y ADN. La acumulación de este daño altera la señalización celular, la expresión génica y la función de los tejidos, contribuyendo al deterioro asociado a la edad y a la muerte celular (Harman, 1956; López-Otín et al., 2013).

En este contexto, el cociente entre GSH/GSSG se considera uno de los indicadores más robustos del estado redox celular (Schafer & Buettner, 2001). Una ratio elevada refleja un entorno intracelular reducido y

homeostáticamente estable, mientras que su disminución indica un desplazamiento hacia un estado oxidado y mayor estrés oxidativo (Jones, 2006; Keshavarz et al., 2023; Liguori et al., 2018).

Bajo este marco conceptual, se planteó si la suplementación prolongada con EG sería capaz de atenuar el daño oxidativo sistémico asociado al envejecimiento fisiológico y, en paralelo, preservar funciones motoras y conductuales. Para ello, ratones de 18 meses de edad recibieron suplementación con EG durante cuatro meses, tras este periodo se recogió sangre periférica y se determinó el GSH y GSSG. En nuestro modelo, la suplementación con EG mantuvo niveles de GSH y de GSSG comparables a los observados en animales adultos (10 meses), evitando el desplazamiento del equilibrio hacia la oxidación que se detectó en los ratones envejecidos control de 22 meses. Este hallazgo indica que el EG contribuye a preservar el equilibrio redox sistémico durante el envejecimiento.

En paralelo, el sistema nervioso central representa uno de los tejidos más vulnerables al daño oxidativo debido a su elevado consumo energético y a su alto contenido en lípidos poliinsaturados. En particular, el cerebelo presenta una elevada susceptibilidad a la peroxidación lipídica, lo que puede comprometer la función motora. Entre los productos derivados de este proceso, el MDA se utiliza ampliamente como marcador de daño oxidativo en membranas celulares (Adibhatla & Hatcher, 2010; Reed, 2011) .

En el presente estudio se cuantificó el MDA en córtex cerebral y cerebelo. Los resultados muestran que los animales envejecidos suplementados con EG presentan niveles significativamente inferiores de

MDA en el cerebelo en comparación con los controles de la misma edad, mientras que no se observaron diferencias en el córtex cerebral.

Este patrón sugiere dos aspectos relevantes. En primer lugar, que el impacto del envejecimiento sobre el estrés oxidativo no es homogéneo entre regiones cerebrales, siendo el cerebelo especialmente susceptible. En segundo lugar, que el efecto del EG podría presentar cierto grado de especificidad tisular, ejerciendo una protección más marcada en regiones implicadas en la coordinación.

Este hallazgo resulta particularmente relevante en el contexto de los resultados funcionales descritos previamente, ya que la reducción de la peroxidación lipídica cerebelosa podría contribuir a preservar la integridad de circuitos neuronales implicados en la coordinación motora. En este sentido, diversos estudios han asociado niveles elevados de MDA con deterioro motor en modelos animales, mientras que su reducción se correlaciona con mejoras funcionales (Adebiyi et al., 2019).

En conjunto, estos resultados indican que la suplementación con EG ejerce un efecto antioxidante tanto a nivel sistémico como en el sistema nervioso central concretamente a nivel cerebeloso, contribuyendo a preservar el equilibrio redox y a limitar el daño oxidativo asociado al envejecimiento. Este efecto podría constituir uno de los mecanismos clave que subyacen a la mejora funcional observada en los modelos experimentales empleados.

6. Cambios transcripcionales asociados al envejecimiento en cerebelo y córtex cerebral y efectos moduladores de la suplementación con EG

Tras demostrar que la suplementación con EG atenúa diversos componentes del fenotipo de envejecimiento incluyendo el deterioro motor, la alteración conductual y el estrés oxidativo sistémico y cerebeloso, se abordó el análisis de los mecanismos moleculares subyacentes mediante el estudio de la expresión génica en cerebelo y córtex cerebral.

El envejecimiento cerebral implica una profunda remodelación transcripcional que afecta procesos clave como la neurotransmisión, la inflamación, la plasticidad sináptica, el metabolismo energético y la función glial (Aron et al., 2022; Mattson & Arumugam, 2018). Estudios liderados por Tom Prolla y colegas demostraron que el cerebelo presenta cambios transcriptómicos particularmente marcados con la edad, identificando genes que actúan como marcadores de envejecimiento y cuya expresión puede modularse mediante intervenciones antioxidantes en ratones envejecidos (Patel et al., 2008; Prolla, 2002).

Nuestros resultados confirman que los ratones envejecidos a los 22 meses tienen una sobreexpresión significativa de genes asociados al envejecimiento. Entre estos genes, *C1qa* ha sido ampliamente relacionado con procesos de neurodegeneración y pérdida sináptica, actuando como mediador en la eliminación de sinapsis durante el envejecimiento (J. Zhang et al., 2020), siendo incluso propuesto recientemente como biomarcador de demencia vascular (Y. Xu et al., 2025). Por otro lado, *C4b*, componente del

sistema del complemento, participa en la poda sináptica y su sobreexpresión se ha vinculado con deterioro cognitivo, habiéndose propuesto como posible diana terapéutica para tratar el envejecimiento cognitivo (Y. Zheng et al., 2025). El gen *Ctss* participa en la degradación de antígenos proteicos y controla el tráfico intracelular de moléculas del MHC de clase II cuya activación aparece en el cerebro humano envejecido sin demencia y también en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Zanjani et al., 2005). También, estudios previos han demostrado que la expresión de *Gfap*, el primer marcador transcripcional validado en el envejecimiento cerebral y muy asociado a enfermedad de Alzheimer, aumenta progresivamente durante el envejecimiento en humanos y modelos de roedores (K. Y. Kim et al., 2023; Nichols et al., 1993) Finalmente, el gen *Lzp-s*, asociado a activación microglial, también se incrementa en contextos de inflamación cerebral crónica (Domowicz et al., 2021).

De forma relevante, la suplementación con EG atenuó significativamente la sobreexpresión de casi todos los genes en el cerebelo, sugiriendo un efecto modulador beneficioso en contra del envejecimiento. En el córtex cerebral, la reducción inducida por el EG no alcanzó significancia estadística significativa, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad de esta región al envejecimiento y/o una menor respuesta al tratamiento.

Se analizó también la expresión de *B2m*, componente del MHC-I implicado en plasticidad sináptica y propuesto como biomarcador de deterioro cognitivo y de Alzheimer (Smith et al., 2015; Zhao et al., 2023). El aumento de B2M se ha asociado con deterioro cognitivo y envejecimiento

cerebral (Kellogg et al., 2023). En nuestro modelo, los animales envejecidos mostraron un incremento de su expresión en cerebelo, mientras que la suplementación con EG redujo sus niveles hacia valores más próximos a los observados en animales adultos, sugiriendo una modulación favorable del entorno sináptico.

Adicionalmente, el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados indicó una convergencia en rutas relacionadas con la apoptosis. Estos resultados han sido confirmados mediante el análisis de la expresión génica de las caspasas 3, 8 y 9 principales efectores de la muerte celular programada. Previamente, en otros estudios del grupo, se observó que los centenarios también se caracterizan por un mejor control de la apoptosis en comparación con personas con envejecimiento normal(Borras et al., 2016) A su vez , estudios en ratas envejecidas han mostrado un aumento en la actividad de las vías apoptóticas en cerebelo y tras realizar un programa de ejercicio físico su observó una disminución en estas vías (Marques-Aleixo et al., 2015). Nuestros resultados murinos muestran que la suplementación con EG es capaz de modular los genes clave asociados al envejecimiento y a la ruta de la apoptosis. Este efecto podría contribuir a preservar la integridad neuronal y la función sináptica deteriorada con la edad.

7. El EG reduce el estrés oxidativo basal y mejora la respuesta celular frente al daño oxidativo inducido en células sanguíneas de ratones envejecidos

El envejecimiento se caracteriza por una desregulación del equilibrio redox sistémico. Una de sus manifestaciones más consistentes es el

incremento sostenido en la producción de ROS en células inmunitarias, acompañado de una disminución de la capacidad antioxidante endógena y de alteraciones funcionales que configuran el denominado *inflammaging* (Franceschi & Campisi, 2014).

En este contexto, los leucocitos de individuos envejecidos presentan niveles elevados de ROS citosólicas y mitocondriales incluso en condiciones basales, como consecuencia de una menor eficiencia mitocondrial, una activación crónica de NADPH oxidasa y un estado proinflamatorio persistente (Kozakiewicz et al., 2019). Este aumento basal no solo compromete la funcionalidad inmunitaria, sino que favorece el daño acumulativo en proteínas, lípidos de membrana y ADN, acelerando procesos patológicos asociados a la edad.

En nuestro estudio, los ratones envejecidos mostraron un incremento significativo en los niveles basales de fluorescencia asociados a DHR123 y MitoPY en linfocitos, monocitos y neutrófilos, lo que indica un aumento tanto de ROS citoplasmático como de origen mitocondrial. Este incremento fue especialmente marcado en neutrófilos, células con elevada capacidad oxidativa que, en el contexto del envejecimiento, tienden a adoptar un fenotipo hiperreactivo y potencialmente lesivo para los tejidos (Hazeldine & Lord, 2015).

En contraste, los animales suplementados con EG mostraron una reducción significativa de los niveles basales, aproximándose a los valores observados en animales adultos. Este hallazgo sugiere que el EG contribuye a restablecer el equilibrio redox en células inmunitarias envejecidas. Este

efecto, podría explicarse a través de una combinación de efectos antioxidantes directos por captación de radicales libres por sus polifenoles o indirectos, derivados de la activación de rutas endógenas de defensa antioxidante como Nrf2 y de enzimas tales como SOD, CAT y GPx (Asgary et al., 2023; Sun et al., 2016).

En el trabajo de Alvarado y colegas, ratones jóvenes con envejecimiento prematuro presentaron mayor producción de compuestos oxidantes y menores defensas antioxidantes en comparación con ratones silvestres, lo que se asocia con un deterioro temprano de la función inmunitaria. La suplementación dietética con galletas ricas en antioxidantes (vitaminas C y E, β-carotenos, zinc y selenio) mostraron que esta intervención redujo los marcadores de estrés oxidativo y restauró parcialmente el equilibrio redox en los leucocitos (Alvarado et al., 2006).

Nuestros resultados, coinciden, en parte, con los resultados de Rosenblat et al. (2006), quienes demostraron que el consumo de granada reduce el estrés oxidativo y mejora la función antioxidante de macrófagos derivados de monocitos, disminuyendo el contenido de peróxidos intracelulares. (Rosenblat et al., 2006).

Con el objetivo de evaluar la vulnerabilidad celular al estrés oxidativo, los leucocitos fueron sometidos a un estímulo prooxidante ex vivo (tBHP). Bajo estas condiciones, los animales envejecidos mostraron incrementos marcados con todos los fluorocromos, especialmente en neutrófilos y linfocitos/monocitos, lo que indica una respuesta exacerbada frente al daño oxidativo.

Este comportamiento es característico de la inmunosenescencia, donde las células presentan una doble alteración: por un lado, una mayor producción de ROS ante estímulos, y por otro, una menor capacidad para neutralizarlos o reparar el daño resultante (Ventura et al., 2017) Este fenómeno se ha relacionado con disfunción mitocondrial, incluyendo hiperpolarización de la membrana mitocondrial y aumento de fugas electrónicas, lo que amplifica la generación de especies reactivas (Fang et al., 2017).

La suplementación con EG atenuó significativamente esta respuesta. Los animales tratados presentaron incrementos menores de fluorescencia tras el estímulo oxidativo, tanto en ROS totales como mitocondrial, lo que indica no solamente una reducción de la carga oxidativa basal, sino también una mayor resiliencia celular frente a daños agudos. Otra explicación podría ser que el EG mejora la capacidad del sistema inmunitario envejecido. Los mecanismos subyacentes a esta mejora del equilibrio redox pueden interpretarse como la convergencia de varias acciones complementarias. En primer lugar, se ha descrito que los polifenoles del EG ejercen efectos directos sobre la función mitocondrial, promoviendo la biogénesis, optimizando la dinámica mitocondrial mediante la reducción de la fragmentación y la mejora de la fusión, y activando procesos de mitofagia que eliminan orgánulos deteriorados (Tan et al., 2019). La disminución observada en la señal de MitoPY en animales suplementados sugiere una menor producción de H_2O_2 mitocondrial y, por tanto, una mayor estabilidad funcional ante el daño oxidativo.

Asimismo, la reducción del estado prooxidante sistémico podría estar relacionada con una menor activación basal de NADPH oxidasa, dado que compuestos derivados de la granada han demostrado inhibir esta enzima en neutrófilos, monocitos y células endoteliales (Fuster-Muñoz et al., 2016). Este efecto se complementa con la modulación de vías proinflamatorias dependientes de NF-κB, PI3K/Akt y JNK (Aviram et al., 2000; Cordiano et al., 2024), cuya activación crónica en el envejecimiento perpetúa un círculo vicioso entre inflamación y producción de radicales libres. Al atenuar este tono inflamatorio basal, el EG favorece una respuesta inmunitaria más equilibrada y reduce la hiperreactividad oxidativa.

A largo plazo, la disminución sostenida de ROS basales probablemente limita el daño acumulativo en biomoléculas, preserva la integridad mitocondrial y mejora la viabilidad celular. Esta protección acumulativa permite que las células inmunitarias mantengan una mayor capacidad adaptativa y una menor propensión a la disfunción oxidativa, aspecto c entral en la prevención de la inmunosenescencia (Viladomiu et al., 2013).

En conjunto, los resultados indican que el EG ejerce un efecto modulador sobre el equilibrio redox en células inmunitarias envejecidas, reduciendo el estrés oxidativo basal y mejorando la respuesta frente a estímulos prooxidantes.

8. Evaluación histológica del cerebelo envejecido y papel del EG en la preservación de la arquitectura neuronal

El cerebelo es una estructura clave en el control de la coordinación motora, el equilibrio y la precisión de los movimientos. Anatómicamente, se localiza en la fosa craneal posterior y se conecta con el tronco encefálico a través de los pedúnculos cerebelosos. Su corteza presenta una organización laminar altamente conservada, compuesta por tres capas bien definidas: la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granular. La capa molecular contiene las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje y diversas interneuronas inhibitorias, mientras que la capa de Purkinje alberga los somas de estas neuronas, que constituyen la principal vía eferente del cerebelo. Por su parte, la capa granular está formada por células granulares y estructuras sinápticas complejas (glomérulos cerebelosos), responsables del procesamiento de las aferencias excitadoras (Vachha et al., 2022).

El envejecimiento normal induce cambios estructurales en estas capas. En modelos experimentales, se ha descrito un engrosamiento de la capa granular asociado a la edad, relacionado con gliosis reactiva, hipertrofia celular y reorganización de los glomérulos sinápticos (Woodruff-Pak et al., 2010) afectando dicho engrosamiento a la capacidad locomotora (Hayashi et al., 2017). En nuestro estudio, los ratones de 22 meses mostraron un aumento significativo del grosor de la capa granular, acompañado de una mayor densidad celular.

De forma relevante, este engrosamiento fue notablemente atenuado en los ratones suplementados con EG, cuyos valores se aproximaron a los observados en animales adultos. Este hallazgo sugiere que la suplementación con EG podría limitar la gliosis reactiva y preservar una organización granular más cercana a la de un cerebelo joven.

Por el contrario, la literatura describe un adelgazamiento progresivo de la capa molecular con la edad, resultado de la retracción dendrítica de las células de Purkinje y de la pérdida de sinapsis paralelas (Agashiwala et al., 2008; Andersen et al., 2003). Consistentemente, en nuestros ratones envejecidos no suplementados se observó una reducción del grosor de esta capa, junto con un incremento de la densidad celular aparente, atribuible a infiltración o hiperplasia glial reactiva. En cambio, en los animales envejecidos suplementados con EG, el grosor de la capa molecular se mantuvo comparable al de los cerebelos de animales adultos, y la densidad glial incrementada fue significativamente menor que en el grupo envejecido no suplementado. Este patrón indica que el EG podría preservar las arborizaciones dendríticas de Purkinje y reducir la necesidad de una respuesta glial compensatoria, un efecto descrito también en estudios donde los polifenoles de granada atenúan la glioactivación inducida por inflamación crónica o estrés oxidativo (Emami Kazemabad et al., 2022; Naomi et al., 2023).

Las células de Purkinje representan un elemento central en la fisiología cerebelosa. Estas neuronas gabaérgicas son altamente vulnerables al envejecimiento, y su pérdida o disfunción se ha relacionado directamente

con el deterioro motor. Diversos estudios han descrito una reducción progresiva en su densidad durante el envejecimiento, junto con cambios morfológicos compensatorios, como aumento del tamaño somático y aparición de somas ectópicos en capas adyacentes (C. Zhang et al., 2010).

Nuestros resultados en ratones de 22 meses mostraron reducción de densidad de células de Purkinje acompañada de un aumento del área somática y presencia de somas ectópicos en la capa molecular. Este aumento ha sido descrito como una respuesta compensatoria a la pérdida en el número de las células (Childs et al., 2021). Además, recientemente se han conseguido establecer relaciones entre esta pérdida funcional de las células de Purkinje durante en el envejecimiento como una de las causas que explicarían los déficits motores asociados a la fragilidad y envejecimiento (Fields et al., 2026). Sin embargo, en nuestro trabajo, los animales suplementados con EG presentaron una densidad y morfología de células de Purkinje comparables a las observadas en animales adultos. Este hallazgo sugiere un efecto neuroprotector del EG sobre estas neuronas, contribuyendo a preservar la integridad del circuito cerebeloso.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer estudio que describe que un extracto de granada podría ralentizar el envejecimiento estructural del cerebelo, preservando parcialmente su organización histológica característica. La reducción del engrosamiento de la capa granular, el mantenimiento del grosor de la capa molecular y la conservación de la densidad, morfología y localización de las células de Purkinje sugieren que el EG podría actuar frenando algunos de los mecanismos responsables

de la remodelación tisular asociada a la edad. Estos resultados aportan una nueva perspectiva sobre el potencial de los polifenoles de la granada como estrategia para promover un envejecimiento cerebral saludable, especialmente en una región tan vulnerable al envejecimiento como el cerebelo.

La relevancia funcional de estos resultados se ve reforzada por la mejora observada en las pruebas de coordinación motora, como el Rotarod. La preservación de la arquitectura cerebelosa, y en particular de las células de Purkinje, proporciona un sustrato estructural coherente con el mantenimiento de la función motora en los animales suplementados.

En conjunto, los resultados histológicos indican que el envejecimiento induce una reorganización estructural del cerebelo caracterizada por gliosis, alteraciones dendríticas y pérdida de neuronas clave, mientras que la suplementación con EG atenúa estos cambios, preservando la arquitectura tisular y la integridad neuronal.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La suplementación con EG a dosis de 0,05; 0,1 y 0,5 mg/mL ejerce un efecto positivo sobre la esperanza de vida de *C. elegans.*
2. La suplementación con EG a 0,05 mg/mL mejora significativamente la motilidad de *C. elegans*, considerada un marcador funcional de vitalidad.
3. En el modelo murino envejecido, la suplementación con EG no modifica de forma significativa los parámetros antropométricos determinados mediante DEXA.
4. La suplementación con EG incrementa parcialmente la respuesta glucémica en ratones envejecidos, aumentando significativamente el AUC respecto al grupo envejecido no suplementado y aproximando sus valores a los observados en animales adultos, sin modificar la glucemia basal ni la glucemia a los 120 minutos.
5. La suplementación con EG no induce alteraciones hematológicas ni bioquímicas relevantes en sangre periférica de ratones envejecidos, lo que sugiere una adecuada tolerabilidad del tratamiento.
6. La suplementación con EG mejora el rendimiento de los ratones envejecidos, aumentando el tiempo de latencia en la prueba de Rotarod y la carga máxima soportada en la prueba de la escalera inclinada.
7. Los ratones suplementados con EG presentan una mayor capacidad exploratoria y una mejor respuesta conductual frente al

estrés, aumentando el porcentaje de material enterrado en la prueba de *Burrowing*, y el número de entradas en los orificios en la prueba de *Hole Board*, así como el tiempo relativo permanecido en los brazos abiertos durante la prueba EPMT.

8. La suplementación con EG mejora diversos marcadores de estrés oxidativo, aumentando la ratio GSH/GSSG en plasma, y reduciendo los niveles de MDA en sangre y cerebelo, sin observarse este efecto antioxidante a nivel del córtex cerebral.
9. El EG reduce de forma específica la expresión de genes asociados al neuroenvejecimiento (*C1qa, C4b, Gfap, Lzp-s*), al deterioro cognitivo (*B2m)* y a la apoptosis *(Casp3, Casp8 y Casp9*) en el cerebelo, pero no el córtex cerebral de ratones envejecidos.
10. La suplementación con EG reduce los niveles basales e inducidos de especies reactivas de oxígeno citoplasmáticas, mitocondriales y derivadas del peróxido de hidrógeno en distintas poblaciones leucocitarias de ratones envejecidos.
11. El EG ejerce un efecto protector frente al deterioro cerebeloso asociado al envejecimiento, preservando el grosor de la capa granular, disminuyendo la densidad y aumentando el grosor en la capa molecular. Además, mantiene la densidad, morfología y localización de las células de Purkinje, y reduce la aparición de vacuolas asociadas a la edad.

BIBLIOGRAFÍA

Abouelezz, H. M., Shehatou, G. S. G., Shebl, A. M., & Salem, H. A. (2023). A standardized pomegranate fruit extract ameliorates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats via AGE-RAGE-ROS signaling. *Heliyon*, *9*(3), e14256. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14256

Achraf, A., Hamdi, C., Turki, M., Abdelkarim, O., Ayadi, F., Hoekelmann, A., Yaich, S., & Souissi, N. (2018). Natural pomegranate juice reduces inflammation, muscle damage and increase platelets blood levels in active healthy Tunisian aged men. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*(1), 45-48. https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.03.005

Ackert-Bicknell, C. L., Anderson, L. C., Sheehan, S., Hill, W. G., Chang, B., Churchill, G. A., Chesler, E. J., Korstanje, R., & Peters, L. L. (2015). Aging Research Using Mouse Models. *Current Protocols in Mouse Biology*, *5*(2), 95-133. https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140195

Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y., Sand, D., & Heber, D. (2006). Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cell Signaling in Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(3), 980-985. https://doi.org/10.1021/jf052005r

Adebiyi, O. E., Olayemi, F. O., Olopade, J. O., & Tan, N.-H. (2019). Beta-sitosterol enhances motor coordination, attenuates memory loss and demyelination in a vanadium-induced model of experimental neurotoxicity. *Pathophysiology*, *26*(1), 21-29. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.12.002

Adibhatla, R. M., & Hatcher, J. F. (2010). Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, *12*(1), 125-169. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2668

Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C. G., Reed, J. D., & Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-κB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*, *113*(3), 423-433. https://doi.org/10.1002/ijc.20587

Agashiwala, R. M., Louis, E. D., Hof, P. R., & Perl, D. P. (2008). A novel approach to non-biased systematic random sampling: A stereologic estimate of Purkinje cells in the human cerebellum. *Brain Research*, *1236*, 73-78. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.119

Alami, M., Boumezough, K., Khalil, A., Ramchoun, M., Boulbaroud, S., Fulop, T., Morvaridzadeh, M., & Berrougui, H. (2023). The Modulatory Bioeffects of Pomegranate (Punica granatum L.) Polyphenols on Metabolic Disorders: Understanding Their Preventive Role against Metabolic Syndrome. *Nutrients*, *15*(23), 4879. https://doi.org/10.3390/nu15234879

Al-Dujaili, E. A. S., Casey, C., & Stockton, A. (2022). Antioxidant Properties and Beneficial Cardiovascular Effects of a Natural Extract of Pomegranate in Healthy Volunteers: A Randomized Preliminary Single-Blind Controlled Study. *Antioxidants*, *11*(11), 2124. https://doi.org/10.3390/antiox11112124

Aleksandrova, S., Alexova, R., Dragomanova, S., Kalfin, R., Nicoletti, F., Fagone, P., Petralia, M. C., Mangano, K., & Tancheva, L. (2023). Preventive and Therapeutic Effects of Punica granatum L. Polyphenols in Neurological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 1856. https://doi.org/10.3390/ijms24031856

Alvarado, C., Álvarez, P., Jiménez, L., & De La Fuente, M. (2006). Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Developmental & Comparative Immunology*, *30*(12), 1168-1180. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.03.004

Andersen, B. B., Gundersen, H. J. G., & Pakkenberg, B. (2003). Aging of the human cerebellum: A stereological study. *Journal of Comparative Neurology*, *466*(3), 356-365. https://doi.org/10.1002/cne.10884

Apóstolo, J., Cooke, R., Bobrowicz-Campos, E., Santana, S., Marcucci, M., Cano, A., Vollenbroek-Hutten, M., Germini, F., D'Avanzo, B., Gwyther, H., & Holland, C. (2018). Effectiveness of interventions to prevent pre-frailty and frailty progression in older adults: A systematic review. *JBI Database*

of Systematic Reviews and Implementation Reports, *16*(1), 140-232. https://doi.org/10.11124/JBISRIR-2017-003382

Arking, R., & Dudas, S. P. (1989). Review of Genetic Investigations into the Aging Processes of Drosophila. *Journal of the American Geriatrics Society*, *37*(8), 757-773. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1989.tb02240.x

Arlotta, C., Toscano, V., Genovese, C., Calderaro, P., Puglia, G. D., & Raccuia, S. A. (2022). Nutraceutical Content and Genetic Diversity Share a Common Pattern in New Pomegranate Genotypes. *Molecules*, *27*(2), 389. https://doi.org/10.3390/molecules27020389

Aron, L., Zullo, J., & Yankner, B. A. (2022). The adaptive aging brain. *Current Opinion in Neurobiology*, *72*, 91-100. https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.09.009

Asgary, S., Karimi, R., Pour, P. M., Heydarpour, F., Mostafaei, S., Farzaei, M. H., Moradi, S., & Aneva, I. Y. (2023). Is Consumption of Pomegranate Supplementation Effective on Oxidative Stress Biomarkers Including MDA, ox-LDL, POX 1, GPX, TAC, and TBRAS? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Current Problems in Cardiology*, *48*(8), 101198. https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2022.101198

Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E–deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(5), 1062-1076. https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1062

Bancroft, J. D., & Gamble, M. (Eds.). (2008). *Theory and practice of histological techniques* (6th ed). Churchill Livingstone/Elsevier.

Banihani, S. A., Fashtaky, R. A., Makahleh, S. M., El-Akawi, Z. J., Khabour, O. F., & Saadeh, N. A. (2020). Effect of fresh pomegranate juice on the level of melatonin, insulin, and fasting serum glucose in healthy individuals and people with impaired fasting glucose. *Food Science & Nutrition*, *8*(1), 567-574. https://doi.org/10.1002/fsn3.1344

Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, *7*(1), 16878. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5

Barati Boldaji, R., Akhlaghi, M., Sagheb, M. M., & Esmaeilinezhad, Z. (2020). Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: A randomized crossover trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(2), 846-854. https://doi.org/10.1002/jsfa.10096

Barghchi, H., Milkarizi, N., Belyani, S., Norouzian Ostad, A., Askari, V. R., Rajabzadeh, F., Goshayeshi, L., Ghelichi Kheyrabadi, S. Y., Razavidarmian, M., Dehnavi, Z., Sobhani, S. R., & Nematy, M. (2023). Pomegranate (Punica granatum L.) peel extract ameliorates metabolic syndrome risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized double-blind clinical trial. *Nutrition Journal*, *22*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s12937-023-00869-2

Barth, A. M. I., & Mody, I. (2014). Novel test of motor and other dysfunctions in mouse neurological disease models. *Journal of Neuroscience Methods*, *221*, 151-158. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.10.004

Bartke, A. (1998). Growth Hormone and Aging. *Endocrine*, *8*(2), 103-108. https://doi.org/10.1385/ENDO:8:2:103

Bartke, A., Brown-Borg, H. M., Bode, A. M., Carlson, J., Hunter, W. S., & Bronson, R. T. (1998). Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Experimental Gerontology*, *33*(7-8), 675-687. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(98)00032-1

Bartolomucci, A., Kane, A. E., Gaydosh, L., Razzoli, M., McCoy, B. M., Ehninger, D., Chen, B. H., Howlett, S. E., & Snyder-Mackler, N. (2024). Animal Models Relevant for Geroscience: Current Trends and Future Perspectives in Biomarkers, and Measures of Biological Aging. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *79*(9), glae135. https://doi.org/10.1093/gerona/glae135

Barzilai, N., Huffman, D. M., Muzumdar, R. H., & Bartke, A. (2012). The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. *Diabetes*, *61*(6), 1315-1322. https://doi.org/10.2337/db11-1300

Bastida, J. A. G., ÁngelesÁvila-Gálvez, M., Espín, J. C., & Sarrías, A. G. (2021). *Human studies carried out with pomegranate-based products (juice and extract).* [Dataset]. Zenodo. https://doi.org/10.5281/ZENODO.7261732

Bautmans, I., Knoop, V., Amuthavalli Thiyagarajan, J., Maier, A. B., Beard, J. R., Freiberger, E., Belsky, D., Aubertin-Leheudre, M., Mikton, C., Cesari, M., Sumi, Y., Diaz, T., & Banerjee, A. (2022). WHO working definition of vitality capacity for healthy longevity monitoring. *The Lancet Healthy Longevity*, *3*(11), e789-e796. https://doi.org/10.1016/S2666-7568(22)00200-8

Belyani, S., Kazeminasab, F., Niazi, M., Bagheri, R., Hesari, M. M., Rosenkranz, S. K., Camera, D. M., & Dutheil, F. (2025). The Effects of Pomegranate Supplementation on Markers of Exercise-Induced Muscle Damage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Developments in Nutrition*, *9*(2), 104560. https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2025.104560

Ben Nasr, C., Ayed, N., & Metche, M. (1996). Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Zeitschrift F*[?]*r Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, *203*(4), 374-378. https://doi.org/10.1007/BF01231077

Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *79*, 66-86. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030

Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, *350*(6265), 1193-1198. https://doi.org/10.1126/science.aab3389

Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*, *12*(10), 1133-1138. https://doi.org/10.1038/nm1006-1133

Boissier, J. R., & Simon, P. (1962). [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. *Therapie*, *17*, 1225-1232.

Borras, C., Abdelaziz, K. M., Gambini, J., Serna, E., Inglés, M., De La Fuente, M., Garcia, I., Matheu, A., Sanchís, P., Belenguer, A., Errigo, A., Avellana, J.-A., Barettino, A., Lloret-Fernández, C., Flames, N., Pes, G., Rodriguez-Mañas, L., & Viña, J. (2016). Human exceptional longevity: Transcriptome from centenarians is distinct from septuagenarians and reveals a role of Bcl-xL in successful aging. *Aging*, *8*(12), 3185-3208. https://doi.org/10.18632/aging.101078

Božović, M., Tadić, V., Oliva, A., Mladenović, M., Astolfi, R., & Ragno, R. (2026). Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Punica granatum L. Fruit Extracts. *Molecules*, *31*(2), 334. https://doi.org/10.3390/molecules31020334

Bratic, I., & Trifunovic, A. (2010). Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(6-7), 961-967. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.01.004

Brenner, S. (1974). THE GENETICS OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics*, *77*(1), 71-94. https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71

Breton, P. (1821). On the Efficacy of the Bark of the Pomegranate Tree, in Cases of Tænia. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *MCT-11*(P2), 301-309. https://doi.org/10.1177/09595287210110P209

Brommage, R. (2003). Validation and calibration of DEXA body composition in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *285*(3), E454-E459. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00470.2002

Brown, G. R., & Nemes, C. (2008). The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia? *Behavioural Processes*, *78*(3), 442-448. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2008.02.019

Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(1), 30-40. https://doi.org/10.1038/nrn1809

Carson, F. L., & Cappellano, C. H. (2015). *Histotechnology: A self instructional text* (4th ed). American society for clinical pathology.

Cerd�, B., Llorach, R., Cer�n, J. J., Esp�n, J. C., & Tom�s-Barber�n, F. A. (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *European Journal of Nutrition*, *42*(1), 18-28. https://doi.org/10.1007/s00394-003-0396-4

Cerminara, N. L., Lang, E. J., Sillitoe, R. V., & Apps, R. (2015). Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(2), 79-93. https://doi.org/10.1038/nrn3886

Childs, R., Gamage, R., Münch, G., & Gyengesi, E. (2021). The effect of aging and chronic microglia activation on the morphology and numbers of the cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience Letters*, *751*, 135807. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135807

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*(2), 581-585. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83

Clegg, A., & Young, J. (2011). The Frailty Syndrome. *Clinical Medicine*, *11*(1), 72-75. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.11-1-72

Cordiano, R., Gammeri, L., Di Salvo, E., Gangemi, S., & Minciullo, P. L. (2024). Pomegranate (Punica granatum L.) Extract Effects on Inflammaging. *Molecules*, *29*(17), 4174. https://doi.org/10.3390/molecules29174174

Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M., Writing Group

for the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2), and the Extended Group for EWGSOP2, Bautmans, I., Baeyens, J.-P., … Schols, J. (2019). Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, *48*(1), 16-31. https://doi.org/10.1093/ageing/afy169

Cummings, B. J., Engesser-Cesar, C., Cadena, G., & Anderson, A. J. (2007). Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behavioural Brain Research*, *177*(2), 232-241. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.042

Da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Research Reviews*, *29*, 90-112. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005

D'Amico, D., Andreux, P. A., Valdés, P., Singh, A., Rinsch, C., & Auwerx, J. (2021). Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends in Molecular Medicine*, *27*(7), 687-699. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.009

De Haan, G., & Lazare, S. S. (2018). Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*, *131*(5), 479-487. https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-746412

De Magalhães, J. P. (2025). An overview of contemporary theories of ageing. *Nature Cell Biology*, *27*(7), 1074-1082. https://doi.org/10.1038/s41556-025-01698-7

Deacon, R. M. J. (2006). Burrowing in rodents: A sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature Protocols*, *1*(1), 118-121. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19

Deacon, R. M. J. (2009). Burrowing: A sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behavioural Brain Research*, *200*(1), 128-133. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.007

Deng, J., Dai, Y., Tang, H., & Pang, S. (2020). SKN-1 Is a Negative Regulator of DAF-16 and Somatic Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *G3*

Genes|Genomes|Genetics, *10*(5), 1707-1712. https://doi.org/10.1534/g3.120.401203

Dent, E., Martin, F. C., Bergman, H., Woo, J., Romero-Ortuno, R., & Walston, J. D. (2019). Management of frailty: Opportunities, challenges, and future directions. *The Lancet*, *394*(10206), 1376-1386. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31785-4

Domowicz, M. S., Chan, W.-C., Claudio-Vázquez, P., Gonzalez, T., & Schwartz, N. B. (2021). Brain transcriptome analysis of a CLN2 mouse model as a function of disease progression. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 262. https://doi.org/10.1186/s12974-021-02302-z

Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. En *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 421-431). Elsevier. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I

Emami Kazemabad, M. J., Asgari Toni, S., Tizro, N., Dadkhah, P. A., Amani, H., Akhavan Rezayat, S., Sheikh, Z., Mohammadi, M., Alijanzadeh, D., Alimohammadi, F., Shahrokhi, M., Erabi, G., Noroozi, M., Karimi, M. A., Honari, S., & Deravi, N. (2022). Pharmacotherapeutic potential of pomegranate in age-related neurological disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*, 955735. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.955735

Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety—Pitfalls and disappointments. *Physiology & Behavior*, *135*, 55-71. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032

Espín, J. C., González-Sarrías, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 82-93. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033

Estrada-Luna, D., Carreón-Torres, E., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Dorantes-Morales, A., Luna-Luna, M., Vargas-Barrón, J., Mejía, A. M., Fragoso, J. M., Carvajal-Aguilera, K., García-Trejo, J. J., Vargas-Alarcón, G., & Pérez-Méndez, Ó. (2019). Microencapsulated Pomegranate Reverts High-Density Lipoprotein (HDL)-Induced Endothelial Dysfunction and

Reduces Postprandial Triglyceridemia in Women with Acute Coronary Syndrome. *Nutrients*, *11*(8), 1710. https://doi.org/10.3390/nu11081710

European Commission. Directorate General for Economic and Financial Affairs. (2024). *2024 ageing report: Economic & budgetary projections for the EU Member States (2022 2070).* Publications Office. https://doi.org/10.2765/022983

Fang, E. F., Lautrup, S., Hou, Y., Demarest, T. G., Croteau, D. L., Mattson, M. P., & Bohr, V. A. (2017). NAD + in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. *Trends in Molecular Medicine*, *23*(10), 899-916. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.08.001

Fields, E., Rogers, B. C., Leung, T. C. S., Huang, A., Kern, M., Kontowicz, N., Dolin, H., & Watt, A. J. (2026). Cerebellar Purkinje cell firing reduction contributes to aging-related declining motor coordination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *123*(2), e2525795122. https://doi.org/10.1073/pnas.2525795122

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*(6809), 239-247. https://doi.org/10.1038/35041687

Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell*, *161*(1), 106-118. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.020

Foreman, J. E., Lionikas, A., Lang, D. H., Gyekis, J. P., Krishnan, M., Sharkey, N. A., Gerhard, G. S., Grant, M. D., Vogler, G. P., Mack, H. A., Stout, J. T., Griffith, J. W., Lakoski, J. M., Hofer, S. M., McClearn, G. E., Vandenbergh, D. J., & Blizard, D. A. (2009). Genetic architecture for hole-board behaviors across substantial time intervals in young, middle-aged and old mice. *Genes, Brain and Behavior*, *8*(7), 714-727. https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00516.x

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *33*(8), 845-853. https://doi.org/10.1177/33.8.3894502

Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *908*(1), 244-254. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x

Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *69*(Suppl 1), S4-S9. https://doi.org/10.1093/gerona/glu057

Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W. J., Burke, G., & McBurnie, M. A. (2001). Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *56*(3), M146-M157. https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.M146

Fulop, T., Witkowski, J. M., Pawelec, G., Alan, C., & Larbi, A. (2014). On the Immunological Theory of Aging. En L. Robert & T. Fulop (Eds.), *Interdisciplinary Topics in Gerontology and Geriatrics* (Vol. 39, pp. 163-176). S. Karger AG. https://doi.org/10.1159/000358904

Fuster-Muñoz, E., Roche, E., Funes, L., Martínez-Peinado, P., Sempere, J. M., & Vicente-Salar, N. (2016). Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. *Nutrition*, *32*(5), 539-545. https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.11.002

Ge, X., Cho, A., Ciol, M. A., Pettan-Brewer, C., Snyder, J., Rabinovitch, P., & Ladiges, W. (2016). Grip strength is potentially an early indicator of age-related decline in mice. *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*, *6*(1), 32981. https://doi.org/10.3402/pba.v6.32981

Geiszler, P. C., Barron, M. R., & Pardon, M.-C. (2016a). Impaired burrowing is the most prominent behavioral deficit of aging htau mice. *Neuroscience*, *329*, 98-111. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.004

Geiszler, P. C., Barron, M. R., & Pardon, M.-C. (2016b). Impaired burrowing is the most prominent behavioral deficit of aging htau mice. *Neuroscience*, *329*, 98-111. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.004

Gianfredi, V., Nucci, D., Pennisi, F., Maggi, S., Veronese, N., & Soysal, P. (2025). Aging, longevity, and healthy aging: The public health approach. *Aging Clinical and Experimental Research*, *37*(1), 125. https://doi.org/10.1007/s40520-025-03021-8

Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *65*(2-3), 45-80. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003

Gomez-Cabrera, M. C., Garcia-Valles, R., Rodriguez-Mañas, L., Garcia-Garcia, F. J., Olaso-Gonzalez, G., Salvador-Pascual, A., Tarazona-Santabalbina, F. J., & Viña, J. (2017). A New Frailty Score for Experimental Animals Based on the Clinical Phenotype: Inactivity as a Model of Frailty. *The Journals of Gerontology: Series A*, *72*(7), 885-891. https://doi.org/10.1093/gerona/glw337

Graber, T. G., Ferguson-Stegall, L., Kim, J.-H., & Thompson, L. V. (2013). C57BL/6 Neuromuscular Healthspan Scoring System. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *68*(11), 1326-1336. https://doi.org/10.1093/gerona/glt032

Grabež, M., Škrbić, R., Stojiljković, M. P., Rudić-Grujić, V., Paunović, M., Arsić, A., Petrović, S., Vučić, V., Mirjanić-Azarić, B., Šavikin, K., Menković, N., Janković, T., & Vasiljević, N. (2020). Beneficial effects of pomegranate peel extract on plasma lipid profile, fatty acids levels and blood pressure in patients with diabetes mellitus type-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103692. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103692

Guo, X., Pei, J., Ma, Y., Cui, Y., Guo, J., Wei, Y., & Han, L. (2023). Cognitive Frailty as a Predictor of Future Falls in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Medical Directors Association*, *24*(1), 38-47. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2022.10.011

Haghighian, M. K., Rafraf, M., Moghaddam, A., Hemmati, S., Jafarabadi, M. A., & Gargari, B. P. (2016). Pomegranate (Punica granatum L.) peel hydro alcoholic extract ameliorates cardiovascular risk factors in obese women with dyslipidemia: A double blind, randomized, placebo controlled pilot study. *European Journal of Integrative Medicine*, *8*(5), 676-682. https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.06.010

Hahm, J.-H., Kim, S., DiLoreto, R., Shi, C., Lee, S.-J. V., Murphy, C. T., & Nam, H. G. (2015). C. elegans maximum velocity correlates with healthspan and is maintained in worms with an insulin receptor mutation. *Nature Communications*, *6*(1), 8919. https://doi.org/10.1038/ncomms9919

Hamczyk, M. R., Nevado, R. M., Barettino, A., Fuster, V., & Andrés, V. (2020). Biological Versus Chronological Aging. *Journal of the American College of Cardiology*, *75*(8), 919-930. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.11.062

Hanlon, P., Wightman, H., Politis, M., Kirkpatrick, S., Jones, C., Andrew, M. K., Vetrano, D. L., Dent, E., & Hoogendijk, E. O. (2024). The relationship between frailty and social vulnerability: A systematic review. *The Lancet Healthy Longevity*, *5*(3), e214-e226. https://doi.org/10.1016/S2666-7568(23)00263-5

Harel, I., Benayoun, B. A., Machado, B., Singh, P. P., Hu, C.-K., Pech, M. F., Valenzano, D. R., Zhang, E., Sharp, S. C., Artandi, S. E., & Brunet, A. (2015). A Platform for Rapid Exploration of Aging and Diseases in a Naturally Short-Lived Vertebrate. *Cell*, *160*(5), 1013-1026. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.038

Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, *11*(3), 298-300. https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298

Hayashi, K., Furuya, A., Sakamaki, Y., Akagi, T., Shinoda, Y., Sadakata, T., Hashikawa, T., Shimizu, K., Minami, H., Sano, Y., Nakayama, M., & Furuichi, T. (2017). The brain-specific RasGEF very-KIND is required for normal dendritic growth in cerebellar granule cells and proper motor coordination. *PLOS ONE*, *12*(3), e0173175. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173175

Hayflick, L. (2007). Biological Aging Is No Longer an Unsolved Problem. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1100*(1), 1-13. https://doi.org/10.1196/annals.1395.001

Hazeldine, J., & Lord, J. M. (2015). Innate immunesenescence: Underlying mechanisms and clinical relevance. *Biogerontology*, *16*(2), 187-201. https://doi.org/10.1007/s10522-014-9514-3

Hennekam, R. C. M. (2020). The external phenotype of aging. *European Journal of Medical Genetics*, *63*(11), 103995. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103995

Herndon, L. A., Schmeissner, P. J., Dudaronek, J. M., Brown, P. A., Listner, K. M., Sakano, Y., Paupard, M. C., Hall, D. H., & Driscoll, M. (2002). Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing C. elegans. *Nature*, *419*(6909), 808-814. https://doi.org/10.1038/nature01135

Hicks, C., Pliner, E. M., Lord, S. R., & Sturnieks, D. L. (2021). Ladder Use in Older People: Type, Frequency, Tasks and Predictors of Risk Behaviours. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(18), 9799. https://doi.org/10.3390/ijerph18189799

Holmes, A., Wrenn, C. C., Harris, A. P., Thayer, K. E., & Crawley, J. N. (2002). Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain and Behavior*, *1*(1), 55-69. https://doi.org/10.1046/j.1601-1848.2001.00005.x

Hoogendijk, E. O., Afilalo, J., Ensrud, K. E., Kowal, P., Onder, G., & Fried, L. P. (2019). Frailty: Implications for clinical practice and public health. *The Lancet*, *394*(10206), 1365-1375. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31786-6

Hornberger Jr., T. A., & Farrar, R. P. (2004). Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Canadian Journal of Applied Physiology*, *29*(1), 16-31. https://doi.org/10.1139/h04-002

Hosseini, B., Saedisomeolia, A., Wood, L. G., Yaseri, M., & Tavasoli, S. (2016). Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, *22*, 44-50. https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2015.12.003

Howlett, S. E., Rutenberg, A. D., & Rockwood, K. (2021). The degree of frailty as a translational measure of health in aging. *Nature Aging*, *1*(8), 651-665. https://doi.org/10.1038/s43587-021-00099-3

Huffman, D. M., Justice, J. N., Stout, M. B., Kirkland, J. L., Barzilai, N., & Austad, S. N. (2016). Evaluating Health Span in Preclinical Models of Aging and Disease: Guidelines, Challenges, and Opportunities for Geroscience. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *71*(11), 1395-1406. https://doi.org/10.1093/gerona/glw106

Jávega, B., Herrera, G., & O'Connor, J.-E. (2022). Flow Cytometric Analysis of Oxidative Stress in Escherichia coli B Strains Deficient in Genes of the Antioxidant Defence. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12), 6537. https://doi.org/10.3390/ijms23126537

Jirkof, P. (2014a). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, *234*, 139-146. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001

Jirkof, P. (2014b). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, *234*, 139-146. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001

Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(9-10), 1865-1879. https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865

Jung, S., Ahn, N., Kim, S., Byun, J., Joo, Y., Kim, S., Jung, Y., Park, S., Hwang, I., & Kim, K. (2015). The effect of ladder-climbing exercise on atrophy/hypertrophy-related myokine expression in middle-aged male Wistar rats. *The Journal of Physiological Sciences*, *65*(6), 515-521. https://doi.org/10.1007/s12576-015-0388-1

Junnila, R. K., List, E. O., Berryman, D. E., Murrey, J. W., & Kopchick, J. J. (2013). The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nature Reviews Endocrinology*, *9*(6), 366-376. https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.67

Kellogg, C. M., Pham, K., Machalinski, A. H., Porter, H. L., Blankenship, H. E., Tooley, K. B., Stout, M. B., Rice, H. C., Sharpe, A. L., Beckstead, M. J., Chucair-Elliott, A. J., Ocañas, S. R., & Freeman, W. M. (2023). Microglial MHC-I induction with aging and Alzheimer's is conserved in mouse models and humans. *GeroScience*, *45*(5), 3019-3043. https://doi.org/10.1007/s11357-023-00859-6

Kennard, M. R., Nandi, M., Chapple, S., & King, A. J. (2022). The glucose tolerance test in mice: Sex, drugs and protocol. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *24*(11), 2241-2252. https://doi.org/10.1111/dom.14811

Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, *464*(7288), 504-512. https://doi.org/10.1038/nature08980

Keshavarz, M., Xie, K., Bano, D., & Ehninger, D. (2023). Aging – What it is and how to measure it. *Mechanisms of Ageing and Development*, *213*, 111837. https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111837

Kim, J. H., Kwack, M. H., & Lee, W. J. (2024). Effects of antioxidants on skin hydration, inflammatory cytokines, and keratinocyte differentiation markers in a PM_{10} -exposed skin barrier–disrupted mouse model. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *38*, 03946320241303860. https://doi.org/10.1177/03946320241303860

Kim, K. Y., Shin, K. Y., & Chang, K.-A. (2023). GFAP as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells*, *12*(9), 1309. https://doi.org/10.3390/cells12091309

Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*, *120*(4), 437-447. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027

Klass, M., & Hirsh, D. (1976). Non-ageing developmental variant of Caenorhabditis elegans. *Nature*, *260*(5551), 523-525. https://doi.org/10.1038/260523a0

Kozakiewicz, M., Kornatowski, M., Krzywińska, O., & Kędziora-Kornatowska, K. (2019). Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people. *Clinical Interventions in Aging*, *Volume 14*, 763-771. https://doi.org/10.2147/CIA.S201250

Lamberty, Y., & Gower, A. J. (1992). Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from middle to old age. *Physiology & Behavior*, *51*(1), 81-88. https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90206-H

Langley, P. (2000). Why a pomegranate? *BMJ*, *321*(7269), 1153-1154. https://doi.org/10.1136/bmj.321.7269.1153

Lapenna, D. (2023). Glutathione and glutathione-dependent enzymes: From biochemistry to gerontology and successful aging. *Ageing Research Reviews*, *92*, 102066. https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102066

Lei, M., Wu, J., Tan, Y., Shi, Y., Yang, W., Tu, H., & Tan, W. (2024). β-asarone protects against age-related motor decline via activation of SKN-1/Nrf2 and subsequent induction of GST-4. *Pharmacological Research*, *209*, 107450. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107450

Lien, E. C., Vu, N., Westermark, A. M., Danai, L. V., Lau, A. N., Gültekin, Y., Kukurugya, M. A., Bennett, B. D., & Vander Heiden, M. G. (2025). Effects of Aging on Glucose and Lipid Metabolism in Mice. *Aging Cell*, *24*(4), e14462. https://doi.org/10.1111/acel.14462

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, *Volume 13*, 757-772. https://doi.org/10.2147/CIA.S158513

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, *362*(6422), 709-715. https://doi.org/10.1038/362709a0

Lints, F. A. (1989). The Rate of Living Theory Revisited. *Gerontology*, *35*(1), 36-57. https://doi.org/10.1159/000212998

Liu, C., Wang, N., Zhang, Y.-Y., Qu, H., Liu, L.-X., Zhang, L.-H., & Liu, Y.-G. (2025). Pomegranate: Historical origins, nutritional composition, health functions and processing development research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *65*(33), 8447-8469. https://doi.org/10.1080/10408398.2025.2500676

Liu, H., Graber, T. G., Ferguson-Stegall, L., & Thompson, L. V. (2014). Clinically Relevant Frailty Index for Mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *69*(12), 1485-1491. https://doi.org/10.1093/gerona/glt188

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Loecker, C., Schmaderer, M., & Zimmerman, L. (2021). Frailty in Young and Middle-Aged Adults: An Integrative Review. *The Journal of Frailty & Aging*, *10*(4), 327-333. https://doi.org/10.14283/jfa.2021.14

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, *186*(2), 243-278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.

Lowsky, D. J., Olshansky, S. J., Bhattacharya, J., & Goldman, D. P. (2014). Heterogeneity in Healthy Aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *69*(6), 640-649. https://doi.org/10.1093/gerona/glt162

Marques-Aleixo, I., Santos-Alves, E., Balça, M. M., Rizo-Roca, D., Moreira, P. I., Oliveira, P. J., Magalhães, J., & Ascensão, A. (2015). Physical exercise

improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto(mito)phagy markers. *Neuroscience*, *301*, 480-495. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.027

Martinez De Toda, I., Garrido, A., Vida, C., Gomez-Cabrera, M. C., Viña, J., & De La Fuente, M. (2018). Frailty Quantified by the "Valencia Score" as a Potential Predictor of Lifespan in Mice. *The Journals of Gerontology: Series A*, *73*(10), 1323-1329. https://doi.org/10.1093/gerona/gly064

Martínez-Angulo, P., Muñoz-Mora, M., Rich-Ruiz, M., Ventura-Puertos, P. E., Cantón-Habas, V., & López-Quero, S. (2023). «With your age, what do you expect?»: Ageism and healthcare of older adults in Spain. *Geriatric Nursing*, *51*, 84-94. https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2023.02.020

Massett, M. P., Matejka, C., & Kim, H. (2021). Systematic Review and Meta-Analysis of Endurance Exercise Training Protocols for Mice. *Frontiers in Physiology*, *12*, 782695. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.782695

Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism*, *27*(6), 1176-1199. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011

Mc Auley, M. T. (2025). The evolution of ageing: Classic theories and emerging ideas. *Biogerontology*, *26*(1), 6. https://doi.org/10.1007/s10522-024-10143-5

Melgarejo-Sánchez, P., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J. J., Hernández, F., Legua, P., & Melgarejo, P. (2021). Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, *8*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s40643-020-00351-5

Mihaylova, R., Elincheva, V., Momekov, G., & Simeonova, R. (2025). Unlocking the Therapeutic Potential of Ellagitannins: A Comprehensive Review of Key Representatives. *Molecules*, *30*(22), 4328. https://doi.org/10.3390/molecules30224328

Miller, S. L., & Wolfe, R. R. (2008). The danger of weight loss in the elderly. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, *12*(7), 487-491. https://doi.org/10.1007/BF02982710

Milman, S., Huffman, D. M., & Barzilai, N. (2016). The Somatotropic Axis in Human Aging: Framework for the Current State of Knowledge and Future Research. *Cell Metabolism*, *23*(6), 980-989. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.014

Modig, K., Rau, R., & Ahlbom, A. (2020). Life expectancy: What does it measure? *BMJ Open*, *10*(7), e035932. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035932

Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Bălan, A., Dima, L., Toma, S. I., Bîgiu, N. F., & Blidaru, A. (2021). Pharmacological and Therapeutic Properties of Punica granatum Phytochemicals: Possible Roles in Breast Cancer. *Molecules*, *26*(4), 1054. https://doi.org/10.3390/molecules26041054

Moro, C., & Magnan, C. (2025). Revisited guidelines for metabolic tolerance tests in mice. *Lab Animal*, *54*(1), 16-23. https://doi.org/10.1038/s41684-024-01473-5

Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(4), 240-250. https://doi.org/10.1038/nrn3200

Muñoz-Redondo, E., Morgado-Pérez, A., Pérez-Sáez, M. J., Pascual, J., Tejero-Sánchez, M., Curbelo, Y. G., Terradellas-Fernández, M., Meza-Valderrama, D., Vázquez-Ibar, O., Annweiler, C., Sánchez-Rodríguez, D., & Marco, E. (2023). New perspectives on frailty in light of the Global Leadership Initiative on Malnutrition, the Global Leadership Initiative on Sarcopenia, and the WHO's concept of intrinsic capacity: A narrative review. *Maturitas*, *177*, 107799. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2023.107799

Nagy, T. R., & Clair, A. (2000). Precision and Accuracy of Dual-Energy X-ray Absorptiometry for Determining in Vivo Body Composition of Mice. *Obesity Research*, *8*(5), 392-398. https://doi.org/10.1038/oby.2000.47

Nair, A., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, *7*(2), 27. https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703

Naomi, R., Yazid, M. D., Teoh, S. H., Balan, S. S., Shariff, H., Kumar, J., Bahari, H., & Embong, H. (2023). Dietary Polyphenols as a Protection against Cognitive Decline: Evidence from Animal Experiments; Mechanisms and Limitations. *Antioxidants*, *12*(5), 1054. https://doi.org/10.3390/antiox12051054

Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., & Finch, C. E. (1993). GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of Aging*, *14*(5), 421-429. https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90100-P

Nigon, V., & Dougherty, E. C. (1950). A DWARF MUTATION IN A NEMATODE. *Journal of Heredity*, *41*(4), 103-109. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106095

Nováková, L., & Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, *656*(1-2), 8-35. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004

Ogle, M. E., Segar, C. E., Sridhar, S., & Botchwey, E. A. (2016). Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(10), 1084-1097. https://doi.org/10.1177/1535370216650293

Oliveira, I. L. D., Domínguez-Rodríguez, G., Montero, L., Viganó, J., Cifuentes, A., Rostagno, M. A., & Ibáñez, E. (2024). Advanced Extraction Techniques Combined with Natural Deep Eutectic Solvents for Extracting Phenolic Compounds from Pomegranate (Punica granatum L.) Peels. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(18), 9992. https://doi.org/10.3390/ijms25189992

Orts Ríos, E., Quiles i Izquierdo, J., & Esteban Buedo, V. (2025). *Estrategia de envejecimiento activo de la Comunitat Valenciana = Estratègia*

d'envelliment actiu de la Comunitat Valenciana. Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat.

Palliyaguru, D. L., Vieira Ligo Teixeira, C., Duregon, E., Di Germanio, C., Alfaras, I., Mitchell, S. J., Navas-Enamorado, I., Shiroma, E. J., Studenski, S., Bernier, M., Camandola, S., Price, N. L., Ferrucci, L., & De Cabo, R. (2021a). Study of Longitudinal Aging in Mice: Presentation of Experimental Techniques. *The Journals of Gerontology: Series A*, *76*(4), 552-560. https://doi.org/10.1093/gerona/glaa285

Palliyaguru, D. L., Vieira Ligo Teixeira, C., Duregon, E., Di Germanio, C., Alfaras, I., Mitchell, S. J., Navas-Enamorado, I., Shiroma, E. J., Studenski, S., Bernier, M., Camandola, S., Price, N. L., Ferrucci, L., & De Cabo, R. (2021b). Study of Longitudinal Aging in Mice: Presentation of Experimental Techniques. *The Journals of Gerontology: Series A*, *76*(4), 552-560. https://doi.org/10.1093/gerona/glaa285

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e47. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41

Patel, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., & Soni, M. G. (2008). Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(8), 2728-2735. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.035

Pedro, P. F., Tsakmaki, A., & Bewick, G. A. (2020). The Glucose Tolerance Test in Mice. En A. J. F. King (Ed.), *Animal Models of Diabetes* (Vol. 2128, pp. 207-216). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0385-7_14

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149-167. https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7

Pliner, E. M., Sturnieks, D. L., & Lord, S. R. (2020). Individual factors that influence task performance on a straight ladder in older people.

Experimental Gerontology, *142*, 111127. https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111127

Potter, J. A., Hodgson, C. I., Broadhurst, M., Howell, L., Gilbert, J., Willems, M. E. T., & Perkins, I. C. (2020). Effects of New Zealand blackcurrant extract on sport climbing performance. *European Journal of Applied Physiology*, *120*(1), 67-75. https://doi.org/10.1007/s00421-019-04226-2

Prasanth, M. I., Brimson, J. M., Chuchawankul, S., Sukprasansap, M., & Tencomnao, T. (2019). Antiaging, Stress Resistance, and Neuroprotective Efficacies of *Cleistocalyx nervosum* var. *Paniala* Fruit Extracts Using *Caenorhabditis elegans* Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1-14. https://doi.org/10.1155/2019/7024785

Prolla, T. A. (2002). DNA Microarray Analysis of the Aging Brain. *Chemical Senses*, *27*(3), 299-306. https://doi.org/10.1093/chemse/27.3.299

Puchalt, J. C., Sánchez-Salmerón, A.-J., Martorell Guerola, P., & Genovés Martínez, S. (2019). Active backlight for automating visual monitoring: An analysis of a lighting control technique for Caenorhabditis elegans cultured on standard Petri plates. *PLOS ONE*, *14*(4), e0215548. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215548

Reed, T. T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(7), 1302-1319. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.027

Reinhart, R. M. G., & Nguyen, J. A. (2019). Working memory revived in older adults by synchronizing rhythmic brain circuits. *Nature Neuroscience*, *22*(5), 820-827. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0371-x

Rodríguez-Mañas, L., Féart, C., Mann, G., Viña, J., Chatterji, S., Chodzko-Zajko, W., Gonzalez-Colaço Harmand, M., Bergman, H., Carcaillon, L., Nicholson, C., Scuteri, A., Sinclair, A., Pelaez, M., Van Der Cammen, T., Beland, F., Bickenbach, J., Delamarche, P., Ferrucci, L., Fried, L. P., … Vega, E. (2013). Searching for an Operational Definition of Frailty: A Delphi Method Based Consensus Statement. The Frailty Operative Definition-

Consensus Conference Project. *The Journals of Gerontology: Series A*, *68*(1), 62-67. https://doi.org/10.1093/gerona/gls119

Rojanathammanee, L., Puig, K. L., & Combs, C. K. (2013). Pomegranate Polyphenols and Extract Inhibit Nuclear Factor of Activated T-Cell Activity and Microglial Activation In Vitro and in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. *The Journal of Nutrition*, *143*(5), 597-605. https://doi.org/10.3945/jn.112.169516

Ros, M. (2026). *La Comunitat Valenciana registra el mayor nivel de envejecimiento de su historia*. https://www.levante-emv.com/comunitat-valenciana/2026/01/24/comunitat-valenciana-registra-mayor-nivel-126011266.html

Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, *187*(2), 363-371. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.09.006

Rothe, G., Oser, A., & Valet, G. (1988). Dihydrorhodamine 123: A new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*, *75*(7), 354-355. https://doi.org/10.1007/BF00368326

Rudnicka, E., Napierała, P., Podfigurna, A., Męczekalski, B., Smolarczyk, R., & Grymowicz, M. (2020). The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing. *Maturitas*, *139*, 6-11. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.05.018

Ruiz-Grao, M. C., Sánchez-Jurado, P. M., Molina-Alarcón, M., Garrido-Miguel, M., Álvarez-Bueno, C., Alcantud-Córcoles, R., Andrés-Petrel, F., Avendaño-Céspedes, A., Gómez-Ballesteros, C., Sánchez-Flor- Alfaro, V., López-Bru, R., Roldán-García, B., Tabernero-Sahuquillo, M. T., Mas-Romero, M., García-Molina, R., Romero-Rizos, L., & Abizanda, P. (2022). Frailty, depression risk and 10-year hospitalization in older adults. The FRADEA study. *Geriatric Nursing*, *46*, 184-190. https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2022.05.015

Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-dit-Félix, A. A., Williams, E. G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., Aebischer, P., Sandi, C., Rinsch, C., & Auwerx, J. (2016). Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in C. elegans and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine*, *22*(8), 879-888. https://doi.org/10.1038/nm.4132

Sachs, J. D., Lafortune, G., Fuller, G., & Iablonovski, G. (2025). *SUSTAINABLE DEVELOPMENT REPORT 2025 Financing Sustainable Development to 2030 and Mid-Century*. Dublin University Press. https://doi.org/10.25546/111909

Sajdel-Sulkowska, E. M., Nguon, K., Sulkowski, Z. L., & Lipinski, B. (2007). Potential role of oxidative stress in mediating the effect of altered gravity on the developing rat cerebellum. *Advances in Space Research*, *40*(9), 1414-1420. https://doi.org/10.1016/j.asr.2007.08.004

Santilli, V., Bernetti, A., Mangone, M., & Paoloni, M. (2014). Clinical definition of sarcopenia. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism: The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, *11*(3), 177-180.

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(11), 1191-1212. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4

Schebb, N. H., Inceoglu, B., Rose, T., Wagner, K., & Hammock, B. D. (2011). Development of an ultra fast online-solid phase extraction (SPE) liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) based approach for the determination of drugs in pharmacokinetic studies. *Anal. Methods*, *3*(2), 420-428. https://doi.org/10.1039/C0AY00714E

Scott, A. J. (2021). The longevity economy. *The Lancet Healthy Longevity*, *2*(12), e828-e835. https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00250-6

Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*(6), 360-367. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.006

Serna, E., Verdú, D., Valls, A., Belenguer-Varea, Á., Tarazona-Santabalbina, F. J., Borrás, C., & Viña, J. (2024). Involvement of Aryl Hydrocarbon Receptor in Longevity and Healthspan: Insights from Humans, Mice, and C. elegans. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(18), 9943. https://doi.org/10.3390/ijms25189943

Shepherd, J. A., Ng, B. K., Sommer, M. J., & Heymsfield, S. B. (2017). Body composition by DXA. *Bone*, *104*, 101-105. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.06.010

Sheta, R., Bérard, M., Musiol, D., Martínez-Drudis, L., & Oueslati, A. (2024). Behavioral analysis of motor and non-motor impairment in rodent models of Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *16*, 1464706. https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1464706

Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., & Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain*, *9*(1), 11. https://doi.org/10.1186/s13041-016-0191-9

Siddarth, P., Li, Z., Miller, K. J., Ercoli, L. M., Merril, D. A., Henning, S. M., Heber, D., & Small, G. W. (2020). Randomized placebo-controlled study of the memory effects of pomegranate juice in middle-aged and older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *111*(1), 170-177. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz241

Smith, L. K., He, Y., Park, J.-S., Bieri, G., Snethlage, C. E., Lin, K., Gontier, G., Wabl, R., Plambeck, K. E., Udeochu, J., Wheatley, E. G., Bouchard, J., Eggel, A., Narasimha, R., Grant, J. L., Luo, J., Wyss-Coray, T., & Villeda, S. A. (2015). B2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nature Medicine*, *21*(8), 932-937. https://doi.org/10.1038/nm.3898

Sohrab, G., Roshan, H., Ebrahimof, S., Nikpayam, O., Sotoudeh, G., & Siasi, F. (2019). Effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A single-blind randomized clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, *29*, 30-35. https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.11.013

Spencer, C. C., Howell, C. E., Wright, A. R., & Promislow, D. E. L. (2003). Testing an 'aging gene' in long-lived *Drosophila* strains: Increased longevity depends on sex and genetic background. *Aging Cell*, *2*(2), 123-130. https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00044.x

Stadtman, E. R. (1992). Protein Oxidation and Aging. *Science*, *257*(5074), 1220-1224. https://doi.org/10.1126/science.1355616

Stiernagle, T. (2006). Maintenance of C. elegans. *WormBook*. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1

Sun, W., Yan, C., Frost, B., Wang, X., Hou, C., Zeng, M., Gao, H., Kang, Y., & Liu, J. (2016). Pomegranate extract decreases oxidative stress and alleviates mitochondrial impairment by activating AMPK-Nrf2 in hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Scientific Reports*, *6*(1), 34246. https://doi.org/10.1038/srep34246

Surmeier, D. J. (2007). Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, *6*(10), 933-938. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70246-6

Szilard, L. (1959). A Theory of Ageing. *Nature*, *184*(4691), 957-958. https://doi.org/10.1038/184957a0

Takeda, H., Tsuji, M., & Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, *350*(1), 21-29. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00223-4

Tan, S., Yu, C. Y., Sim, Z. W., Low, Z. S., Lee, B., See, F., Min, N., Gautam, A., Chu, J. J. H., Ng, K. W., & Wong, E. (2019). Pomegranate activates TFEB to

promote autophagy-lysosomal fitness and mitophagy. *Scientific Reports*, *9*(1), 727. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37400-1

Ten-Doménech, I., Solaz-García, Á., Lara-Cantón, I., Pinilla-Gonzalez, A., Parra-Llorca, A., Vento, M., Quintás, G., & Kuligowski, J. (2022). Direct Derivatization in Dried Blood Spots for Oxidized and Reduced Glutathione Quantification in Newborns. *Antioxidants*, *11*(6), 1165. https://doi.org/10.3390/antiox11061165

The C. elegans Sequencing Consortium*. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*, *282*(5396), 2012-2018. https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012

Thomas, C., Marcaletti, S., & Feige, J. N. (2011). Assessment of Spontaneous Locomotor and Running Activity in Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, *1*(1), 185-198. https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100170

Tissenbaum, H. A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate Reproduction & Development*, *59*(sup1), 59-63. https://doi.org/10.1080/07924259.2014.940470

Todorova, M. N., Savova, M. S., Mihaylova, L. V., & Georgiev, M. I. (2024). Punica granatum L. leaf extract enhances stress tolerance and promotes healthy longevity through HLH-30/TFEB, DAF16/FOXO, and SKN1/NRF2 crosstalk in Caenorhabditis elegans. *Phytomedicine*, *134*, 155971. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155971

Torregrosa-García, A., Ávila-Gandía, V., Luque-Rubia, A. J., Abellán-Ruiz, M. S., Querol-Calderón, M., & López-Román, F. J. (2019). Pomegranate Extract Improves Maximal Performance of Trained Cyclists after an Exhausting Endurance Trial: A Randomised Controlled Trial. *Nutrients*, *11*(4), 721. https://doi.org/10.3390/nu11040721

Tzekaki, E. E., Katsipis, G., Chatzikostopoulos, A., Koutoupa, A., Lavrentiadou, S. N., Tsolaki, M., & Pantazaki, A. A. (2025). Neuroprotective, Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of Greek Pomegranate Seed Oil on N2a

Neuroblastoma Cells and Mild Cognitive Impairment Patients. *Biology*, *14*(5), 548. https://doi.org/10.3390/biology14050548

Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., & Amir, R. (2007). Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(23), 9559-9570. https://doi.org/10.1021/jf071413n

UNITED NATIONS DEPARTMENT FOR ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. (2025). *WORLD POPULATION PROSPECTS 2024: Summary of results*. UNITED NATIONS.

Vachha, B. A., Massoud, T. F., & Huang, S. Y. (2022). Anatomy of the Cerebral Cortex, Lobes, and Cerebellum. *Neuroimaging Clinics of North America*, *32*(3), 463-473. https://doi.org/10.1016/j.nic.2022.04.008

Valenzuela, A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*, *48*(4), 301-309. https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90550-U

Vannella, K. M., & Wynn, T. A. (2017). Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annual Review of Physiology*, *79*(1), 593-617. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034356

Ventura, M. T., Casciaro, M., Gangemi, S., & Buquicchio, R. (2017). Immunosenescence in aging: Between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clinical and Molecular Allergy*, *15*(1), 21. https://doi.org/10.1186/s12948-017-0077-0

Vidal-Piñeiro, D., Sørensen, Ø., Strømstad, M., Amlien, I. K., Baaré, W., Bartrés-Faz, D., Brandmaier, A. M., Cattaneo, G., Düzel, S., Ghisletta, P., Henson, R. N., Kühn, S., Lindenberger, U., Mowinckel, A. M., Nyberg, L., Pascual-Leone, A., Roe, J. M., Solana-Sánchez, J., Solé-Padullés, C., … Fjell, A. M. (2025). Vulnerability to memory decline in aging revealed by a mega-analysis of structural brain change. *Nature Communications*, *16*(1), 11488. https://doi.org/10.1038/s41467-025-66354-y

Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, *2013*, 789764. https://doi.org/10.1155/2013/789764

Viña, J., Borrás, C., & Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life*, *59*(4-5), 249-254. https://doi.org/10.1080/15216540601178067

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(6), 635-654. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x

Voogd, J. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in Neurosciences*, *21*(9), 370-375. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01318-6

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, *2*(2), 322-328. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44

Walston, J., Buta, B., & Xue, Q.-L. (2018). Frailty Screening and Interventions. *Clinics in Geriatric Medicine*, *34*(1), 25-38. https://doi.org/10.1016/j.cger.2017.09.004

Wang, D., Yang, Y., Zou, X., Zhang, J., Zheng, Z., & Wang, Z. (2020). Antioxidant Apigenin Relieves Age-Related Muscle Atrophy by Inhibiting Oxidative Stress and Hyperactive Mitophagy and Apoptosis in Skeletal Muscle of Mice. *The Journals of Gerontology: Series A*, *75*(11), 2081-2088. https://doi.org/10.1093/gerona/glaa214

Wang, W., Long, P., He, M., Luo, T., Li, Y., Yang, L., Zhang, Y., & Wen, X. (2024). Pomegranate polyphenol punicalagin as a nutraceutical for mitigating mild cognitive impairment: An overview of beneficial properties. *European Journal of Pharmacology*, *977*, 176750. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176750

Wang, Y., He, Z., Long, C., Li, Y., Yuan, Y., & Huang, T. (2025). Systematic review and meta-analysis of antioxidants with or without exercise training

improving muscle condition in older adults. *Scientific Reports*, *15*(1), 34356. https://doi.org/10.1038/s41598-025-16917-2

Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(7), 995-1022. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.026

Wodrich, A. P. K., Scott, A. W., & Giniger, E. (2023). What do we mean by "aging"? Questions and perspectives revealed by studies in Drosophila. *Mechanisms of Ageing and Development*, *213*, 111839. https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111839

Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N., & Sunderman, F. W. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, *33*(2 Pt 1), 214-220.

Woodruff-Pak, D. S., Foy, M. R., Akopian, G. G., Lee, K. H., Zach, J., Nguyen, K. P. T., Comalli, D. M., Kennard, J. A., Agelan, A., & Thompson, R. F. (2010). Differential effects and rates of normal aging in cerebellum and hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(4), 1624-1629. https://doi.org/10.1073/pnas.0914207107

World Health Organization. (2016, diciembre 1). *WHO Clinical Consortium on Healthy Ageing Topic focus: Frailty and intrinsic capacity* [Report of consortium meeting]. https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/b8cc03c9-07e4-4bb1-ba21-3ccb0f030ec2/content

Xu, Q., Ou, X., & Li, J. (2022). The risk of falls among the aging population: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, *10*, 902599. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.902599

Xu, Y., Zhang, H., Jiao, X., Zhang, Y., Yin, G., Wang, C., Du, Z., Liang, M., Gao, X., Gu, Z., Jiang, Y., Du, B., & Bi, X. (2025). Dysregulations of C1QA, C1QB, C1QC and C5AR1 as candidate biomarkers of vascular dementia. *Npj Aging*, *11*(1), 42. https://doi.org/10.1038/s41514-025-00228-x

Yamada, H., Wakamori, S., Hirokane, T., Ikeuchi, K., & Matsumoto, S. (2018). Structural Revisions in Natural Ellagitannins. *Molecules*, *23*(8), 1901. https://doi.org/10.3390/molecules23081901

Yang, Z.-C., Lin, H., Jiang, G.-H., Chu, Y.-H., Gao, J.-H., Tong, Z.-J., & Wang, Z. (2023). Frailty Is a Risk Factor for Falls in the Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, *27*(6), 487-495. https://doi.org/10.1007/s12603-023-1935-8

Zanjani, H., Finch, C. E., Kemper, C., Atkinson, J., McKeel, D., Morris, J. C., & Price, J. L. (2005). Complement Activation in Very Early Alzheimer Disease: *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, *19*(2), 55-66. https://doi.org/10.1097/01.wad.0000165506.60370.94

Zhang, C., Zhu, Q., & Hua, T. (2010). Aging of cerebellar Purkinje cells. *Cell and Tissue Research*, *341*(3), 341-347. https://doi.org/10.1007/s00441-010-1016-2

Zhang, J., Velmeshev, D., Hashimoto, K., Huang, Y.-H., Hofmann, J. W., Shi, X., Chen, J., Leidal, A. M., Dishart, J. G., Cahill, M. K., Kelley, K. W., Liddelow, S. A., Seeley, W. W., Miller, B. L., Walther, T. C., Farese, R. V., Taylor, J. P., Ullian, E. M., Huang, B., … Huang, E. J. (2020). Neurotoxic microglia promote TDP-43 proteinopathy in progranulin deficiency. *Nature*, *588*(7838), 459-465. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2709-7

Zhao, Y., Zheng, Q., Hong, Y., Gao, Y., Hu, J., Lang, M., Zhang, H., Zhou, Y., Luo, H., Zhang, X., Sun, H., Yan, X.-X., Huang, T. Y., Wang, Y.-J., Xu, H., Liu, C., & Wang, X. (2023). B2-Microglobulin coaggregates with Aβ and contributes to amyloid pathology and cognitive deficits in Alzheimer's disease model mice. *Nature Neuroscience*, *26*(7), 1170-1184. https://doi.org/10.1038/s41593-023-01352-1

Zheng, J., Heber, D., Wang, M., Gao, C., Heymsfield, S. B., Martin, R. J., Greenway, F. L., Finley, J. W., Burton, J. H., Johnson, W. D., Enright, F. M., Keenan, M. J., & Li, Z. (2017). Pomegranate juice and extract extended lifespan and reduced intestinal fat deposition in Caenorhabditis elegans. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *87*(3-4), 149-158. https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000570

Zheng, Y., Liu, T., Luo, L., Li, F., Tang, C., Xu, C., Chen, C., Yang, L., Xiao, Y., Wang, Z., Yuan, Q., Zheng, M., Li, H., & Yang, J. (2025). Complement C4b as a key mediator of synaptic loss and cognitive decline in brain aging. *Molecular Therapy*, *33*(12), 6314-6331. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.09.005

ANEXOS

GENERALITAT VALENCIANA
Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica

Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca
Ciudad Administrativa 9 de Octubre
Calle de La Democracia, 77 - 46018 Valencia
www.gva.es

UNIÓN EUROPEA

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2021/VSC/PEA/0006

Vista la solicitud realizada en fecha **13/01/21** con nº reg. entrada **51252** por D/Dª. **Carlos Hermenegildo Caudevilla**, **Vicerrector de Investigación y Política Científica**, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

"Estudio del papel del receptor de hidrocarburos aromáticos en la prevención de la fragilidad mediante una intervención con un suplemento nutricional de extracto de granada."

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2021/VSC/PEA/0006** tipo **2,** de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de València-Estudio General**

Responsable del proyecto: **José Viña Ribes**

Establecimiento: **Animalario Unidad Central de Investigación (Fac. Medicina y Odontología) Valencia**

Necesidad de evaluación restrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmado por Antonio Quintana Martínez el 03/02/2021 16:00:05

GENERALITAT VALENCIANA