



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Caracterización de la actividad biológica de un extracto de granada (*Punica granatum*) en un modelo *in vivo* envejecido

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2025

Autor: Diego Cao Ortiz

Modalidad: Experimental

Tutores: Enrique Barraji3n Catal3n y Mar3a Dolores Herranz L3pez

Índice:

Resumen	2
Abstract:	4
1. Introducción:	5
a. Punica granatum:	5
i. Propiedades farmacológicas:	5
b. Obesidad:	8
c. Envejecimiento:	10
d. Obesidad, inflamación, estrés oxidativo y envejecimiento:	12
2. Objetivos:	16
3. Materiales y métodos:	17
a. Modelo animal:	17
b. Dieta:	17
c. El extracto:	18
d. Procedimiento experimental:	18
e. Análisis estadístico:	21
4. Resultados:	22
a. Peso:	22
b. Ingesta:	24
c. Colesterol total:	25
d. HDL:	26
e. Glucosa:	27
f. Triglicéridos:	28
5. Discusión:	30
6. Conclusiones:	34
Perspectivas futuras:	35
7. Bibliografía:	37
8. Agradecimientos:	39

Resumen

Introducción:

La granada (*Punica granatum*) es una fuente rica en compuestos bioactivos, entre los que destacan los taninos elágicos o elagitaninos, cuyo metabolismo por la microbiota intestinal da lugar a urolitinas, particularmente Urolitina A (UroA), con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y reguladoras del metabolismo.

Materiales y métodos:

Se realizó un estudio de la actividad biológica de un extracto fermentado de cáscara de granada en un modelo de ratones envejecidos de la cepa C57BL/6J, distribuidos en grupos según sexo, tipo de dieta (normal o alta en grasas) y tratamiento (extracto o placebo). La administración del extracto/placebo fue mediante sondaje oral. Durante el ensayo se evaluaron parámetros como peso corporal, ingesta alimentaria y perfiles bioquímicos (glucemia, colesterol total, HDL y triglicéridos).

Resultados:

Los resultados muestran que el extracto fue capaz de reducir el peso corporal en animales envejecidos con dieta alta en grasa sin afectar significativamente la ingesta, lo que sugiere un posible efecto metabólico directo. No obstante, no se observaron cambios significativos en los niveles de glucosa ni en los perfiles lipídicos atribuibles exclusivamente al tratamiento. El análisis estadístico también reveló que el sexo y la dieta son factores determinantes en las respuestas fisiológicas observadas.

Conclusiones:

El extracto de granada fermentado podría tener un efecto beneficioso sobre el peso corporal en condiciones de envejecimiento y obesidad, aunque se requieren estudios adicionales que profundicen en su mecanismo de acción a nivel molecular, especialmente mediante el análisis de biomarcadores relacionados con el envejecimiento, el estrés oxidativo y la inflamación.

Abstract:

Introduction:

Pomegranate (*Punica granatum*) is a rich source of bioactive compounds, particularly ellagitannins, which are metabolized by the gut microbiota into urolithins especially Urolithin A (UroA), with antioxidant, anti-inflammatory, and metabolic regulatory properties.

Methods:

A study was conducted on the biological activity of a fermented pomegranate peel extract in an aged mouse model of the C57BL/6J strain, divided into groups based on sex, diet type (normal or high-fat), and treatment (extract or placebo). The extract/placebo was administered via oral gavage. During the trial, parameters such as body weight, food intake, and biochemical profiles (blood glucose, total cholesterol, HDL, and triglycerides) were evaluated.

Results:

The results show that the extract was able to reduce body weight in aged animals on a high-fat diet without significantly affecting food intake, suggesting a possible direct metabolic effect. However, no significant changes were observed in glucose levels or lipid profiles that could be attributed solely to the treatment. Statistical analysis also revealed that sex and diet are determining factors in the observed physiological responses.

Conclusion:

In conclusion, the fermented pomegranate extract may have beneficial effects on body weight in aging and obesity conditions, although further studies are required to clarify its mechanism of action at the molecular level, particularly through the analysis of biomarkers related to aging, oxidative stress, and inflammation.

1. Introducción:

a. Punica granatum:

Punica granatum, popularmente conocida como granada o árbol del granado, es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Lythraceae. El nombre científico *Punica granatum* proviene del francés antiguo *Pomegrenete*, que significa “Manzana llena de semillas” (1). Pese a que esta planta sea nativa de la zona comprendida entre la meseta iraní y el norte de la Cordillera del Himalaya, el tránsito de comerciantes ha favorecido la distribución de la planta por la zona Mediterránea, el África tropical, zonas áridas del Sudeste asiático y algunas zonas de América (2).

i. Propiedades farmacológicas:

En los últimos años, *P. granatum* (PG), ha despertado un gran interés en el público general, pero en particular en la comunidad científica, motivado por los beneficios para la salud derivados de su consumo. Estos beneficios residen en su gran riqueza fitoquímica, ya que cuenta con más de 100 metabolitos secundarios diferentes, algunos con potenciales beneficios para la salud; entre los que se encuentran fundamentalmente diferentes taninos y flavonoides, distribuidos de forma heterogénea según la parte del fruto (Tabla 1) (3).

Tabla 1: Distribución de las especies fitoquímicas:

Parte de la planta	Especies fitoquímicas
Corteza	<u>Elagitatinos y galotaninos:</u> brevifolina, castalagina, punicalagina, galoilpunicalin castalagina. <u>Alcaloides:</u> higrina y pseudopeletierena. <u>Esteroles y terpenoides:</u> friedooleanan-3-ona. <u>Catequinas:</u> galocatequina.
Piel	<u>Elagitatinos y galotaninos:</u> granatina b, pedunculagina, punicalagina. <u>Flavonoides:</u> kaempferol, luteolina y quercetina. <u>Antocianinas:</u> cianidina, pelargonidina y delphinidina. <u>Catequinas:</u> galocatequina y catequin(4,8)-galocatequina. <u>Derivados fenólicos:</u> ácido elágico y ácido clorogénico.
Semilla	<u>Taninos:</u> Ácido elágico.

Ácidos grasos y triglicéridos: ácido linoleico conjugado, tri-O-punicilglicerol, ácido palmítico, ácido punérico, ácido esteárico, di-O-punicil-O-octadeca-(8Z,11Z,13E)-trienilglicerol, 1-O-isopentil-3-O-octadeca-2-enoilglicerol.
Esteroles y terpenoides: estrona, testosterona, ácido ursólico y ácido betulínico.

Catequinas y procianidinas: catequina y procianidina B1 y B2.

Antocianinas y antocianidinas: delfinidina, cianidin-3,5-diglucósido, cianidin-3-rutinósido.

Jugo Ácidos orgánicos: ácido clorogénico, ácido cítrico y ácido gálico, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido málico y ácido quínico.

Flavonoides: quercetina y rutina.

Flores Triterpenoides: ácido asiático y maslínico
 Ácido gálico

Hojas Elagitaninos y galotaninos: punicalina, telimagrandina, punicafolina, tercataína y brevifolina.

Flavonoles: apigenin-4'-o- β -d-glucósido, luteolin-3'-o- β -d-glucósido

El principal componente con interés terapéutico de PG es la punicalagina, un tipo de tanino elágico o elagitanino. Sin embargo, este compuesto no es biodisponible por vía oral, ya que es degradado hasta formar urolitinas como producto final en la mayoría de la población. Las urolitinas son compuestos fenólicos derivados del metabolismo del ácido elágico (EA) por parte de la microbiota intestinal. El EA se puede encontrar de forma inalterada o como producto de hidrólisis de los elagitaninos. Estudios han demostrado una alta variabilidad interindividual en los productos metabólicos del EA, una característica que está estrechamente determinada por la composición de la microbiota intestinal. Por ejemplo, aquellos individuos que presentan en su microbiota *Gordonibacter urolithinfaciens*, *Gordonibacter pamelaee*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Enterococcus faecium* o *Lactococcus garvieae*, sintetizan urolitina A (UroA) a partir del metabolismo del EA (4). Esta variabilidad permite clasificar a los individuos en tres metabotipos distintos: el metabotipo 0 (Met0), caracterizado por la incapacidad de sintetizar urolitinas, el metabotipo A (MetA) que define a los individuos cuyo producto metabólico final es la UroA; y el metabotipo B

(MetB): Incluye a aquellos que, además de UroA, producen isourolitina A y urolitina B (Ilustración 1) (5).

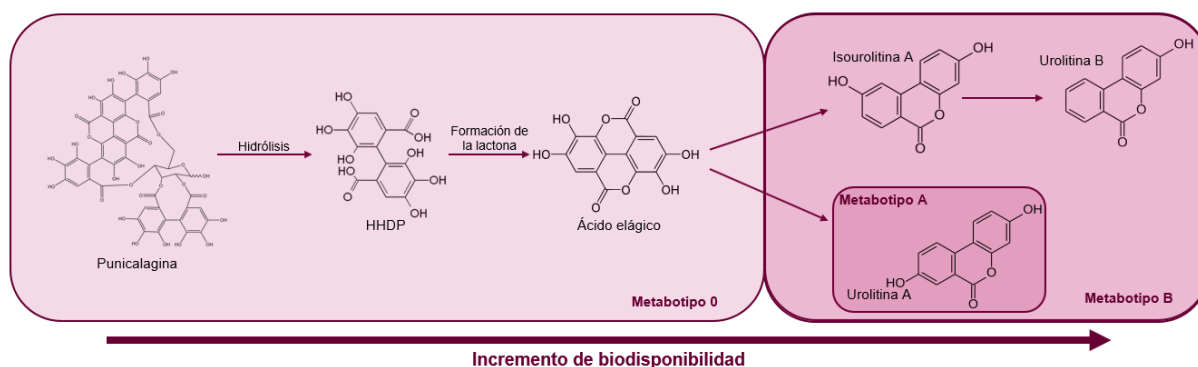


Ilustración 1: Metabolismo de los elagitaninos y biosíntesis de las urolitinas. La punicalagina se hidroliza, dando lugar a ácido hexahidroxidifénico (HHDP), que forma una lactona para dar lugar al EA. Posteriormente, en función del metabotipo que presente, puede sintetizar UroA y/o UroB.

La prevalencia de los metabotipos en la población varía según la edad. En general, la prevalencia del metabotipo B (MetB) aumenta con la edad. Sin embargo, aproximadamente el 10% de la población presenta un metabotipo 0 (Met0) de manera constante e inalterada, independientemente de la exposición a elagitaninos o ácido elágico. Además, se ha observado una posible asociación entre el MetB y un mayor riesgo de padecer patologías cardiovasculares y metabólicas. (6). Dentro de las urolitinas, la molécula con un mayor potencial terapéutico es la UroA, ya que se le atribuyen múltiples propiedades, tales como su capacidad de activación de la autofagia mitocondrial, su capacidad antioxidante, su capacidad de regular el ciclo celular o sus propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, algo que cabe reseñar es su capacidad de intervenir en la regulación metabólica. La UroA es capaz de activar la ruta de señalización de la Proteína Kinasa activada por AMP (AMPK), la cual promueve la oxidación de ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina. Como consecuencia, se reduce la síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis. Además, UroA también modula la actividad del Receptor Activado por el Proliferador de

Peroxisoma Gamma (PPAR- γ), relacionado con la diferenciación de adipocitos y el metabolismo de la glucosa y el colesterol (7). Las urolitinas sí son biodisponibles, por lo que la suplementación directa de estos compuestos podría resultar interesante para eliminar las limitaciones que suponen los metabotipos. Existen diferentes vías para la obtención de UroA, siendo una de ellas la síntesis química (8). Sin embargo, existe una vía alternativa que consiste en la fermentación del extracto de la granada, simulando las condiciones anaerobias del intestino (**Ilustración 2**). De esta forma se obtiene un producto que no solo es rico en UroA, sino que además presenta otras moléculas bioactivas de interés.

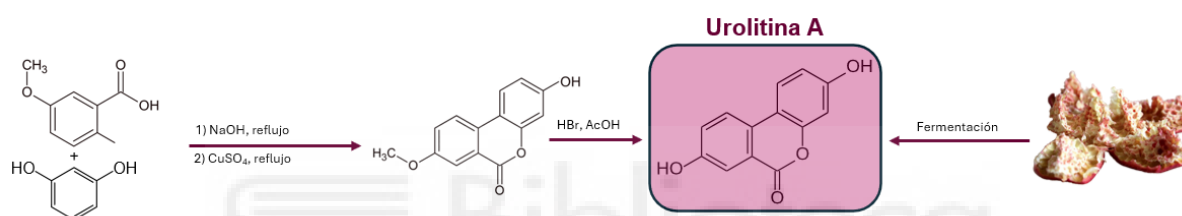


Ilustración 2: Métodos de síntesis de Urolitina A. A la izquierda se indica la ruta de síntesis química y a la derecha se indica un enfoque novedoso en el que interviene la fermentación del extracto de cáscara de granada.

b. Obesidad:

La obesidad es una patología crónica no transmisible, definida por una acumulación excesiva de grasa corporal que supone riesgos para la salud física y mental. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad supone un factor principal en el desarrollo de enfermedades y una de las mayores preocupaciones de salud pública a nivel mundial (9,10). En el núcleo de la obesidad se encuentra la desregulación del equilibrio energético, donde la ingesta calórica supera consistentemente el gasto, lo que conduce a la disfunción del tejido adiposo. Esta disfunción, marcada por anomalías metabólicas e inflamatorias, incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como diabetes, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos

de cáncer (10). Las causas de la obesidad reflejan su complejidad, abarcando factores intrínsecos y extrínsecos. Los estudios genéticos han identificado vínculos con rasgos monogénicos y poligénicos que influyen en el apetito y el metabolismo, mientras que los factores ambientales incluyen estilos de vida sedentarios, dietas densas en calorías y desigualdades socioeconómicas. El paciente obeso en general suele presentar una serie de características, las cuales están relacionadas con el aumento del riesgo de padecer enfermedades crónicas (**Ilustración 3**).

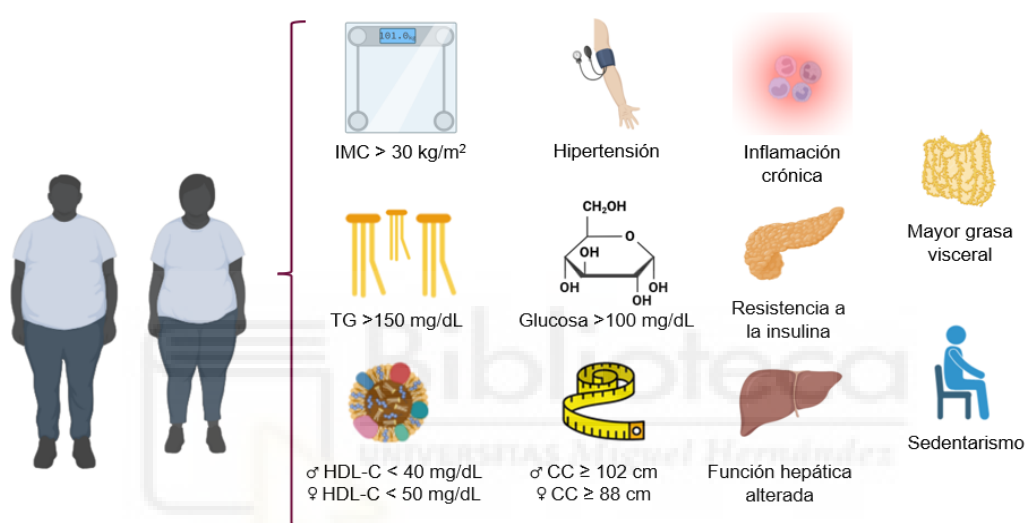


Ilustración 3: Características del paciente obeso. CC: Circunferencia de cadera; HDL-C: Lipoproteínas de alta densidad; IMC: Índice de Masa Corporal.

La obesidad constituye un desafío significativo para la salud pública, con implicaciones económicas y sociales sustanciales. Su asociación con una mayor prevalencia de enfermedades no transmisibles, como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer, ha llevado a un aumento en los costos de atención médica y a una reducción en la esperanza de vida. El análisis de la evolución de las desviaciones del índice de masa corporal (IMC) durante las últimas tres décadas evidencia un incremento alarmante en la prevalencia de la obesidad. Aunque los estudios se han enfocado principalmente en países desarrollados, se observa un

aumento acelerado en países en vías de desarrollo debido a cambios en los estilos de vida y patrones alimenticios.

c. Envejecimiento:

El envejecimiento es un proceso fisiológico caracterizado por el deterioro progresivo e irreversible de la función física de los individuos. Este fenómeno resulta de la acumulación de daño ocasionado por diversos estresores, tanto exógenos como endógenos. El envejecimiento constituye uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de patologías crónicas, entre las que destacan la diabetes mellitus, la enfermedad de Parkinson, la osteoporosis, la enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y las enfermedades cardiovasculares. Como consecuencia, las personas de edad avanzada presentan una mayor prevalencia de comorbilidades (11). Se han identificado nueve características fundamentales del envejecimiento a nivel molecular (*Ilustración 4*). Estas características abarcan procesos sistémicos, celulares y moleculares clave implicados en la progresión del envejecimiento (12).

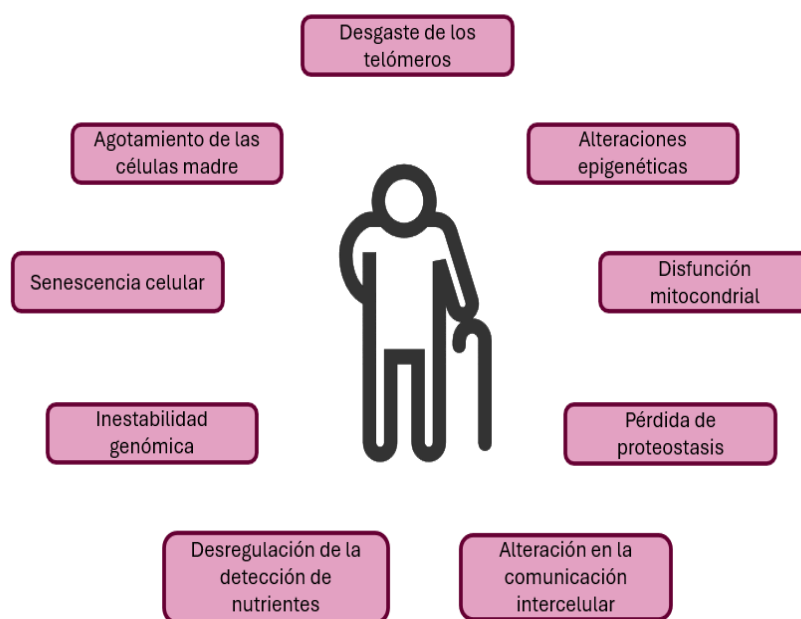


Ilustración 4: Las 9 características fundamentales del envejecimiento

Atendiendo a la etiología, el proceso de envejecimiento se puede clasificar en dos categorías. El envejecimiento intrínseco es un proceso universal, continuo e irreversible, el cual está asociado exclusivamente por el avance de la edad. Este proceso está ligado a factores genéticos y biológicos. Por otro lado, el envejecimiento extrínseco es aquel que está asociado a la exposición prolongada a factores de estrés como pueden ser la radiación UV, la ingesta calórica, el tabaco y otros tóxicos. El principal determinante del envejecimiento, además de las características patológicas individuales, es la senescencia celular. Este proceso implica un deterioro gradual en la capacidad de diferenciación, proliferación y funcionalidad fisiológica de las células (13). La senescencia celular se clasifica en dos categorías principales:

- Senescencia replicativa: Ocurre como resultado de un número limitado de divisiones celulares, asociado con el acortamiento progresivo de los telómeros. Este fenómeno culmina en la paralización de la proliferación celular y en la pérdida de la capacidad de diferenciación.
- Senescencia inducida por estrés: Se desencadena como respuesta a factores como daño al ADN o estrés oxidativo, que afectan la funcionalidad celular.

Ambos tipos de senescencia contribuyen al deterioro fisiológico que caracteriza al envejecimiento y están estrechamente vinculados con la aparición de enfermedades relacionadas con la edad (11).

d. Obesidad, inflamación, estrés oxidativo y envejecimiento:

La obesidad y el envejecimiento comparten múltiples mecanismos fisiopatológicos, lo que puede sugerir que son procesos interdependientes. Entre ellas se encuentran: inflamación crónica de bajo grado, disfunción mitocondrial, senescencia celular, alteración del sistema inmunológico, cambios en la composición corporal y la disbiosis. Un punto de conexión que contribuye a las diferentes vías fisiopatológicas es el estrés oxidativo. La obesidad contribuye al estrés oxidativo a través de diversos mecanismos interconectados, como pueden ser la hiperglicemia, dislipemias, inflamación crónica, hiperleptinemia o unas defensas antioxidantes inadecuadas, lo que genera un ambiente favorable para el daño celular. En personas obesas, la hiperglucemia activa vías prooxidantes, promoviendo la formación de productos de glicación avanzada (AGE), que a su vez desencadenan una cascada de señalización celular, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo en el tejido vascular. Además, estos AGE potencian la ruta del poliol, en la que la aldosa reductasa cataliza la conversión de glucosa en sorbitol, lo cual estimula la producción de genes de estrés, y como consecuencia, se estimula a su vez la actividad de la NADPH oxidasa, aumentando la producción de ROS y agotando el glutatión. La hiperglicemia e hiperinsulinemia activan la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), lo cual inhibe el proceso de autofagia, que se considera un promotor de la longevidad. Este proceso consiste en el catabolismo de componentes citosólicos como mecanismo para proteger a la célula frente a situaciones de estrés (14). Por otro lado, la acumulación excesiva de triglicéridos y ácidos grasos libres en los tejidos adiposos y circulantes reduce la eficiencia de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, lo que provoca la acumulación de electrones, los cuales reaccionan con el O_2 para formar ROS. Esta alteración metabólica, no solo contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y resistencia a la insulina,

sino que también induce un estado inflamatorio crónico, caracterizado por el aumento de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleukina-6 (IL-6), que activan la proteína C reactiva (CRP) y promueven la disfunción endotelial y la aterosclerosis. La inflamación en la obesidad también implica la infiltración progresiva de macrófagos en el tejido adiposo, lo que amplifica la producción de citoquinas y ROS, reforzando un círculo vicioso de estrés oxidativo y daño tisular. Asimismo, el perfil dislipidémico asociado a la obesidad, caracterizado por niveles elevados de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL), aumenta la susceptibilidad a la oxidación lipídica, promoviendo la formación de moléculas como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcadores de peroxidación lipídica que exacerban la inflamación y la disfunción celular (15). El estrés oxidativo (EO) provoca daño en biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, afectando la señalización celular y la expresión génica, lo que conlleva alteraciones en las células. La interacción de estos eventos contribuye al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (16). La teoría del estrés oxidativo sobre el envejecimiento sugiere que la acumulación de daño oxidativo en macromoléculas, como la que induce la obesidad, es una de las principales causas de la pérdida de funciones tisulares y orgánicas con la edad. La disfunción mitocondrial inducida por el estrés oxidativo agrava el envejecimiento celular al reducir la eficiencia enzimática y promover el deterioro estructural de proteínas y lípidos(17) . Además, el EO induce la senescencia celular, caracterizada por un fenotipo secretor senescente (SASP), que contribuye a un ambiente proinflamatorio y a enfermedades crónicas. Entre los mecanismos implicados se incluyen la activación del factor nuclear kappa-B (NF κ B), la inducción de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) asociadas a patologías como el Alzheimer y la aterosclerosis, y la inhibición de sirtuinas y

proteínas FOXO, lo que favorece la inflamación y el deterioro celular (18). "La conexión entre los mecanismos implicados en la obesidad y el envejecimiento queda reflejada en la **Ilustración 6**.

El uso de compuestos naturales, como las urolitinas presentes en los extractos fermentados de cáscara de granada, es una estrategia prometedora para modular todos los efectos comentados anteriormente. Por ello, el presente trabajo se enmarca en la investigación que se desarrolla en el Grupo de Diseño y Desarrollo de Moléculas Bioactivas del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología sanitaria de Elche (IDiBE) para el estudio de la relación de los compuestos de origen natural con la modulación del envejecimiento y su relación con la obesidad.



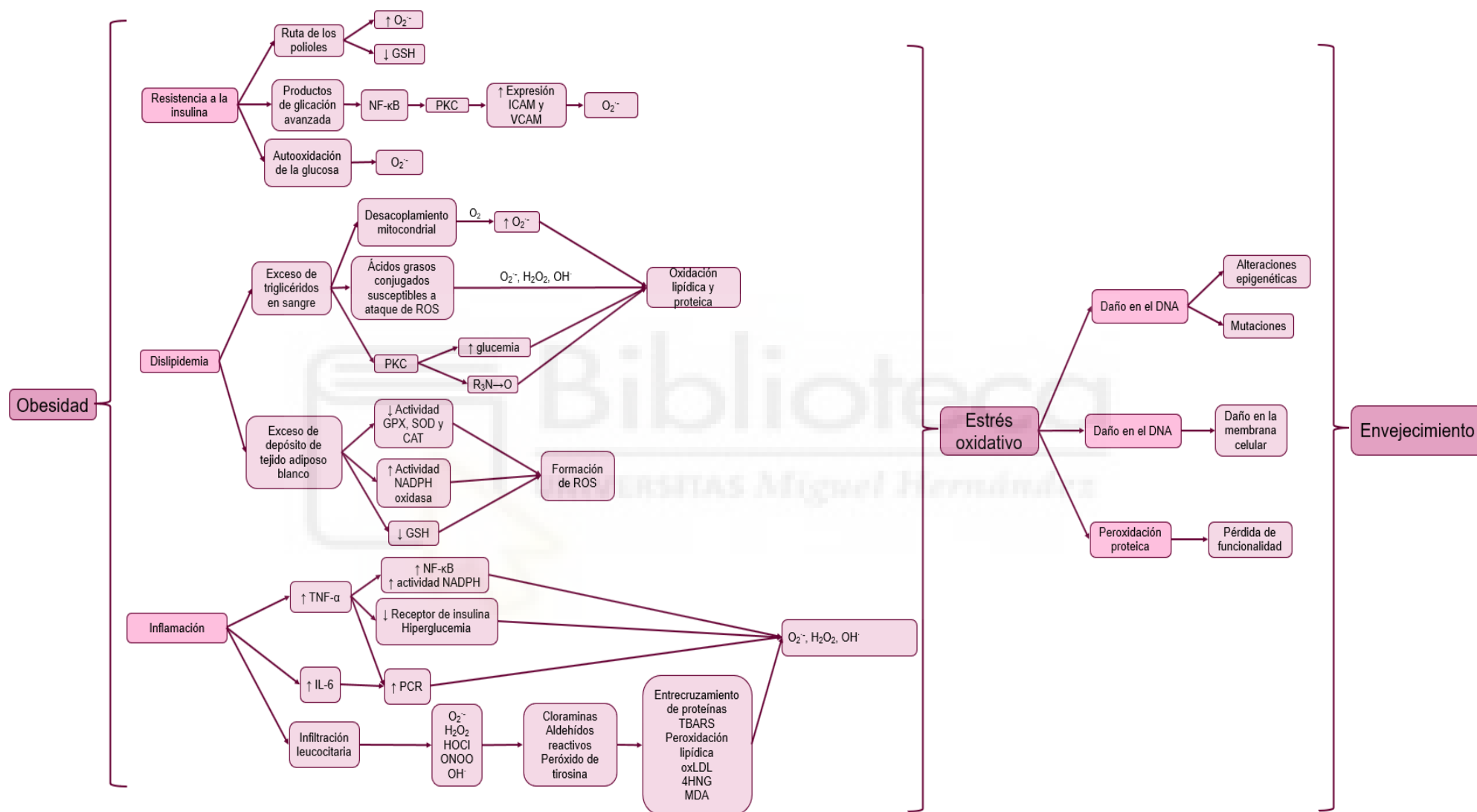
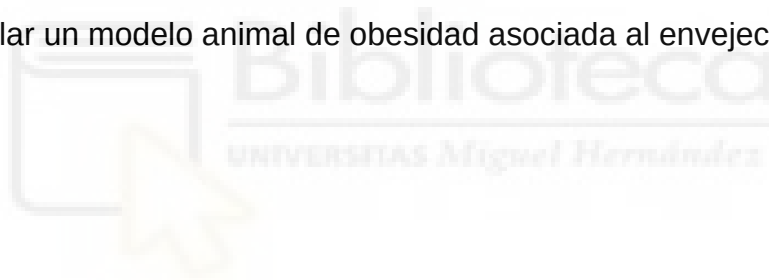


Ilustración 6: Posible relación entre la obesidad y el envejecimiento.

2. Objetivos:

Los objetivos del presente Trabajo de Fin de Grado son:

- Evaluar las propiedades farmacológicas de un extracto de granada en un modelo animal de obesidad inducida por una dieta alta en grasas en ratones de edad avanzada, centrándose en sus efectos sobre la obesidad, el estrés oxidativo, la inflamación y el envejecimiento.
- Determinar el impacto del extracto de granada en parámetros antropométricos como peso corporal y parámetros bioquímicos.
- Comparar la evolución de estos parámetros entre los grupos de tratamiento y control para determinar la efectividad del extracto en la modulación de la obesidad en la vejez.
- Desarrollar un modelo animal de obesidad asociada al envejecimiento.



3. Materiales y métodos:

a. Modelo animal:

El modelo animal empleado en el estudio fue el ratón de la cepa C57BL/6J envejecido con una edad de 15 meses en los machos y de 12 meses en las hembras procedente de la casa *Charles Rivers* (Ilustración 6). La línea C57BL/6J es una cepa común en investigación, ya que no son necesarias instalaciones especiales para su cría o mantenimiento, suponiendo una gran ventaja a nivel práctico. Todo esto, sumado al hecho de que, al ser líneas endogámicas, los animales son genéticamente idénticos entre sí; permite que se hayan empleado en áreas tan diversas como la investigación en enfermedades metabólicas, biología del desarrollo, genética o inmunología, entre otros muchos ámbitos.



Ilustración 6: C57BL/6J envejecido. Extraída del I Concurso de Fotografía científica del IDiBE.
Autores: Isabel Serrano Toribio y Diego Cao Ortiz

b. Dieta:

En el estudio se emplearon dos tipos de dieta: una estándar, utilizada habitualmente en el animalario para mantener condiciones nutricionales basales, y una dieta alta en grasa (HFD), escogida específicamente para inducir un estado de sobrepeso u obesidad. La dieta estándar se presentaba en forma de pellet, mientras que la dieta alta en grasa (*BIOSERVE-230HF*) empleada adquirida en *Safe Custom Diets*, la cual consiste en una pasta compuesta de sacarosa, manteca de cerdo, caseína y una

premezcla de minerales y vitaminas. En la **Ilustración 7** se muestran las diferencias en el contenido nutricional de las diferentes dietas.

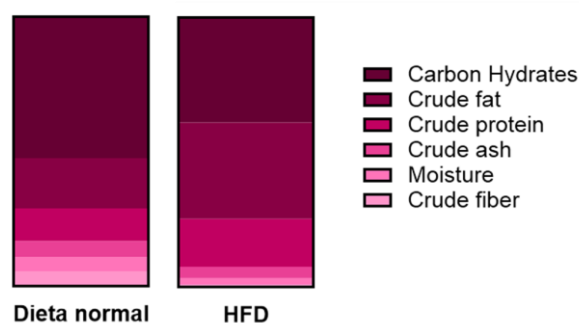


Ilustración 7: Comparación entre los dos tipos de dieta.

c. El extracto:

El extracto empleado en el estudio fue un extracto fermentado de cáscara de granada, proporcionado por la empresa *InnovationLabo*. La cáscara de granada es un producto de desecho industrial de la producción de zumos a partir de PG, suponiendo hasta el 50% del peso total del fruto. Sin embargo, al fermentar las cáscaras de granada con bacterias productoras de UroA, se obtiene un extracto rico en UroA. Dicho extracto fue disuelto en suero fisiológico para preparar una disolución de stock de 12,33 mg/mL.

d. Procedimiento experimental:

El proyecto de experimentación animal fue aprobado por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación (CEII) de la Universidad Miguel Hernández con el código 2023-VSC-PEA-0277 tipo 2. Después de la llegada de los 48 animales: 24 machos y 24 hembras a las instalaciones, pasaron un periodo de aclimatación de 10 días. Posteriormente, se pesaron y distribuyeron los ratones de forma aleatoria en 4 grupos por cada sexo, de tal manera que el promedio de pesos de cada grupo fuera lo más homogéneo posible entre sí. Cada uno de estos grupos recibió un tratamiento y dieta distinta (**Tabla 2**).

Tabla 2:

Machos		Hembras	
Grupo	Tratamiento	Grupo	Tratamiento
A	Placebo y dieta normal	A	Placebo y dieta normal
B	Placebo y HFD	B	Placebo y HFD
C	Extracto y dieta normal	C	Extracto y dieta normal
D	Extracto y HFD	D	Extracto y HFD

Una vez distribuidos en los grupos, se les sometió a un periodo de engorde durante 38 días, con el objetivo de inducir en los animales una obesidad mediante la dieta. Durante este periodo se realizaron analíticas semanales a los animales mediante sangrado de cola (*Ilustración 8*). Las muestras de sangre extraídas se analizaron a partir de *CardioCheck*, mediante el cual se obtuvieron los valores de glucemia, colesterol total, triglicéridos y HDL.

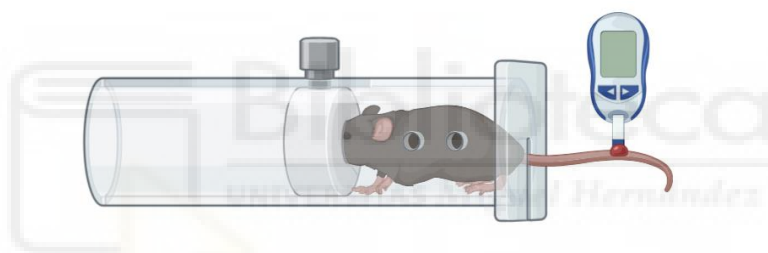


Ilustración 8: Método de sangrado de cola.

Una vez concluido el periodo de engorde, se comenzó con la administración del extracto. Para la administración se optó por la administración oral mediante sondaje (*Ilustración 9*), tanto de suero salino, en el caso del placebo, como del extracto disuelto en suero salino.



Ilustración 9: Método de sondaje oral empleado.

La disolución del extracto se administró a una dosis de 25 mg/kg y día 3 veces a la semana. Esta dosis se eligió mediante una consulta bibliográfica. Durante la duración del ensayo, se midieron periódicamente tanto el peso corporal de los animales como su ingesta de pienso y valores de glucemia, colesterol total, triglicéridos y HDL. Una semana después de comenzar el ensayo, los animales, pero en particular los pertenecientes al grupo C tanto de machos como de hembras experimentaron una bajada drástica en su peso y consumo de pienso. Esto fue atribuido a una dosis excesiva de extracto, por lo que se decidió reducir únicamente la dosis de este grupo, pasando a ser una dosis de 12,5 mg/kg y día, continuando sin incidencias hasta concluir el estudio. Se descartó que fuera una respuesta de toxicidad al extracto, ya que se encuentra comercializado. Al finalizar el estudio, se procedió al sacrificio de los animales mediante sobredosis de anestésico, siguiendo las pautas y estándares en materia de Ética y Bienestar Animal. Posteriormente se realizaron necropsias completas con la extracción de grasa abdominal, grasa genital, hígado, intestino y estómago, pulmones, esófago y muestras de sangre mediante punción cardiaca; para su posterior análisis. Las muestras de tejido de pulmón, esófago y tracto digestivo se conservaron en formaldehído, siendo etiquetadas para su posterior identificación y para la realización de técnicas histopatológicas, además de la observar, si los hubiese, alteraciones en los órganos. El hígado y las muestras de tejido adiposo fueron conservadas en criotubos a -96°C y la sangre fue centrifugada posteriormente a su extracción, conservándose únicamente el plasma. El esquema del procedimiento experimental se resume en la **Ilustración 10**.

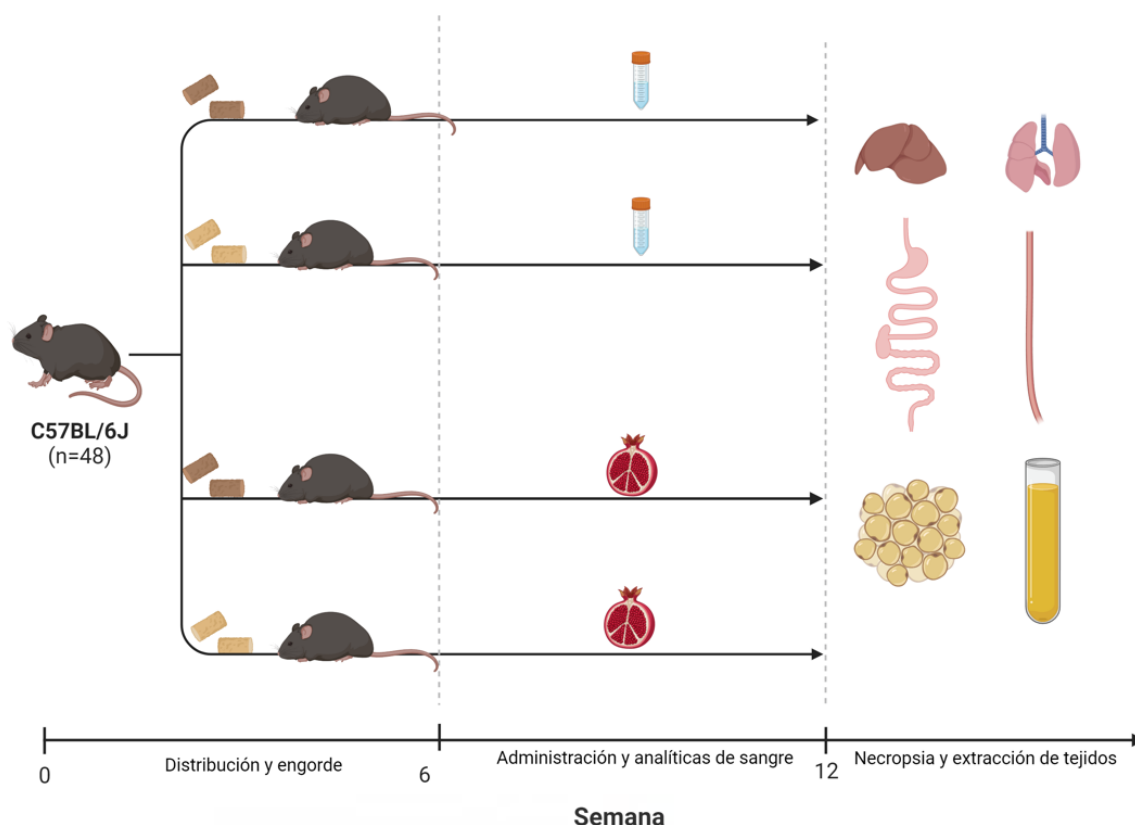


Ilustración 10: Resumen del procedimiento experimental.

e. Análisis estadístico:

El análisis estadístico de los datos obtenidos a lo largo del estudio se llevó a cabo utilizando la plataforma *Google Colab*, un entorno de programación en la nube que permite la ejecución de código en lenguaje *Python*, ampliamente utilizado en investigación científica por su versatilidad y por la disponibilidad de bibliotecas estadísticas especializadas. Para el tratamiento estadístico se empleó un análisis de varianza de dos factores (*two-way ANOVA*), con el objetivo de evaluar el efecto de variables independientes como el sexo, la dieta y el tratamiento sobre distintas variables fisiológicas (peso corporal, ingesta alimentaria, colesterol total, HDL, glucemia y triglicéridos), así como las posibles interacciones entre estos factores. En las gráficas aportadas en el presente Trabajo de Fin de Grado no se han incluido las barras de error con el ánimo de facilitar su interpretación y comprensión, debido a la alta variabilidad encontrada.

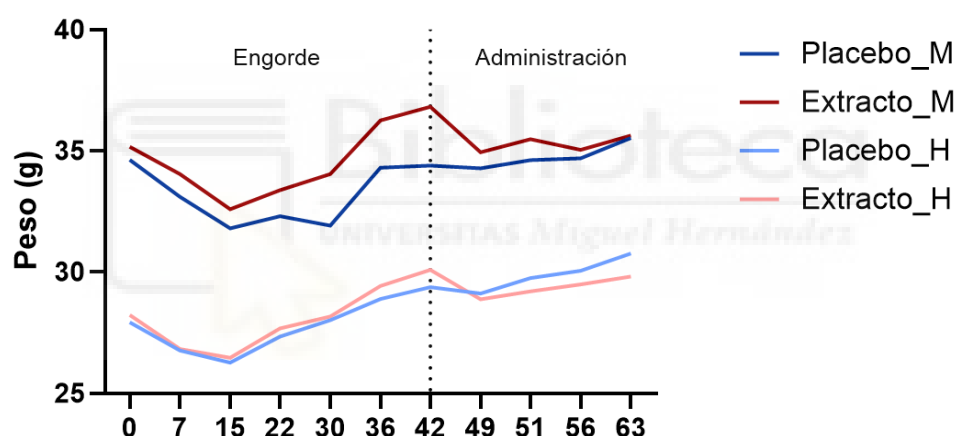
4. Resultados:

Se realizó el ensayo con los ratones envejecidos tal y como se detalla en la sección de metodología. Las diferentes variables que analizaron en el estudio fueron el peso, la ingesta, el colesterol, el HDL, la glucemia y los triglicéridos. A su vez, para cada variable, se estudió la influencia de la dieta empleada, el sexo y el compuesto por separado, así como la interacción entre estos factores. De esta manera se pretende determinar si los resultados obtenidos son atribuibles al extracto en exclusiva o, en su defecto, dependen de otros factores.

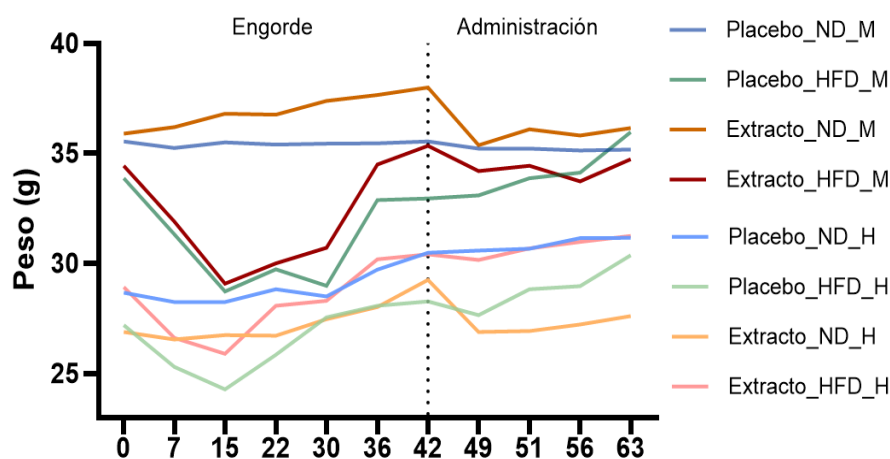
a. Peso:

En general, los animales sometidos a una dieta normal presentaron un peso superior en comparación con aquellos alimentados con una dieta alta en grasas (HFD). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al extracto administrado, los animales tratados con extracto mostraron un peso corporal inferior al de los tratados con placebo a partir del inicio de la administración. El sexo también influyó de manera significativa en el peso, siendo este mayor en los machos que en las hembras. No obstante, no se observaron diferencias relevantes en los cambios de peso entre los animales que recibieron una dosis reducida a la mitad y aquellos que mantuvieron la dosis completa a lo largo del estudio. Se identificó una interacción significativa entre la dieta y el extracto administrado, con los ratones sometidos a dieta normal y tratados con placebo presentando mayores valores de peso. También se observó una interacción significativa entre el sexo y la dieta, destacando que los machos con dieta normal presentaron un peso considerablemente superior al de los otros grupos. No se identificaron diferencias significativas entre las hembras tratadas con extracto y aquellas tratadas con placebo. Sin embargo, las hembras tratadas con placebo aumentaron de peso tras la administración mientras que las tratadas con el

extracto redujeron su peso. Además, se observa una interacción significativa entre la dieta y el extracto. Asimismo, la interacción entre dieta y sexo es significativa. En cuanto a la interacción entre el extracto y el sexo, aunque se observa una tendencia hacia mayores pesos en los machos tratados con placebo, esta diferencia no resulta estadísticamente significativa. Finalmente, se detectó una interacción triple significativa entre dieta, extracto y sexo. La evolución de los valores de peso se muestra en las **Gráficas 1 y 2**. Ambas gráficas se dividen en dos periodos, el correspondiente a la fase de engorde (sin administración de extracto) y la fase de tratamiento o administración del extracto/placebo, manteniendo la dieta en cada grupo.



Gráfica 1: Comparación del peso según el sexo y el extracto administrado.

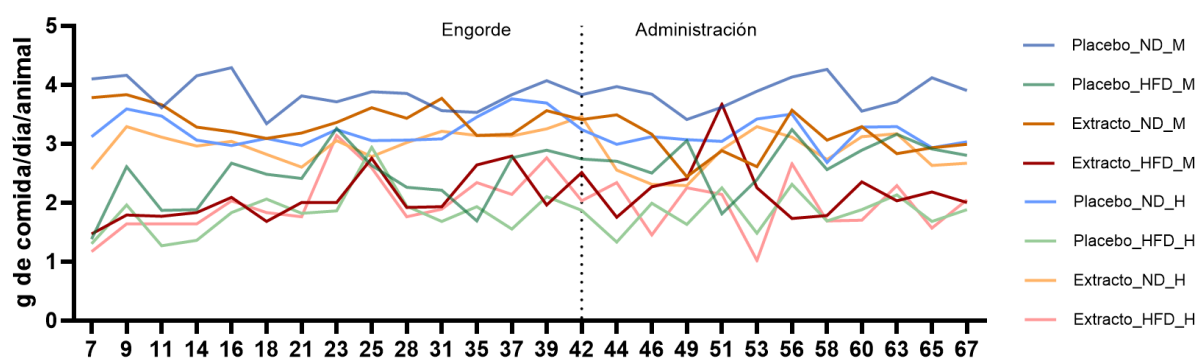


Gráfica 2: Comparación del peso por extracto, dieta y sexo.

b. Ingesta:

El análisis de los datos obtenidos muestran que el tipo de dieta tiene un impacto significativo en la ingesta alimentaria. En general, los animales alimentados con una dieta normal (ND) presentan una mayor ingesta en comparación con aquellos sometidos a una dieta alta en grasas (HFD). En cuanto al efecto del extracto, se observa que los animales tratados con placebo tienden a consumir más alimento en comparación con aquellos que reciben el extracto, aunque esta diferencia es relativamente pequeña y no estadísticamente significativa. El sexo de los animales también parece influir en la ingesta, siendo esta generalmente superior en los machos en comparación con las hembras.

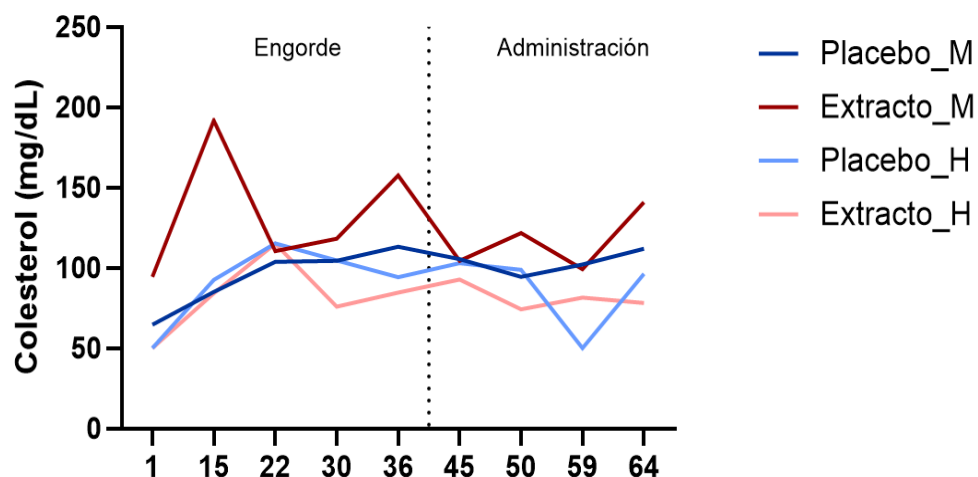
Por otro lado, se detecta que los animales que siguen una dieta HFD y son tratados con el extracto muestran una ingesta inferior a los que reciben placebo. No se ha encontrado evidencia significativa de interacciones entre la dieta y el sexo, ni entre el sexo y el extracto, lo que sugiere que estos factores actúan de manera independiente en cuanto a su influencia en la ingesta. Asimismo, no se detectaron interacciones significativas entre la combinación de dieta, sexo y extracto, descartando efectos conjuntos en la reducción del consumo de alimento.



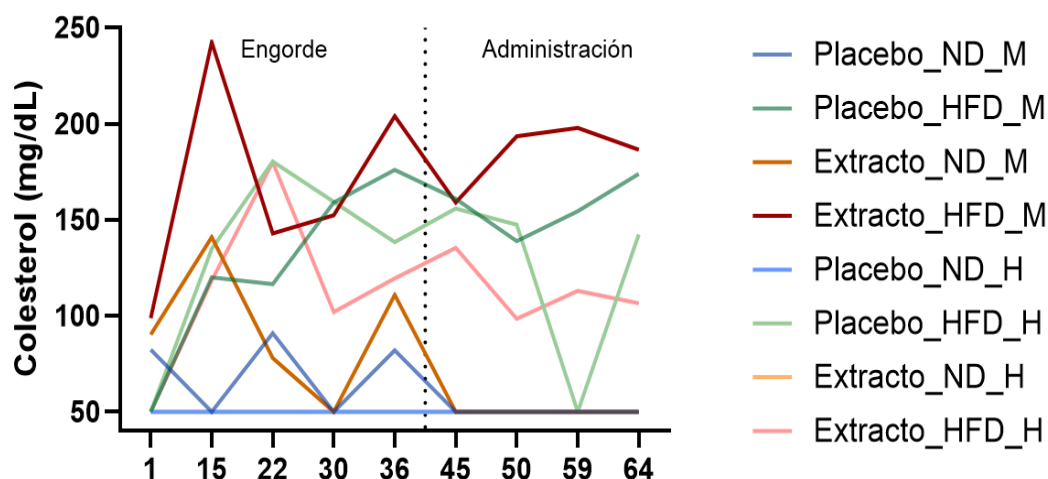
Gráfica 3: Comparación de la ingesta por extracto, dieta y sexo.

c. Colesterol total:

En cuanto a los valores de colesterol, se observa que la dieta tiene una influencia significativa. Los animales alimentados con dieta HFD presentan concentraciones de colesterol aproximadamente 54 mg/dL superiores a las de los animales con dieta normal. Además, se aprecian diferencias en función del extracto administrado, siendo los animales tratados con placebo los que presentan niveles de colesterol inferiores en comparación con los tratados con el extracto. No obstante, esta diferencia es evidente antes del inicio del tratamiento, igualándose en gran medida una vez iniciada la administración. El sexo también influye significativamente en los niveles de colesterol, con los machos presentando concentraciones superiores a las hembras. Sin embargo, no se observan interacciones significativas entre el extracto y la dieta, ni entre el sexo y la dieta, lo que indica que estos factores actúan de forma independiente en la determinación de los niveles de colesterol. Destaca que las hembras con dieta normal mantienen valores constantes de colesterol a lo largo de todo el estudio, mientras que los machos tratados con placebo tienden a presentar niveles más bajos de colesterol en comparación con los tratados con el extracto.



Gráfica 4: Comparación de los valores de colesterol total según el sexo y el extracto administrado.

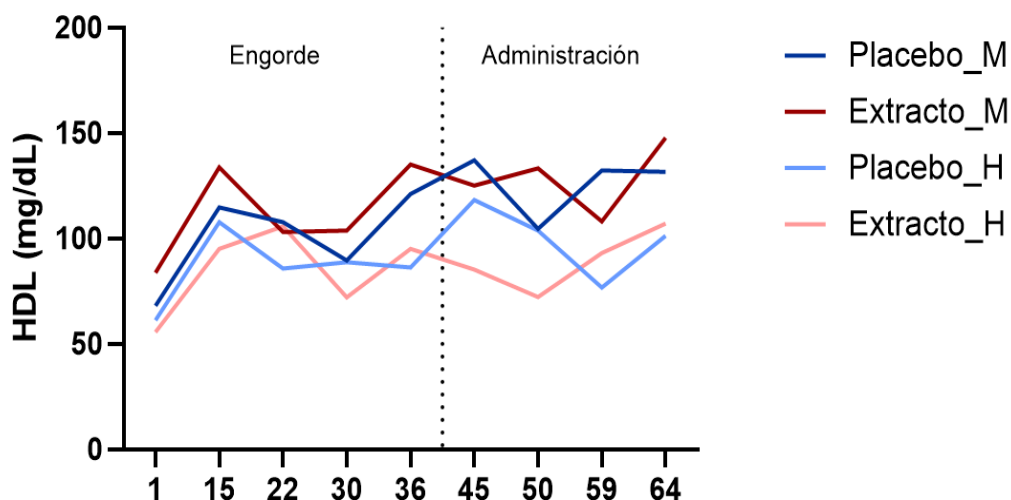


Gráfica 5: Comparación de los valores de colesterol total por extracto, dieta y sexo.

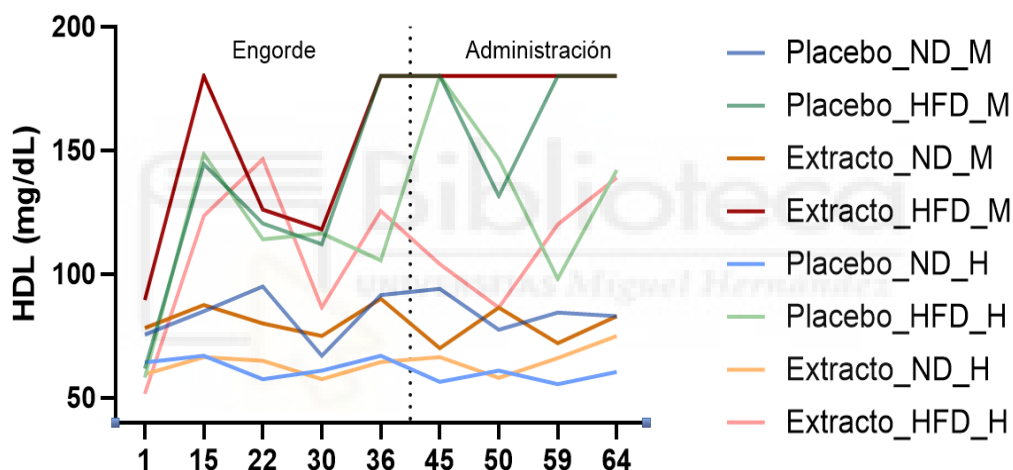
d. HDL:

Se observó que la dieta influye de forma estadísticamente significativa en los valores de HDL, presentando los animales sometidos a dieta HFD niveles superiores en 42 unidades en comparación con los que siguieron otro tipo de dieta. Por otro lado, el extracto no mostró un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de HDL, indicando que no existen diferencias relevantes entre los grupos tratados con el extracto y los que recibieron placebo. En cuanto al sexo, se encontró una influencia significativa, siendo los valores de HDL superiores en los machos en comparación con las hembras.

Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las interacciones entre el extracto y la dieta, ni entre la dieta y el sexo. Además, los machos tratados con placebo presentaron niveles de HDL inferiores al promedio de los grupos evaluados.



Gráfica 6: Comparación de los valores de HDL según el sexo y el extracto administrado.

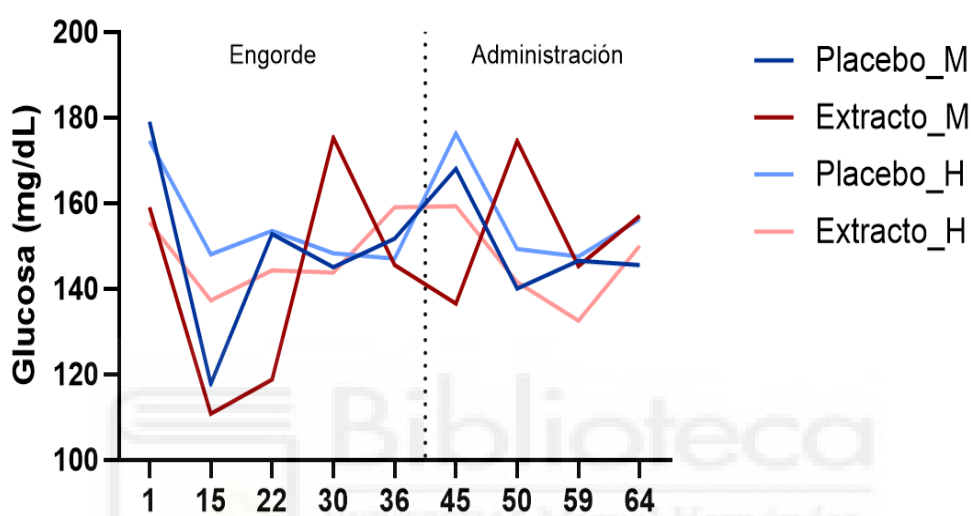


Gráfica 7: Comparación de los valores de HDL por extracto, dieta y sexo.

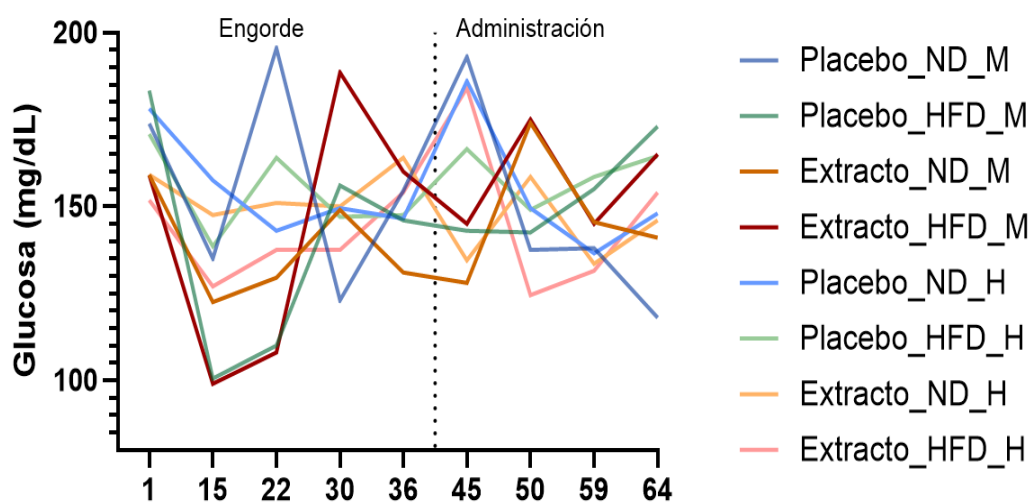
e. Glucosa:

En relación con los niveles de glucosa en sangre, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los efectos de la dieta, lo que sugiere que este factor no tiene un impacto claro sobre los niveles de glucemia en las condiciones evaluadas. Asimismo, aunque los animales tratados con el extracto parecen presentar valores inferiores de glucosa en comparación con los tratados con placebo, esta diferencia no alcanza significancia estadística, lo que indica que no se puede establecer un efecto claro del extracto sobre los niveles de glucosa. En cuanto al sexo, los animales

machos muestran valores superiores de glucosa en sangre, aunque esta diferencia tampoco es estadísticamente significativa, lo que sugiere que el efecto del sexo sobre esta variable no es concluyente en este caso. Tampoco se han identificado interacciones significativas entre la dieta y el extracto, ni entre la dieta y el sexo, lo que sugiere que estos factores actúan de manera independiente en cuanto a sus efectos sobre la glucemia.



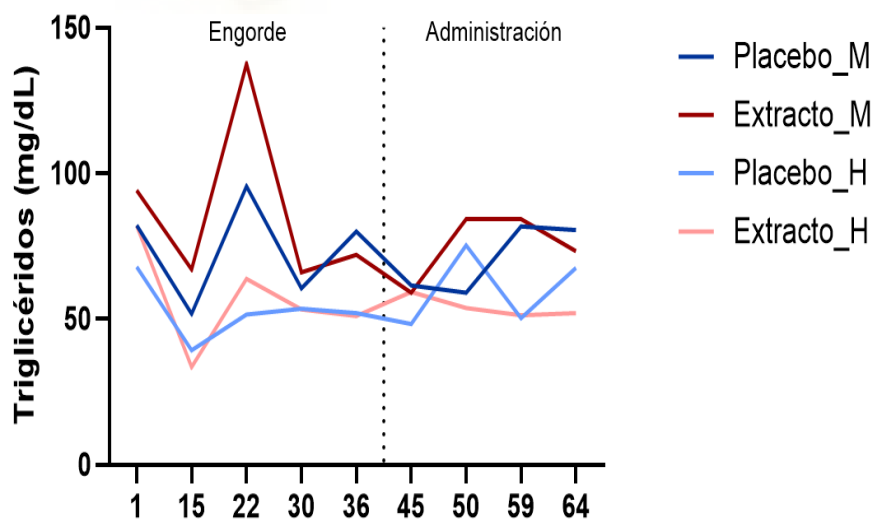
Gráfica 8: Comparación de los valores de glucosa según el sexo y el extracto administrado.



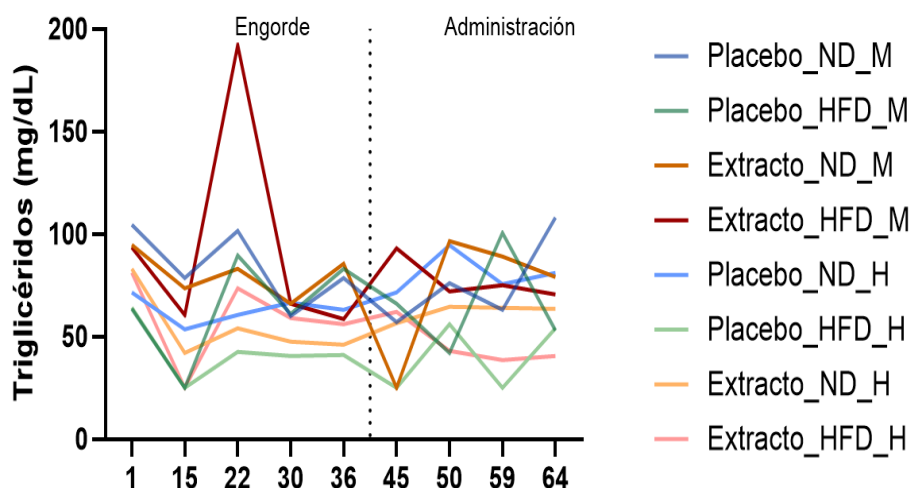
Gráfica 9: Comparación de los valores de glucosa por extracto, dieta y sexo.

f. Triglicéridos:

En cuanto a los niveles de triglicéridos, se observó que los animales alimentados con una dieta normal presentaron concentraciones más elevadas que aquellos sometidos a una dieta alta en grasas. Sin embargo, los animales tratados con placebo mostraron valores de triglicéridos ligeramente inferiores a los tratados con el extracto, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística. Además, se identificó una tendencia hacia niveles más altos de triglicéridos en los animales alimentados con dieta normal y tratados con placebo, lo que podría indicar una posible interacción entre la dieta y el extracto administrado, aunque sin significancia estadística. No se detectó interacción estadísticamente significativa entre la dieta y el sexo, lo que indica que el efecto de la dieta sobre los niveles de triglicéridos es independiente del sexo de los animales. De manera similar, los machos tratados con el extracto presentaron niveles superiores de triglicéridos en comparación con las hembras, pero estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas.



Gráfica 10: Comparación de los valores de triglicéridos según el sexo y el extracto administrado.



Gráfica 11: Comparación de los valores de triglicéridos por extracto, dieta y sexo.

5. Discusión:

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la influencia de diversos factores —como la dieta, el sexo y el extracto administrado— sobre distintas variables fisiológicas clave en la confluencia entre la obesidad y el envejecimiento: peso corporal, ingesta alimentaria, colesterol total, HDL, glucemia y triglicéridos. Asimismo, el análisis de las interacciones entre estos factores ha permitido matizar y profundizar en la interpretación de los efectos observados.

Las diferencias observadas entre machos y hembras en las variables de estudio son consistentes con los hallazgos previamente reportados en la literatura. Por ejemplo, Freire-Regatillo et al. describen que los machos de la cepa C57BL/6J tienden a presentar una ingesta y un peso corporal superiores a los de las hembras. Esta diferencia se atribuye a las distintas estrategias que cada sexo emplea para regular el equilibrio energético: mientras que los machos tienden a regular principalmente su ingesta energética, las hembras lo hacen modulando el gasto energético (19). Además, otros estudios, como los realizados por Desinova y Markinova, señalan que

estas diferencias también se reflejan en el perfil bioquímico de los animales y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo (20).

En relación con el peso corporal, los animales alimentados con dieta normal presentaron valores significativamente superiores respecto a los que recibieron dieta HFD. Esto resulta una clara discrepancia con el modelo de obesidad inducida por la dieta puesto a punto en el grupo, en el cual se obtenían diferencias de peso significativas en los ratones alimentados con dieta grase. Este resultado pone de manifiesto que los actuales modelos de inducción de obesidad pueden presentar problemas a la hora de ser empleados en ratones envejecidos. Una de las posibles explicaciones a este hecho es que, al tratarse de animales envejecidos, muchos de los cuales presentaban distintas patologías asociadas a la edad, es posible que, debido a una diferencia de palatabilidad tan marcada respecto a la dieta de partida haya supuesto un factor de estrés que les impidiera alcanzar el peso esperado. Aunque los resultados de peso fueron aparentemente dispares durante el periodo de engorde, estos se igualaron poco antes de comenzar la administración. Desde el inicio de la administración hasta el final del estudio, se puede observar cómo los animales tratados con placebo, especialmente los machos, aumentan de peso, mientras que los tratados con el extracto reducen su peso. Por tanto, se puede afirmar que el tratamiento con el extracto es capaz de reducir el peso, a pesar de que las diferencias no sean estadísticamente significativas. Esto podría sugerir que la duración del estudio fue insuficiente o que la aleatorización y distribución de los animales al inicio no fue adecuada, lo que se observa en la fase de engorde donde todavía no hay administración del extracto. En cuanto a la ingesta alimentaria, el tipo de dieta fue el principal factor determinante, siendo mayor en los animales con dieta normal. Este hallazgo es atribuible a un efecto saciante producido por la dieta HFD, ya que es

conocido que la grasa actúa como saciante. Estos resultados son acordes con lo citado en el trabajo de Reguero et al., en el cual la ingesta fue superior en el caso de los ratones con dieta normal y también coinciden con resultados anteriores del grupo en un modelo de ratones no envejecidos y que están pendientes de publicación.

El tratamiento con el extracto produjo una ligera disminución del consumo, especialmente en el grupo con dieta HFD, aunque sin diferencias marcadas. Los valores de ingesta eran esperables, ya que los animales se encontraban en situación de comida *ad libitum*, motivo por el cual existen fluctuaciones respecto al nivel de ingesta, ya que son los propios animales los que se autorregulan. También se observaron diferencias según el sexo, con los machos mostrando una ingesta superior, lo cual concuerda con el patrón de mayor peso corporal observado en este sexo. Durante la administración no se observaron diferencias significativas respecto a la ingesta, por lo que se puede afirmar que la ingesta no depende del extracto y que, por tanto, la reducción del peso no es atribuible a un descenso de la misma. En lo referente a los resultados de las variables bioquímicas, se observaron fluctuaciones no esperadas. Esto se atribuye a dos factores fundamentalmente: el primero, a que se realizaban analíticas a dos animales por grupo cada semana, elevando la variabilidad. Por otro lado, el instrumento empleado para la medición contaba con un límite de detección para los TG, el colesterol total y el HDL, por lo que se realizaron las siguientes aproximaciones (Tabla 3).

Tabla 3:

>120	180 mg/dL
<100	50 mg/dL
<50	25 mg/dL

Pese a que, desde el punto de vista estadístico, estas aproximaciones podrían ser correctas, los resultados son insuficientes desde el punto de vista biológico, por lo que

para futuros estudios sería interesante el empleo de aparatos con mayor sensibilidad. Respecto a los niveles de colesterol total, la dieta alta en grasas se asoció con un aumento significativo en las concentraciones plasmáticas, como era esperable. Aunque los animales tratados con el extracto presentaron niveles ligeramente superiores a los del grupo placebo, esta diferencia ya estaba presente antes de la administración, lo que descarta un efecto atribuible directamente al tratamiento. Por su parte, los machos mostraron niveles de colesterol más elevados que las hembras, pero no se observaron interacciones significativas entre los factores analizados, lo que apunta a efectos independientes.

En el caso del HDL, el tratamiento con extracto no produjo diferencias estadísticamente significativas, ya que la influencia del sexo y el tipo de dieta tuvo un mayor impacto.

En cuanto a la glucemia, no se detectaron diferencias significativas atribuibles ni a la dieta, ni al extracto, ni al sexo. A pesar de que se observó una ligera reducción de los valores en los animales tratados con extracto, esta diferencia no alcanzó significación estadística. Al no tomar las muestras de sangre con los animales en ayunas, estos resultados pueden estar condicionados por la ingesta del animal. A partir de esto se puede concluir que el uso de esta cepa es adecuado para el estudio de patologías metabólicas, ya que estos animales tienen cierta predisposición a desarrollar este tipo de condiciones, la cual se ve agravada cuando se les induce obesidad mediante la dieta. Según estudios como el de Fisher-Wellman et al., esta susceptibilidad parece atribuirse a una pérdida de función de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT). Esta es una enzima mitocondrial implicada en la regulación de la detoxificación de peróxidos. Se cree que la pérdida de función de la NNT eleva la exposición mitocondrial a peróxidos en las células beta, disminuyendo el cociente ATP/ADP, y

retrasando el cierre del canal de K-ATP. Además, estos valores de glucosa se incrementan cuando los animales se encuentran expuestos a situaciones de estrés, el cual puede desencadenarse por un flujo simpático anormal o por una capacidad de respuesta adrenérgica postsináptica alterada, lo que podría explicar los resultados obtenidos (21).

Por último, los resultados de triglicéridos mostraron un patrón inverso al esperado: los animales alimentados con dieta normal presentaron niveles más altos que aquellos con dieta alta en grasas. Aunque el tratamiento con el extracto se asoció con valores ligeramente superiores a los observados en los animales placebo, esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa. Se detectó una tendencia a niveles más altos en el grupo dieta normal + placebo, lo que podría sugerir una interacción dieta-extracto, aunque no se alcanzó significancia. Hasta la fecha, no se han identificado estudios específicos que utilicen extractos de granada fermentados en investigaciones relacionadas con la obesidad y el envejecimiento. Sin embargo, se han llevado a cabo diversos estudios utilizando extractos de granada no fermentados ricos en punicalaginas, como el de Reguero et al., en investigación relacionada con la obesidad. En este estudio se estudió el efecto de un extracto no fermentado de piel de granada en un modelo animal de C57BL/6J obeso joven. En él se observó una reducción del peso sin afectar a la ingesta; resultados que concuerdan con nuestra investigación. Además, se encontró un aumento de biomarcadores asociados con la termogénesis y el equilibrio redox (22). Este efecto no se ha podido observar con los datos disponibles actualmente. Sin embargo, con el plasma extraído se podría analizar si existen diferencias entre los biomarcadores relacionados con obesidad, envejecimiento y estrés oxidativo. Para determinar el valor añadido del extracto

fermentado se podrían realizar estudios comparativos con placebo, extracto fermentado y extracto sin fermentar

6. Conclusiones:

- El extracto de granada fermentado es capaz de reducir el peso corporal en animales envejecidos alimentados con dieta alta en grasa.
- La edad constituye un factor limitante en la adaptación del modelo animal de obesidad a animales de mayor edad.
- Se requiere un análisis de biomarcadores plasmáticos y en tejido en profundidad para determinar el impacto a nivel molecular del extracto.

Perspectivas futuras:

Para futuras investigaciones relacionadas con este proyecto, se sugiere profundizar en el análisis de biomarcadores, tanto específicos de envejecimiento, obesidad en solitario, así como aquellos que comparten entre sí (Tabla 4). Esto permitiría caracterizar con mayor precisión la actividad biológica del extracto de granada y su impacto en estos procesos.

Tabla 4:

Obesidad	Obesidad y envejecimiento	Envejecimiento
Leptina	Insulin Growth Factor 1 (IGF-1)	Factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21)
Adiponectina	Proteína C reactiva (CRP)	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)
Resistina	Adrenomedulina (ADM)	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB)
Colecistoquinina (CCK)	Interleucina 6 (IL-6)	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
Polipéptido inhibidor gástrico (GIP)	Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α)	Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
Glucagon-like peptide (GLP-1)	Factor de crecimiento endotelial (VEGF)	Glicosilhidrolasa quimiotáctica 3 tipo 1 (CHI3L1)
Termogenina		Quimiocina (C-X-C motivo) ligando 10 (CXCL10)
Proteína morfogenética ósea 8B (BMP8B)		Factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15)
		Factor de transcripción EB (TFEB)

Además, podría incluirse el análisis de marcadores relacionados con el estrés oxidativo e inflamación para determinar el efecto del extracto en esos parámetros. Asimismo, sería interesante realizar estudios comparativos entre ratones envejecidos y ratones jóvenes para evaluar cómo el envejecimiento influye en los parámetros estudiados. Esta comparación resultaría de interés para determinar los cambios fisiopatológicos que ocurren con el desarrollo de patologías metabólicas y el impacto que tiene el envejecimiento en ellos.

7. Bibliografía:

1. Melgarejo P, Núñez-Gómez D, Legua P, Martínez-Nicolás JJ, Almansa MS. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. Vol. 102, Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd; 2020. p. 232-6.
2. Laurindo LF, Rodrigues VD, Minniti G, de Carvalho ACA, Zutin TLM, DeLiberto LK, et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) phytochemicals target the components of metabolic syndrome. Vol. 131, Journal of Nutritional Biochemistry. Elsevier Inc.; 2024.
3. Singh J, Kaur HP, Verma A, Chahal AS, Jajoria K, Rasane P, et al. Pomegranate Peel Phytochemistry, Pharmacological Properties, Methods of Extraction, and Its Application: A Comprehensive Review. Vol. 8, ACS Omega. American Chemical Society; 2023. p. 35452-69.
4. He F, Bian Y, Zhao Y, Xia M, Liu S, Gui J, et al. In vitro conversion of ellagic acid to urolithin A by different gut microbiota of urolithin metabotype A. Appl Microbiol Biotechnol. 1 de diciembre de 2024;108(1).
5. Raimundo AF, Ferreira S, Tomás-Barberán FA, Santos CN, Menezes R. Urolithins: Diet-derived bioavailable metabolites to tackle diabetes. Vol. 13, Nutrients. MDPI; 2021.
6. Selma M V., González-Sarrías A, Salas-Salvadó J, Andrés-Lacueva C, Alasalvar C, Örem A, et al. The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. Clinical Nutrition. 1 de junio de 2018;37(3):897-905.
7. Zhao H, Song G, Zhu H, Qian H, Pan X, Song X, et al. Pharmacological Effects of Urolithin A and Its Role in Muscle Health and Performance: Current Knowledge and Prospects. Vol. 15, Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
8. Lin IC, Wu JY, Fang CY, Wang SC, Liu YW, Ho ST. Absorption and Metabolism of Urolithin A and Ellagic Acid in Mice and Their Cytotoxicity in Human Colorectal Cancer Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. enero de 2023;2023(1).
9. Purnell JQ. Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. National Institutes of Health. Feingold KR. MDText.com, Inc; 2023 may.
10. Bowman-Busato J, Schreurs L, Halford JCG, Yumuk V, O'Malley G, Woodward E, et al. Providing a common language for obesity: the European Association for the Study of Obesity obesity taxonomy. International Journal of Obesity. Springer Nature; 2024.
11. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. Vol. 7, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2022.

12. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Vol. 153, Cell. Elsevier B.V.; 2013. p. 1194.
13. Alves R, Esteves C, Trelles MA. Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el envejecimiento cutáneo Intrinsec and extrinsec factors related to cutaneous aging. Cir.plást iberolatinoam. 39:1.
14. Tam BT, Morais JA, Santosa S. Obesity and ageing: Two sides of the same coin. Vol. 21, Obesity Reviews. Blackwell Publishing Ltd; 2020.
15. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Vol. 30, International Journal of Obesity. 2006. p. 400-18.
16. Maldonado E, Morales-Pison S, Urbina F, Solari A. Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress. Vol. 12, Antioxidants. MDPI; 2023.
17. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. Cells. 1 de febrero de 2022;11(3).
18. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Vol. 13, Clinical Interventions in Aging. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 757-72.
19. Freire-Regatillo A, Fernández-Gómez MJ, Díaz F, Barrios V, Sánchez-Jabonero I, Frago LM, et al. Sex differences in the peripubertal response to a short-term, high-fat diet intake. J Neuroendocrinol. 1 de enero de 2020;32(1).
20. Denisova EI, Makarova EN. Influence of leptin administration to pregnant mice on fetal gene expression and adaptation to sweet and fatty food in adult offspring of different sexes. Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii. 2024;28(3):288-98.
21. Fisher-Wellman KH, Ryan TE, Smith CD, Gilliam LAA, Lin C-T, Reese LR, et al. A direct comparison of metabolic responses to high-fat diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ mice. Diabetes. 2016;65(11):3249–61.
22. Reguero M, Gómez de Cedrón M, Sierra-Ramírez A, Fernández-Marcos PJ, Reglero G, Quintela JC, et al. Pomegranate Extract Augments Energy Expenditure Counteracting the Metabolic Stress Associated with High-Fat-Diet-Induced Obesity. Int J Mol Sci. 1 de septiembre de 2022;23(18).

8. Agradecimientos:

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, han formado parte de este camino y han contribuido a que este trabajo sea posible. En primer lugar, gracias a mis padres y a mi hermana Inés, por su apoyo incondicional, por estar siempre ahí y por animarme en cada etapa, incluso en los momentos más complicados. A la Dra. Soledad Cabeza de Vaca, por haber sido desde siempre mi referente en el mundo de la ciencia y un apoyo constante. A mis tutores, el Dr. Enrique Barraón y la Dra. María Dolores Herranz, por su orientación, su paciencia y por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto. A mi compañera de laboratorio, Isabel Serrano, ya que sin ella este proyecto no habría salido adelante, muchas gracias por hacer que las horas en el animalario se hicieran más llevaderas. Y, por supuesto, a mi amiga Patricia, por haber sido mi compañera de aventuras durante esta experiencia universitaria.

