



**Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo**

Facultad de Químico Farmacobiología



**Evaluación de la toxicidad oral aguda de los ácidos gálico
y elágico en ratas Wistar: efecto sobre la cadena de
transporte de electrones y la producción de especies
reactivas de oxígeno de las mitocondrias renales**

Tesis

Presenta:

QFB. Grecia Elena Hurtado Nuñez

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Opción: Biotecnología Alimentaria

Asesores de tesis:

Dra. María Carmen Bartolomé Camacho

Dra. Martha Estrella García Pérez

Morelia, Michoacán. Agosto de 2021

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Químico Farmacobiología y en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la Dras. María Carmen Bartolomé Camacho y Martha Estrella García Pérez, así como la colaboración del Dr. Christian Cortés Rojo.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MARCO TEÓRICO	4
II.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE TOXICOLOGÍA	4
II.1.1 La experimentación toxicológica y la toxicología regulatoria y la experimentación toxicológica	4
II.1.2 Principales ensayos toxicológicos regulados por vía oral	8
II.1.3 Métodos toxicológicos alternativos	10
II.2 NEFROTOXICIDAD	14
II.2.1 Definición	14
II.2.2 Mecanismos de nefrotoxicidad	14
II.2.3 Relación entre el daño renal, cardíaco y pulmonar como consecuencia de la exposición a agentes tóxicos	17
II.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS ÁCIDOS GÁLICO Y ELÁGICO.....	22
II.3.1 Estructura química en forma aislada y como parte de los taninos hidrolizables	22
II.3.2 Actividad Biológica	24
II.3.3 Presencia de ácidos gálico y elágico en los alimentos, productos herbolarios y suplementos nutricionales	28
II.3.4 Metabolismo y biodisponibilidad por vía oral de los ácidos gálico y elágico	32
II.3.5 Estudios toxicológicos realizados con ácido gálico y ácido elágico	39
II.4 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y NEFROTOXICIDAD	44
II.4.1 Características estructurales y funcionales de la mitocondria	44

II.4.2 Nefrotoxicidad y disfunción mitocondrial.....	54
II.4.3 Ácidos gálico y elágico y la disfunción mitocondrial.....	55
III. JUSTIFICACIÓN.....	57
IV. HIPÓTESIS.....	58
V. OBJETIVOS.....	59
V.1. Objetivo general.....	59
V.2. Objetivos específicos.....	59
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	60
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
VII.1 Estudio de toxicidad oral aguda de los ácidos gálico, elágico y la combinación.....	61
VII.1.1 Animales de experimentación.....	61
VII.1.2 Estudio de toxicidad oral aguda.....	61
VII.1.3 Determinaciones bioquímicas y hematológicas.....	62
VII.1.4 Análisis macroscópico.....	63
VII.1.5 Análisis histopatológico.....	63
VII.2 Análisis del impacto de los ácidos gálico, elágico y la combinación sobre la mitocondria renal.....	63
VII.2.1 Aislamiento de mitocondrias.....	63
VII.2.2 Determinación de las actividades de los complejos de la CTE.....	64
VII.2.3 Evaluación de la producción de ERO.....	65
VII.3 Análisis estadístico.....	65
VIII. RESULTADOS.....	66
VIII.1 Detección de signos y síntomas de toxicidad aguda de los ácidos gálico, elágico y la combinación de ambos compuestos.....	66
VIII.2 Consumo de alimento.....	66
VIII.3 Peso corporal.....	68
VIII.4 Análisis macroscópico.....	70
VIII.5 Peso relativo de los órganos.....	71
VIII.6 Resultados bioquímicos y hematológicos.....	72
VIII.7 Análisis histopatológico.....	76

VIII.8 Efecto de los ácidos gálico, elágico y su combinación sobre la actividad de los complejos de la CTE de mitocondrias de riñón.....	86
VIII.9 Efecto de los ácidos gálico, elágico y la combinación sobre la generación de ERO en mitocondrias de riñón.....	87
IX. DISCUSIÓN.....	89
X. CONCLUSIONES.....	101
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	102
XII. ANEXOS.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fases que debe seguir un ensayo toxicológico alternativo para ser validado y obtener la aceptación de las agencias regulatorias. Tomado de (26).....	12
Figura 2 Factores que afectan la toxicidad renal de un agente tóxico.....	15
Figura 3 Mecanismos fundamentales de nefrotoxicidad.....	16
Figura 4 Síndrome cardio renal tipo III. Tomado de (46).....	19
Figura 5 Interrelación entre el daño renal y pulmonar agudo. Tomado de (58).....	21
Figura 6 En el recuadro se representa la estructura química del ácido gálico. La figura en general esquematiza los diferentes conformeros del ácido gálico. Tomado de (72).....	23
Figura 7 Estructura química del ácido elágico. Tomado de (74).....	24
Figura 8 Mecanismos de acción para la formación de un radical más estable; 1) donación de un hidrógeno, 2) transferencia de un electrón. Tomado de (82).....	25
Figura 9 Algunos ejemplos de suplementos nutricionales que contienen ácidos gálico y elágico.	31
Figura 10 La absorción, metabolismo y distribución del ácido gálico (GA). Ácido 4-OMeGA, 4- O- metílico; Ácido 3-OMeGA, 3- O- metílico; H, M y L representan el contenido alto, medio y bajo de GA en los tejidos y órganos correspondientes, respectivamente; el 4-OMeGA en cajas negras representa que es el principal metabolito de GA en diferentes órganos. Tomado de (137).	34

Figura 11 Producción de urolitinas en diferentes compartimentos del aparato digestivo. Tomado de (146).....	37
Figura 12 Metabolismo de elagitaninos a urolitinas; distribución de tejidos y fluidos biológicos: (a) dimetilglucurónido; (b) glucurónidos; (c) metilglucurónidos. Las cruces designan la abundancia relativa de metabolitos (no con fines cuantitativos) en las diferentes muestras analizadas de cerdos, siendo “+” los valores más bajos y “++++” los más altos. "Trace" indican que los metabolitos se detectaron solo en algunas muestras y siempre en cantidades muy pequeñas (cerca del límite de detección). Tomado de (151).	38
Figura 13 Complejos constituyentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Complejo I (NADH-coenzima Q reductasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (coenzima Q-citocromo <i>c</i> reductasa) y Complejo IV (citocromo <i>c</i> oxidasa). Los complejos I, III y IV establecen el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial para la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Tomado de (177).....	45
Figura 14. El ciclo Q define dos sitios de reacción: oxidación de quinol (Q _o) y reducción de quinona (Q _i)	48
Figura 15 Estructura del complejo V. Tomado de (196).....	51
Figura 16 Esquema del flujo de electrones a través de los diferentes complejos que integran la CTE mitocondrial. En rojo, puntos de formación de ERO. Tomado y modificado de (180)....	53
Figura 17 Estrategia metodológica empleada en el presente trabajo.....	60
Figura 18. Consumo de alimento de los animales tratados con ácido gálico, ácido elágico y la combinación los días 0, 7 y 14 después de la administración. El gráfico muestra la media ± error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía con prueba de Tukey post hoc, (p <0.05) n=30. Los (*) representan las diferencias estadísticas significativas.	67
Figura 19. Peso corporal de los animales tratados con ácido gálico, elágico y la combinación los días 0, 7 y 14 después de la administración. El gráfico muestra la media ± error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía con prueba de Tukey post hoc, (p <0.05) n=30. Los (*) representan las diferencias estadísticas significativas.	69
Figura 20. Análisis macroscópico de los pulmones 14 días después de la administración con ácido elágico. Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D).	70

Figura 21. Análisis macroscópico. Desgarre pericárdico en los animales tratado con ácido elágico a los 14 días después de la administración. Control (A), Rata 1 (B) 2000 mg/kg, Rata 2 (C) 2000 mg/kg.....	71
Figura 22 Hallazgos histopatológicos a nivel renal después de la exposición aguda al ácido gálico, elágico y la combinación. Panel 1. Ácido gálico. Grupo control (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Ácido elágico y la combinación. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) y combinación (I). La Hiperplasia de glomérulo se presenta en forma dosis-dependiente solamente para ácido gálico y elágico.	80
Figura 23 Hallazgos histopatológicos a nivel renal después de la exposición aguda al ácido elágico y la combinación. Panel 1. Necrosis glomerular. Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) dosis 2000 mg/kg (D). y combinación (E). Panel 2. Glomérulos sin el penacho glomerular. Vehículo DMSO (F), dosis 200 mg/kg (G), dosis 1000 mg/kg (H) dosis 2000 mg/kg (I), y combinación (J).	81
Figura 24 Histopatología de corazón de los animales tratados con ácido gálico, elágico y la combinación. Panel 1. Ácido gálico. Grupo control (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Ácido elágico y la combinación. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) y combinación (I). La necrosis coagulativa se presentó en forma dosis dependiente, solamente en los tratamiento con ácido gálico y elágico.	82
Figura 25 Histopatología de corazón de los animales tratados con ácido elágico. Panel 1. Necrosis licuefactiva. Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Bandas de contracción. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) La necrosis licuefactiva se presentó en forma dosis dependiente, solamente en el tratamiento con ácido elágico.....	83
Figura 26 Histopatología de corazón de los animales tratados con ácido elágico. Panel 1. Vehículo DMSO (A), Hiperplasia de pericardio, dosis 1000 mg/kg (B) y dosis 2000 mg/kg (C). Edema de pericardio, dosis 200 mg/kg(C), dosis1000 mg/kg (D), y dosis 2000 mg/kg (F)	84
Figura 27 Histopatología pulmonar de los animales tratados con ácido gálico, elágico y la combinación. Panel 1. Ácido gálico. Grupo control (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg	

(C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Ácido elágico y la combinación. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) y combinación (I).85

Figura 28 Efecto de los ácidos gálico, elágico y su combinación, sobre la actividad de los complejos I, II, III y IV de la CTE de mitocondrias de riñón. Los datos se presentan como la media \pm EE $n > 5$. ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).....87

Figura 29. Efecto de los compuestos fenólicos ácido gálico, ácido elágico y su combinación en los niveles de ERO de mitocondrias renales. Como sustratos se utilizaron glutamato-malato (A), succinato (B) y succinato + rotenona (C). Los niveles de ERO se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f.). Los datos se presentan como la media \pm EE de $n \geq 5$. $P < 0.05$ (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Dunn's) utilizando el software Sigma Plot v11.0..88

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Métodos alternativos aceptados internacionalmente para medir la toxicidad aguda por vía oral. Tomado de (30).	13
Tabla 2. Contenido total de ácido gálico y elágico en los alimentos.....	28
Tabla 3. Plantas medicinales con contenido de ácido gálico o ácido elágico.	30
Tabla 4. Influencia de los ácidos gálico, elágico y la combinación sobre el peso relativo de los órganos de las ratas Wistar.	72
Tabla 5. Efectos de la administración oral aguda de los ácidos gálico, elágico y la combinación, sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos de ratas Wistar.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

- **Acetil-CoA**- Acetil coenzima A
- **ADH** - Hormona antidiurética
- **ADN**- Ácido desoxirribonucleico
- **ADP**- Difosfato de adenosina
- **AINE**- Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos
- **ALP**- Fosfatasa Alcalina
- **AMG**- Aminoglucósidos
- **ATP**- Trifosfato de adenosina
- $\Delta\Psi$ - Potencial de membrana
- **BPL** – Buenas Prácticas de Laboratorio
- **BraCVAM** - Centro Brasileño de Validación de Métodos Alternativos
- **BUN**- Nitrógeno ureico en la sangre
- **CC**- Conductos colectores
- **CI₅₀** - Concentración inhibitoria media
- **C_{max}** - Concentración máxima
- **COX-1** - Ciclooxigenasa 1 o prostaglandina-endoperóxido sintasa 1
- **COX-2** - Ciclooxigenasa 2 o prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
- **CYP₄₅₀** - Citocromo P450
- **DAG** - Diacilglicerol
- **DCFH** - 2', 7'-diclorofluoresceína
- **DCIP** - 2,6-diclorofenolindofenol
- **DL₅₀** – Dosis letal 50
- **DL_{min}** - Dosis letal mínima
- **ECVAM** - Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos
- **ED₁₀** - Dosis efectiva 10
- **EPA** - Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América
- **ERC** - Enfermedad renal crónica
- **ERO** – Especies reactivas de oxígeno
- **FAD²⁺** – Dinucleótido de flavina adenina oxidado
- **FADH₂** – Dinucleótido de flavina adenina reducido
- **FDA** - Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América
- **FMN** - Mononucleótido de flavina
- **FRA** - Falla renal agudo

- **GGT** - Gamma glutamil transpeptidasa
- **GPX** - Glutación peroxidasa
- **GSH** - Glutación reducido
- **H₂DCFDA** - Diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
- **HAT** - Transferencia de un átomo de hidrógeno
- **HEPES** - Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
- **HHDP** - 3,4,5,3',4',5'-hexahidroxidifenol
- **IBP** - Inhibidores de la bomba de protones
- **ICCVAM** - Comité Coordinador Interagencial de Validación de Métodos Alternativos
- **IDA**- Ingestas diarias admisibles
- **IECA** – Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensinógeno
- **IL-1** - Interleucina-1
- **IL-6** - Interleucina-6
- **IP₃** - Inositol trifosfato
- **IRA** - Lesión renal aguda
- **JSAAE** - Sociedad Japonesa de Alternativas a los Experimentos con Animales
- **KoCVAM** - Centro Coreano para la Validación de Métodos Alternativos
- **LOAEL** - Nivel de mínimo efecto tóxico observable
- **MBT** - Membrana basal tubular
- **MDA** - Malondialdehído
- **MIA PANC-1** - Líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano
- **MIH** - Hepatotoxicidad inducida por metotrexato
- **MOPS** - Ácido 4-morfolinpropanosulfónico
- **MTD** - Dosis máxima tolerable
- **MtDNA** – ADN mitocondrial
- **Na⁺/K⁺-ATPasa** – Bomba de sodio-potasio
- **NADH** - Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
- **NF-K β** - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- **NOAEL** - Nivel sin efecto adverso observable
- **OCDE** - Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
- **OMeGA** – Orto-metil-gálico
- **OMS** - Organización Mundial de la Salud
- **PAF** - Factor activador de las plaquetas

- **PGE2** - Prostaglandina E2
- **PGG** Pentagaloil glucosa
- **PGI2** - Prostaciclina
- **PI3K/AKT/NF-κB** - Fosfoinositido 3-quinasa (PI3K) / proteína quinasa B (Akt) y factor nuclear-kappa B (NF- κ B).
- **PIP3** - Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
- **PKC** - Proteína cinasa C
- **RDW** - Ancho de distribución de glóbulos rojos
- **SET** - Transferencia de un solo electrón
- **SOD** – Superóxido dismutasa
- **SRC** - Síndrome cardiorrenal
- $t_{1/2 \alpha}$ - Tiempo de vida media α
- $t_{1/2 \beta}$ - Tiempo de vida media β
- **TCD** - Túbulos contorneados distales
- **TCP** - Túbulos contorneados proximales
- **TFG** - Tasa de filtración glomerular
- **TGO** - Aspartato aminotransferasa
- **TGP** - Alanina-aminotransferasa
- t_{\max} – Tiempo máximo
- **UQ** - Ubiquinona
- **UQ_D** – Ubiquinona distal
- **UQ_P** – Ubiquinona proximal
- **VGM** – Volumen globular medio
- **α -MSH** - Hormona estimulante de los melanocitos alfa

RESUMEN

Los ácidos gálico (GA) y elágico (AE) son compuestos fenólicos que coexisten en frutas, verduras y plantas medicinales. En los últimos años la Food and Drug Administration (FDA) ha alertado sobre el uso indiscriminado de altas concentraciones de suplementos alimenticios de estos productos con base en supuestas atribuciones de efectos beneficiosos para la salud. El presente estudio investigó la toxicidad oral aguda de estos compuestos (200, 1000 y 2000 mg/kg), así como de su combinación (1000 mg/kg GA + 1000 mg/kg AE) en ratas Wistar siguiendo la guía 423 de la OCDE. Los compuestos fueron administrados por vía oral en dosis única. Se determinó el peso corporal, el consumo de alimento, el peso relativo de los órganos y se realizaron análisis bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Además, se analizó el impacto de las máximas dosis sobre la actividad de los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria renal y su influencia sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). No se produjeron muertes ni alteraciones de signos clínicos con ninguno de los tratamientos estudiados. El AE produjo una disminución de la coloración de los pulmones y desgarre pericárdico, mientras que el GA (2000 mg/kg) generó disminución del peso relativo de los riñones. Tanto el GA como la combinación generaron un incremento significativo en el conteo de plaquetas, mientras que el AE y la combinación provocaron un incremento significativo de la urea y el AE provocó un aumento en los niveles de la creatinina. A nivel histopatológico se confirmó la presencia de daño renal, cardíaco y pulmonar relacionado con los tres tratamientos, aunque la intensidad del daño varió según el tipo de sustancia. El AE resultó ser el compuesto más nefrotóxico y cardiotoxico, mientras que el GA provocó mayores efectos deletéreos sobre el pulmón. La combinación atenuó estos efectos nocivos. Los resultados mostraron una inhibición de la actividad de los complejos II, III y IV con todas las sustancias de estudio. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para los diferentes tratamientos en cuanto a la medición de ERO. En síntesis, estos resultados demuestran que tanto el GA, AE y su combinación poseen un potencial intrínseco deletéreo no despreciable, por lo que su consumo a dosis elevadas (≥ 200 mg/kg) debe ser regulado para evitar complicaciones derivadas de su toxicidad renal, cardíaca y pulmonar.

Palabras clave: ácido gálico, ácido elágico, mitocondria, riñón, toxicidad.

ABSTRACT

Gallic (GA) and ellagic (AE) acids are phenolic compounds that coexist in fruits, vegetables, and medicinal plants. In recent years, the Food and Drug Administration (FDA) has warned about the indiscriminate use of high concentrations of nutritional supplements of these products based on alleged attributions of beneficial health effects. The present study investigated the acute oral toxicity of these compounds (200, 1000, and 2000 mg/kg), as well as their combination (1000 mg/kg AG + 1000 mg/kg AE) in Wistar rats following OECD guideline 423. The compounds were administered orally in a single dose. Bodyweight, food consumption, and relative organ weight were determined, and biochemical, hematological, and histopathological analyzes were performed. In addition, the impact of the maximum doses on the activity of the four complexes of the electron transport chain in the renal mitochondria and their influence on the production of reactive oxygen species (ROS) were analyzed. There were no deaths or changes in clinical signs with any of the treatments studied. The AE produced a decrease in the coloration of the lungs and pericardial tear, while the GA (2000 mg/kg) caused a decrease in the relative weight of the kidneys. Both the GA and the combination generated a significant increase in platelet count, while the AE and the combination caused a significant increase in urea, and the AE caused the increase of creatinine levels. The presence of kidney, heart, and lung damage related to the three treatments was confirmed by the histopathological analysis, although the intensity of the damage varied according to the type of substance. AE was considered to be the most nephrotoxic and cardiotoxic compound, while GA caused the highest deleterious effects on the lung. The combination attenuated these harmful effects. The results showed an inhibition of the activity of complexes II, III, and IV with all the substances. However, no statistically significant differences were observed for the different treatments in terms of ROS measurement. In summary, these results show that both GA, AE, and their combination have a non-negligible intrinsic deleterious potential, so their consumption at high doses (≥ 200 mg/kg) must be regulated to avoid complications related to their renal, cardiac, and pulmonary toxicity.

Keywords: gallic acid, ellagic acid, mitochondria, kidney, toxicity.

I. INTRODUCCIÓN

Los ácidos gálico y elágico son compuestos fenólicos que se encuentran en grandes concentraciones en el té verde y en productos alimenticios como el mango, la granada, los arándanos, las nueces y las uvas, donde en muchos casos coexisten por lo que pueden ser ingeridos al mismo tiempo como parte de la dieta (1). Ambos compuestos son muy reconocidos por sus propiedades biológicas, notablemente como antioxidantes. En los últimos años se ha incrementado la venta de suplementos nutricionales de ambas moléculas sobre la base de sus supuestos efectos beneficiosos para la salud, lo que ha preocupado a agencias regulatorias en materia de medicamentos y alimentos como la FDA quien ha advertido sobre los efectos nocivos que el uso descontrolado de estos productos pudiera ocasionar a la población (2). El uso indiscriminado de suplementos nutricionales, ligado con el consumo de frutas, verduras, té, así como plantas medicinales podría generar un incremento en su ingesta total conduciendo a la aparición de eventos adversos e intoxicaciones.

Uno de los órganos que más puede afectarse bajo la acción de los compuestos fenólicos es el riñón (3). La nefrotoxicidad afecta la función renal generando cambios hemodinámicos, daño directo a células y tejidos, daño tisular inflamatorio y obstrucción de la excreción renal. El riñón requiere una gran cantidad de ATP para eliminar los desechos de la sangre y regular el equilibrio electrolítico. Las mitocondrias proporcionan el ATP necesario para impulsar estas funciones, siendo el sitio de acción de muchas nefrotoxinas que generan deterioro de la función mitocondrial (4–6), inhibiendo la actividad de los complejos pertenecientes a la cadena de transporte electrónico (7,8) y afectando la fosforilación oxidativa con la consiguiente disminución en la producción de ATP (9,10).

Dado el incremento en el consumo de los ácidos gálico y elágico, se hace necesario estudiar el potencial intrínseco tóxico de ambas moléculas solas y en combinación a concentraciones elevadas, conocer su impacto sobre órganos diana como el riñón y su relación con la función mitocondrial. Lo anterior con vistas a comprender los mecanismos de toxicidad de ambos compuestos en aras de anticipar soluciones ante posibles intoxicaciones derivadas del consumo excesivo de ambas moléculas por parte de la población.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE TOXICOLOGÍA

II.1.1 La experimentación toxicológica y la toxicología regulatoria y la experimentación toxicológica

II.1.1.1 Objetivos básicos de la experimentación toxicológica

Entre los objetivos principales de la experimentación toxicológica se encuentra la contribución al conocimiento de los peligros, o capacidad para producir un daño de las sustancias; de los efectos tóxicos provocados y de su reversibilidad; de los mecanismos moleculares y de las dianas biológicas sobre las que actúan. Del mismo modo, la toxicología experimental regulatoria estudia la susceptibilidad tóxica de especies, sexos y grupos poblacionales; así como la cinética y el metabolismo del agente tóxico en los organismos y en el ambiente para finalmente integrar toda la información disponible en la estimación del riesgo que conlleva su utilización a través del establecimiento de los niveles de seguridad en la exposición a las mismas que en definitiva se traduce en la predicción de las consecuencias de la interacción de los xenobióticos con los seres vivos (11).

A diferencia de la mayoría de las disciplinas experimentales, existen normativas muy rígidas que deben ser seguidas en la experimentación toxicológica con fines reguladores, que exigen la evaluación de las sustancias con diferentes requerimientos según su uso previsto, aplicando protocolos de ensayo estandarizados (12). Una de las fuentes principales que proporciona información sobre las propiedades toxicológicas y la cinética de las sustancias químicas es la experimentación con modelos biológicos; estos constituyen las unidades experimentales de los estudios toxicológicos *in vivo*, y su empleo está regido por regulaciones con vistas a un adecuado uso, según los requerimientos del estudio y tomando en cuenta principios éticos. La selección de los diferentes ensayos toxicológicos, especies, tiempo y vía de exposición, así como de los niveles de dosis a emplear en los mismos, dependerán de los objetivos del ensayo y las características propias de la sustancia a investigar, así como el uso pretendido en seres humanos (12,13).

II.1.2.2 Principios de la experimentación toxicológica

La experimentación toxicológica se fundamenta en una serie de principios básicos que se exponen a continuación:

1° Es posible reproducir experimentalmente en animales la mayoría de los procesos tóxicos que permita después modelar su acción en los humanos.

Evidentemente existen excepciones, unas debidas a que el proceso es de origen idiosincrásico y precisa que un individuo posea unas características especiales que lo hagan mucho más sensible que el resto de la población, o bien a que el mecanismo de acción precise de la concurrencia de una serie de circunstancias especiales, a veces desconocidas, muy difíciles de reproducir, como ocurre en algunos procesos inmunitarios (12).

Por ejemplo, cuando un efecto no aparece en ninguna de las dos primeras especies, tampoco lo hará en el hombre, pero si el tóxico afecta a una sola de aquéllas, también afectará al hombre. Independientemente de todos los factores diferenciales ligados a la especie, debe tenerse en cuenta que gran parte de las observaciones que se extraen de los animales no son, generalmente, los síntomas (manifestaciones de las alteraciones fisiopatológicas) de la intoxicación, sino sólo los signos, es decir, los síntomas perceptibles por un observador (12). Por ello, muchas reacciones que fácilmente se producen en el hombre, como dolores, náuseas, vértigos, trastornos visuales, fotosensibilidad, tinnitus etc., no pueden detectarse en los animales. Es conveniente insistir en que los ensayos de toxicidad no se diseñan para demostrar que un compuesto es seguro, sino para caracterizar los efectos que puede producir, posteriormente esos datos servirán para caracterizar su riesgo (14).

2° La aplicación de dosis altas de tóxicos en animales es un procedimiento útil para descubrir posibles peligros para el hombre.

El número de individuos sobre los que se realiza la experimentación está limitado en la práctica en comparación con las amplias poblaciones que estarán expuestas. Por ello, para obtener resultados estadísticamente válidos es preciso emplear dosis suficientemente altas para que los efectos ocurran con la suficiente frecuencia para ser detectados. Lógicamente ello se fundamenta en que existe una correlación directa entre la dosis aplicada y los efectos observados, aunque la pendiente y la forma de la relación dosis-efecto pueden ser distintas para los diferentes tóxicos. Por ello, al aumentar la dosis se incrementan los efectos observados. Parece ser que las

diferencias inter-especie se deben fundamentalmente a variaciones toxicocinéticas y de biotransformación de los tóxicos, y aunque se pueden encontrar distintos metabolitos en la orina de animales de diferentes especies, se ha visto que lo que más varía entre éstas es la proporción de proteínas séricas transportadoras, la biodisponibilidad y la vida media de eliminación. Sin embargo, cuando se administran grandes dosis, los mecanismos cinéticos se saturan y las diferencias tóxicas entre especies se acortan (11,14).

3. Es posible extrapolar cuantitativamente a humanos muchos de los efectos tóxicos observados en animales.

Profundas investigaciones se han realizado para tratar de determinar la correlación entre la toxicidad animal y la humana, concluyendo que ningún animal, ni siquiera el primate, responde a los tóxicos exactamente igual que el hombre. A pesar de ello, hay evidencia de que la mayoría de los efectos que experimentan los animales de laboratorio por la acción de los xenobióticos los manifiesta también el hombre, y a la inversa. En general, las diferencias son más de tipo cuantitativo que cualitativo (14). Existe una correlación entre las dosis letales calculadas en animales y en el ser humano. Lo que resulta válido siempre que se utilicen al menos tres o cuatro especies de mamíferos, para considerar las variaciones inter-especie. Desde el punto de vista cuantitativo, los humanos se encuentran en el mismo rango de toxicidad de los animales si ésta se expresa con relación a la superficie corporal. Sin embargo, cuando se expresa en función del peso corporal, los humanos son aproximadamente diez veces más sensibles a los tóxicos que los animales (14).

4º Es posible reproducir in vitro determinados efectos tóxicos manifestados in vivo.

Según la hipótesis de la toxicidad basal la mayoría de los tóxicos provocan toxicidad aguda por interferencia en los mecanismos celulares comunes a la mayoría de las células. Ello implica que los efectos tóxicos se manifestarán en la mayoría de los tipos celulares, y que pueden estudiarse *in vitro*, con algunas limitaciones. Por consiguiente, es posible utilizar modelos *in vitro* para investigar mecanismos muy específicos de acción, como la unión a receptores, la inhibición de enzimas, etc (14). Se ha propuesto una variedad de procedimientos *in vitro* como alternativas a la DL₅₀. Existe una base de datos denominada *Registro de Citotoxicidad*, que contiene 1912 concentraciones inhibitorias de sustancias seleccionadas de centenares de estudios *in vitro* y las DL₅₀ de 347 compuestos. En base a esto es posible la predicción de la DL₅₀ *in vivo* a partir de

datos obtenidos *in vitro* utilizando la concentración inhibitoria media (CI₅₀). La relación viene dada por la siguiente función (14):

$$\log (DL_{50}) = 0,435 \times \log (CI_{50}) + 0,625 \text{ expresado en mmol}$$

5° Pueden emplearse determinadas especies animales o vegetales como representantes de los efectos tóxicos en otras especies

Para extrapolar los resultados al hombre se procura emplear una especie con similar sensibilidad para cada tipo particular de efecto tóxico, aunque esto es condicionado además por cuestiones prácticas. Sin embargo, en los estudios medioambientales es imposible evaluar los compuestos en todas las especies existentes, por lo que se seleccionan varias de cada nivel trófico como representantes de grandes grupos de organismos. Las usadas como centinelas suelen escogerse atendiendo a su sensibilidad, disponibilidad y facilidad de mantenimiento y uso (12,14).

II.1.2.3 Tipos de investigaciones toxicológicas experimentales

Según su finalidad, podemos establecer tres tipos de investigaciones toxicológicas experimentales: a) las reguladas, b) la no reguladas y c) las actividades de enseñanza y formación.

La investigación toxicológica regulada o reglamentada, generalmente denominada como pretende la clasificación de las sustancias y la evaluación del riesgo de estas. Se realiza para satisfacer los requerimientos legislativos, fundamentalmente para el registro (previo a la autorización para su comercio) de sustancias, medicamentos o el control de contaminantes. Incluye la evaluación de los peligros que supone la exposición a los mismos, es decir, la capacidad tóxica (o toxicidad intrínseca) de esas sustancias por exposición aguda, subcrónica y crónica, y el establecimiento de la relación dosis efecto, calculando la dosis letal media (DL₅₀) en casos agudos o el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) en los casos de dosis repetidas, además del estudio de su cinética y metabolismo en el organismo, así como de su degradación ambiental (15,16).

La investigación toxicológica no regulada no está impuesta por normativas y puede dividirse en básica y en aplicada. La investigación básica tiene como finalidad esencial la búsqueda del conocimiento en sí mismo, sin implicaciones prácticas directas (17). La investigación aplicada está dirigida a contestar preguntas con un objetivo práctico, como pudiera ser la selección o el

tamizado de nuevas sustancias, comparando la actividad biológica de las mismas. Además, se realiza el diagnóstico o la monitorización de la presencia de sustancias por sus efectos (17). Finalmente existe un tipo especial de experimentación toxicológica cuya finalidad no es investigar para obtener nuevos conocimientos, sino que surge como procedimiento complementario en la enseñanza y formación de estudiantes y profesionales (17).

II.1.2.4 La toxicología regulatoria

En relación con lo expuesto anteriormente, es preciso destacar que la toxicología regulatoria ha llegado a ser una de las disciplinas científicas que está dando origen en nuestros días a mayor cantidad y diversidad de normativas legales (12). Deben citarse las normativas para la clasificación por toxicidad de las sustancias químicas y los estudios toxicológicos exigidos para que sea autorizada la comercialización de medicamentos, plaguicidas, productos cosméticos, domésticos o industriales, etc (18). Muchas de las disposiciones proceden, en Europa, de las directrices de la Comisión de la Unión Europea, y la Organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE), mientras que en América la FDA (*Food and Drug Administration*, en inglés) tiene sus propias directivas, aunque también se acepta la normatividad de la OCDE. Todas las agencias reguladoras poseen un comité científico asesor en materia de toxicología y ecotoxicología, que evalúa los riesgos sanitarios y medioambientales, integrado por expertos en estas áreas quienes actualizan las directrices y elaboran informes que deben ser acatadas e incluidos en legislación nacional (12). La toxicología regulatoria concibe su empleo con fines legislativos, para minimizar el riesgo que los agentes físicos y químicos representan para los seres vivos.

II.1.2 Principales ensayos toxicológicos regulados por vía oral

En dependencia del número de dosis administradas, tiempo de exposición y objetivo del estudio, estos pueden clasificarse en: estudios de dosis única, de dosis repetida y estudios de toxicología especial.

III.1.2.1 Estudios de dosis únicas

Dentro de este tipo de estudios se encuentran los estudios de toxicidad aguda que evalúan la toxicidad inducida por el fármaco sujeto a estudio como resultado de la administración de altas dosis, ya sea por la administración única o repetida en un intervalo no mayor de 24 horas,

brindando información sobre la toxicidad intrínseca del producto y el posible riesgo que conlleva su exposición aguda. Además, aporta valiosa información para la selección de los niveles de dosis a emplear en los estudios a dosis repetida y permite anticipar acciones ante intoxicaciones debido a la ingesta en altas dosis de las sustancias en estudio (19).

III.1.2.2 Toxicidad por exposición repetida o prolongada

Aunque los estudios de toxicidad aguda aportan la información básica necesaria para el diseño de los estudios a dosis repetida, fundamentalmente en cuanto a la selección de la dosis y el refinamiento de las observaciones y determinaciones sobre órganos diana en particular, estos no pueden evaluar el riesgo asociado a la administración continua de un determinado compuesto. De este modo, a los resultados de los estudios de dosis única le sigue la realización de diseños subagudos, subcrónicos y crónicos, los que a diferencia de los estudios agudos emplean varias dosis por un intervalo específico de tiempo (20).

Estudios Subagudos

Los estudios subagudos se definen como los efectos tóxicos que se manifiestan tras la administración repetida de una sustancia durante un corto período de tiempo, generalmente entre 14 y 30 días. Este ensayo tiene como objetivo obtener información para la selección de los niveles de dosis que serán empleados en los estudios subcrónicos y crónicos, así como la identificación de los efectos tóxicos que pudieran aparecer bajo estas condiciones de experimentación (20).

Estudios Subcrónicos

La toxicidad subcrónica se define como los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa, aproximadamente, el 10 % de la vida del animal. Esto propicia la detección de los efectos aditivos debido a la administración del producto, y permite definir la máxima dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con el xenobiótico (NOAEL), así como la dosis máxima tolerada (DMT). El estudio subcrónico no es capaz de detectar aquellos efectos que se manifiestan tras un mayor período de latencia; sin embargo, brinda una valiosa información sobre los órganos diana, y constituye la base para la selección de los niveles de dosis a evaluar en los estudios crónicos (20).

Estudios Crónicos

Los ensayos crónicos se realizan con el objetivo de determinar el potencial toxicológico de la sustancia luego de una prolongada y repetida administración. El tiempo de administración varía para especies roedoras y no roedoras. Así, en roedores es entre 6 y 12 meses, y en no roedores de 9 y 12 meses, períodos suficientes como para que se manifieste el efecto tóxico de una sustancia por su uso crónico. En estos estudios es conveniente poder determinar la relación dosis respuesta y la NOAEL; los niveles de dosis a utilizar se seleccionan de acuerdo a toda la información fármaco-toxicológica precedente (20,21).

III.1.2.3 Carcinogenicidad y mutagenicidad

En los ensayos de carcinogenicidad el objetivo es conocer la capacidad de la sustancia de inducir cáncer. El ensayo por dosis repetidas en rata y ratón de ambos sexos con análisis anatomopatológico completo es el procedimiento básico para evaluar la capacidad carcinogénica durante año y medio a dos años (22). Sin embargo, este ensayo requiere mucho tiempo, dedicación, es muy costoso y exige un gran número de animales, más de 400 animales por cada una de las dos especies empleadas. Además, su extrapolación al hombre es compleja. Otra opción es realizar estudios combinados de toxicidad crónica con carcinogenicidad. En la actualidad se están proponiendo nuevos modelos de carcinogenicidad con animales transgénicos, que presentan la ventaja de precisar menor tiempo de exposición para desarrollar los tumores (23).

III.1.2.4 Toxicidad para la reproducción y el desarrollo

La reproducción y el desarrollo comprenden una compleja sucesión de procesos fisiológicos encadenados desde la producción de los gametos, la fertilización, la implantación, la organogénesis, el desarrollo fetal, el desarrollo postnatal y la maduración sexual. La toxicología de la reproducción incluye el estudio de los trastornos sobre la fertilidad de los padres y sobre el desarrollo de los hijos. La toxicología del desarrollo comprende los efectos inducidos o manifestados en la época prenatal, así como los que aparecen tras el nacimiento (12).

II.1.3 Métodos toxicológicos alternativos

El término “toxicología alternativa” describe cualquier cambio, en los protocolos oficiales clásicos, que pueda derivar en el refinamiento de las técnicas con el fin de disminuir el estrés y

evitar el sufrimiento infringido a los animales. Además, estos métodos persiguen el reemplazo de los animales de experimentación por sistemas que no requieran seres vivos o bien emplean otras especies inferiores en la escala filogenética. En los casos en que un reemplazo total no es posible, la reducción del número de animales empleado en cada ensayo es una alternativa válida (24). Aunque la comunidad científica admite sin reservas la utilidad de estos métodos, solo una pequeña cantidad se encuentra aceptada por las entidades reguladoras para ser utilizados en la evaluación del riesgo y el registro de un nuevo compuesto, puesto que es necesario que el protocolo haya sido validado científicamente y se haya demostrado que es tan seguro y fiable como el método *in vivo* clásico que pretende reemplazar (25).

Existen varios organismos encargados de la validación de métodos alternativos. Entre ellos se destacan el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), Comité Coordinador Interagencial de Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM), Sociedad Japonesa de Alternativas a los Experimentos con Animales (JSAAE) y más recientemente, Centro Coreano para la Validación de Métodos Alternativos (KoCVAM) y el Centro Brasileño de Validación de Métodos Alternativos (BraCVAM). Todos ellos promueven la aceptación científica y reguladora de los ensayos sin animales, mediante la investigación, el desarrollo y validación de métodos y el establecimiento de su uso sobre bases científicas (26).

El proceso de validación de métodos alternativos garantiza que estos sean eventualmente aceptados por las autoridades reguladoras para que formen parte del arsenal de ensayos usados en toxicología regulatoria (27). La validación es un proceso basado en principios científicos que demuestran la fiabilidad y relevancia de un ensayo, método o proceso desarrollado para un propósito específico (28). La fiabilidad es una medida objetiva que garantiza la reproducibilidad dentro de un laboratorio, cuando el ensayo se ha realizado siguiendo un protocolo estandarizado, pero también en otros laboratorios del mundo. Mientras que la relevancia de un método de ensayo que describe la relación entre los efectos tóxicos medidos y los biológicos en las especies afectadas. Esta relación se denomina modelo de predicción. El método alternativo ideal debe medir un hecho tóxico que sea lo más parecido posible al mecanismo de acción propuesto o bien se relacione con el efecto que interesa evaluar. Igualmente, los resultados obtenidos a partir del método alternativo que se pretende validar se deben correlacionar con el contexto real relacionado con la salud humana, animal o aspectos ecológicos. Además, para que un nuevo método de ensayo toxicológico se considere validado debe cumplir una serie de criterios de

validación que permitan definir perfectamente las características del ensayo, con sus ventajas y limitaciones (29). La Figura 1 muestra las diferentes etapas que debe seguir un método toxicológico alternativo para ser validado y autorizado por las agencias regulatorias. Una vez que un método ha sido científicamente validado, entra al proceso de aceptación regulatoria y adopción como directriz, lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración de riesgo (29).

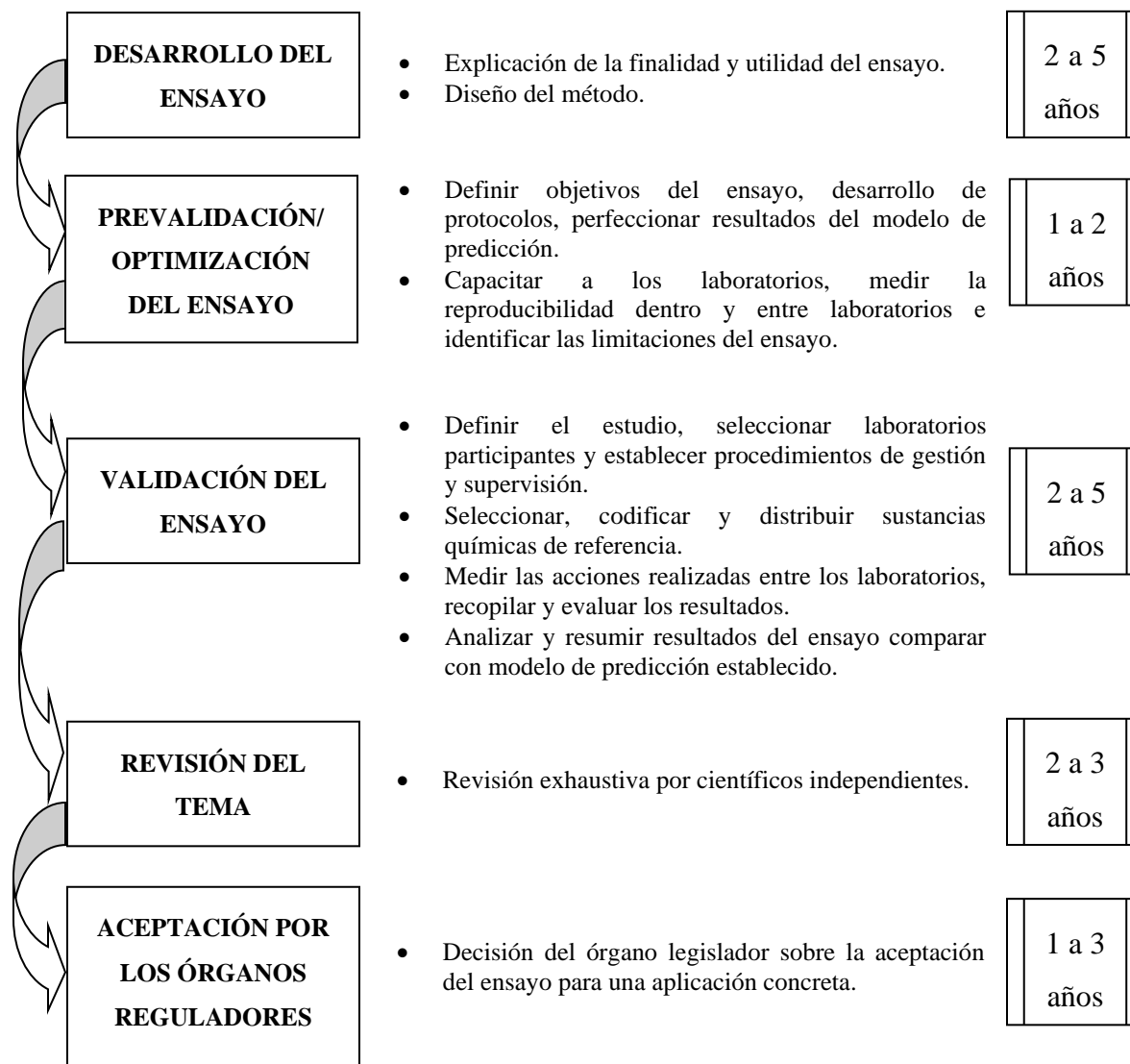


Figura 1 Fases que debe seguir un ensayo toxicológico alternativo para ser validado y obtener la aceptación de las agencias regulatorias. Tomado de (26).

La tabla 1 muestra algunos métodos toxicológicos alternativos para medir la toxicidad aguda por vía oral que han sido ya aceptados por la OCDE.

Tabla 1 Métodos alternativos aceptados internacionalmente para medir la toxicidad aguda por vía oral. Tomado de (30).

MÉTODO	ENSAYO	ACEPTACIÓN REGULADORA
Toxicidad aguda oral		
Método de clases de toxicidad	<i>In vivo</i>	OCDE TG 423 (2001)
Método de dosis fija	<i>In vivo</i>	OCDE TG 420 (2001)
Procedimiento arriba-abajo	<i>In vivo</i>	OCDE TG 425 (2006)
Ensayo de respuesta de queratinocitos normales humanos al rojo neutro (NHK NRU)	<i>In vitro</i>	OCDE GD 129 (2010)
Ensayo de respuesta al rojo neutro Balb/c 3T3	<i>In vitro</i>	OCDE GD 129 (2010)

III.1.4.1 El método de clases de toxicidad para evaluar la toxicidad aguda por vía oral

El método de clases de toxicidad es un método toxicológico alternativo publicado por la OCDE en 2001 (Guía 423) que puede emplearse en sustitución al método clásico para clasificar a las sustancias por su peligrosidad dada su capacidad inherente de generar daño. En la actualidad, a diferencia de lo que sucedía con los métodos toxicológicos clásicos, no se hace necesario esforzarse en obtener la DL_{50} con gran precisión, siendo suficiente conocer el rango de toxicidad de la sustancia, lo que simplifica el estudio y disminuye el número de animales empleados (31). A esta consideración se unen dos estimaciones que reducen el margen de interés de la DL_{50} : a) Una DL_{50} inferior a 25 mg/kg es tan fuertemente tóxica, que no merece la pena determinarla con mayor exactitud; b) DL_{50} superiores a 5000 mg/kg representan tan baja toxicidad aguda, que tampoco deben ser investigadas con exactitud (31).

El método de la clase de toxicidad aguda es un procedimiento escalonado con el uso de 3 animales roedores preferentemente hembras. Dependiendo de la mortalidad y/o el estado

moribundo de los animales, puede ser necesario un promedio de 2 a 4 pasos para poder juzgar la toxicidad aguda de la sustancia de ensayo (31). Este procedimiento es reproducible, utiliza muy pocos animales y puede clasificar las sustancias de manera similar a los otros métodos de prueba de toxicidad aguda (Prueba No. 420: Método de dosis predeterminado y Prueba No. 425: Método de ajuste de dosis). El método de clasificación de toxicidad aguda se basa en evaluaciones biométricas con dosis fijas, adecuadamente separadas para permitir que una sustancia pueda clasificarse y evaluarse teniendo en cuenta su riesgo de generar un efecto deletéreo (32). El método adoptado en 1996 fue ampliamente validado *in vivo* contra datos de LD₅₀ obtenidos de la literatura, tanto a nivel nacional como internacional (33)

II.2 NEFROTOXICIDAD

II.2.1 Definición

La nefrotoxicidad se define como un rápido deterioro de la función renal debido al efecto tóxico de medicamentos, productos químicos y contaminantes ambientales. Estos pueden afectar la función renal generando cambios hemodinámicos, daño directo a células y tejidos, daño tisular inflamatorio y/u obstrucción de la excreción renal. Diferentes mecanismos conducen a la nefrotoxicidad, que incluyen toxicidad tubular renal, inflamación, daño glomerular, nefropatías y vasculopatías (34,35).

II.2.2 Mecanismos de nefrotoxicidad

Son múltiples los factores que determinan la actividad de un agente nefrotóxico desde la dosis utilizada hasta la susceptibilidad relativa de las células, que puede aumentar cuando se encuentran expuestas a determinadas condiciones fisiopatológicas o patológicas, como la isquemia (Figura 2) (36,37). El riñón es particularmente vulnerable a la acción de fármacos y toxinas, por ser el órgano que recibe mayor irrigación por gramo de tejido. Distintos segmentos de la nefrona pueden estar expuestos a los efectos de un xenobiótico o de sus metabolitos, dependiendo de los diferentes mecanismos que median su eliminación. Ciertos xenobióticos se secretan en las células del túbulo proximal a través del sistema transportador de cationes orgánicos, y otros se absorben activamente en estas mismas células. En consecuencia, estas células están expuestas a concentraciones elevadas de agentes potencialmente tóxicos. Además, se pueden alcanzar concentraciones mucho más elevadas de los agentes tóxicos en la luz tubular

de la nefrona que en la sangre por la capacidad del riñón para concentrar la orina. En ocasiones la absorción fraccional de agua excede a la del tóxico, lo que provoca un aumento en la concentración luminal del mismo. La entrada del agente tóxico en la célula y su transformación en metabolitos activos se facilita por mecanismos como el transporte iónico y el metabolismo de la célula renal (38).

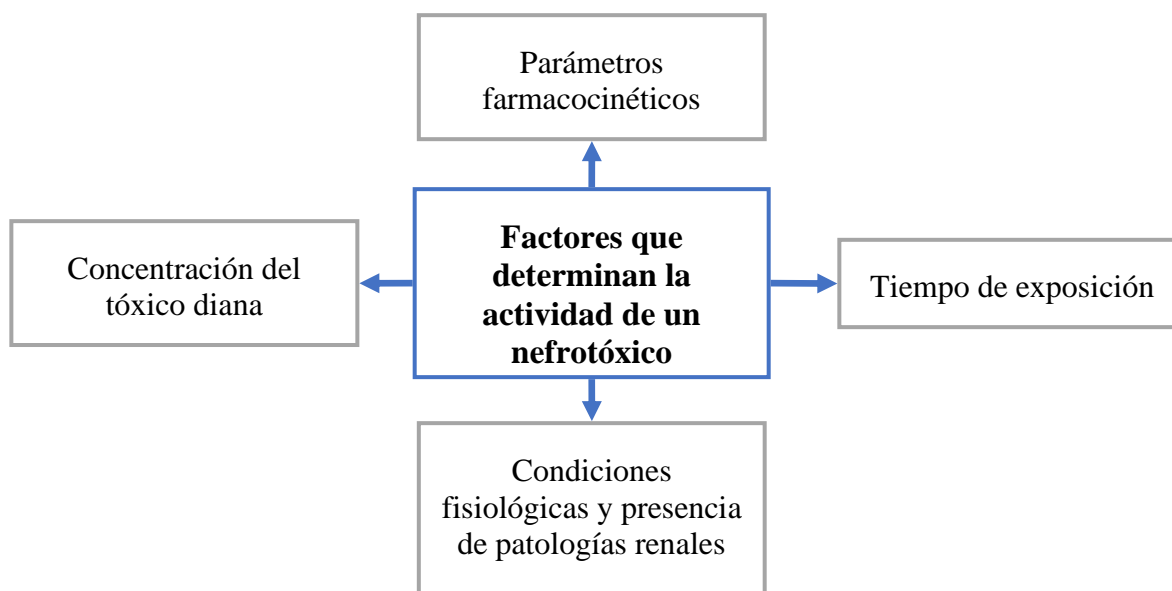


Figura 2 Factores que afectan la toxicidad renal de un agente tóxico.

En ocasiones, el efecto tóxico de un xenobiótico deriva de que durante el proceso de excreción renal éste sufre la transformación en un metabolito activo por una amplia variedad de enzimas que catalizan dos tipos de reacciones; de fase I (oxidaciones, reducciones e hidrólisis) que generan productos altamente reactivos y potencialmente tóxicos. Estas reacciones suelen encontrarse acopladas a reacciones de fase II (sintéticas y de conjugación), dando lugar a productos muy polares y biológicamente inactivos que pueden ser excretados fácilmente a través de la orina. Sin embargo, las sustancias tóxicas que se activan por enzimas de fase I afectan preferentemente al segmento S₃ del túbulo proximal renal, lo que explica la susceptibilidad de ciertas áreas del riñón al daño producido (36,39). La Figura 3 muestra los mecanismos más importantes de toxicidad.



Figura 3 Mecanismos fundamentales de nefrotoxicidad.

III.2.5.1 Alteración de la hemodinamia intraglomerular

Varios tóxicos actúan alterando la hemodinámica intrarrenal, induciendo vasoconstricción de la arteriola aferente glomerular o bien facilitando la vasodilatación de la arteriola eferente ante situaciones de baja perfusión renal. Aquellos agentes que actúan induciendo vasoconstricción de la arteriola aferente provocan un descenso de la perfusión glomerular y, consecuentemente, una caída de la tasa de filtración glomerular, traducándose en un fracaso renal agudo prerrenal, reversible tras la retirada del tóxico. No obstante, si la isquemia es lo suficientemente intensa o prolongada como para sobrepasar la acción protectora de los factores vasodilatadores intrarrenales, el resultado será el agotamiento de los depósitos energéticos celulares y la lesión de la célula tubular, siendo la región más vulnerable a la hipoxia las estructuras de la nefrona contenidas en la médula externa: la parte recta del túbulo proximal y la parte gruesa de la rama ascendente del asa de Henle. Como resultado se establece un fracaso renal agudo intrínseco secundario, desarrollando muerte celular por necrosis o apoptosis. Éste es el mecanismo utilizado por agentes como la ciclosporina, los contrastes radiológicos y los antiinflamatorios no esteroideos.(37,40).

III.2.5.2 Acción tóxica directa

Las sustancias nefrotóxicas pueden interaccionar en forma directa con su diana renal (por unión a la membrana plasmática o captación celular); que generalmente, lo que producirá un conjunto de reacciones que llevará a la muerte celular. Los segmentos de la nefrona más vulnerables, tanto a la isquemia como a la acción tóxica directa sobre la célula epitelial tubular, son la parte recta del túbulo proximal y en menor medida la parte gruesa de la rama ascendente del asa de Henle, ambas contenidas en la médula externa (41). Dos son los factores implicados en esta

mayor vulnerabilidad. En primer lugar, la baja tensión de oxígeno en esta región, incluso en riñones bien perfundidos, descendiendo aún más en presencia de isquemia o nefrotóxicos que bloquean la respiración mitocondrial. En segundo lugar, la producción energética de la parte recta del túbulo proximal depende de la fosforilación oxidativa y de la oxidación de los ácidos grasos, ya que posee una baja capacidad glucolítica, siendo incapaz de utilizar esta última vía para la generación de adenosina trifosfato (ATP), esencial para la viabilidad celular, debido al gran requerimiento energético de estos dos segmentos, motivado por su elevada actividad metabólica en los procesos de transporte de solutos (41,42). Además, cuando las nefrotoxinas ejercen su acción al ser captadas por las células; ponen de manifiesto efectos sobre la función lisosomal y mitocondrial.

III.2.5.3 Obstrucción tubular

Es el mecanismo utilizado por fármacos como el methotrexate en altas dosis, el aciclovir y las sulfamidas como la sulfadiacina y el sulfametoxazol. Éstos comparten la propiedad de presentar una baja solubilidad en la orina, favoreciendo su precipitación intratubular y provocando obstrucción tubular. La depleción de volumen y una orina ácida son factores predisponentes para este mecanismo nefrotóxico (43).

III.2.4.4 Mecanismo inmunológico

La respuesta inmune es el mecanismo utilizado por un elevado número de fármacos para ejercer nefrotoxicidad, cuya consecuencia es la nefritis tubulointersticial aguda. Son los antibióticos lactámicos y las cefalosporinas los que con mayor frecuencia utilizan este mecanismo, aunque otros fármacos antibióticos y no antibióticos pueden producir idénticas lesiones. Generalmente, la respuesta inmune es inducida por el fármaco, actuando como hapteno, formando parte de antígenos nefritogénicos. La respuesta inmune mediada por células también se encuentra implicada en la nefritis tubulointersticial aguda por fármacos como la ocasionada por AINE. Prueba de ello es la infiltración por células mononucleares, fundamentalmente linfocitos T13 (40).

II.2.3 Relación entre el daño renal, cardíaco y pulmonar como consecuencia de la exposición a agentes tóxicos

Existe una evidencia creciente de que la falla renal agudo (FRA) contribuye directamente a la disfunción de otros órganos como el pulmón, cerebro, hígado y corazón (44).

II.2.3.1 Interacción riñón-corazón

Fármacos nefrotóxicos como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) y los bloqueadores de los receptores de la angiotensina son fármacos prescritos para la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, la microalbuminuria diabética, la enfermedad renal proteinúrica y después del infarto de miocardio. Después de comenzar a tomar estos fármacos los pacientes pueden sufrir una disminución repentina de la función renal, debido al antagonismo de la constricción arteriolar eferente mediada por angiotensina II (45,46).

El síndrome cardiorrenal (SRC) tipo 3 (síndrome renocardiaco agudo) es una subclasificación del SRC por el que un episodio de la falla renal aguda (FRA), isquemia y/o glomerulonefritis, conlleva disfunción cardíaca aguda (falla cardíaca, infarto agudo de miocardio, isquemia), ya que la lesión renal aguda puede afectar de muchas formas la función cardíaca (45,47,48). De aquí que la retención de líquido contribuye al desarrollo de edema pulmonar, generando hipercalemia, arritmias y paro cardíaco (46). La uremia no tratada puede afectar a la función miocárdica a través de factores que deprimen la contractilidad miocárdica y se relacionan con inflamación pericárdica (49,50). La acidemia produce un efecto inotrópico negativo, que podría originar un desbalance electrolítico y dar origen a un incremento en el riesgo de arritmias; del mismo modo, dicha acidemia produce una vasoconstricción pulmonar, lo que significa que contribuye a una falla cardíaca derecha. Finalmente, la isquemia renal podría originar inflamación y apoptosis cardíaca, véase (Figura 4). (45,46)

La falla renal aguda (FRA) se asocia a activación neuroendocrina y del sistema inmunitario. La activación del sistema nervioso simpático es característica tanto en la (FRA) como en la insuficiencia cardíaca aguda. El aumento de la actividad del sistema nervioso simpático renal y sus efectos en la liberación de noradrenalina durante la (FRA) pueden alterar la función miocárdica a través del efecto directo de la noradrenalina, alteraciones en la homeostasis del calcio en el miocardio, incremento en la demanda de oxígeno miocárdico y apoptosis de los miocardiocitos (51).

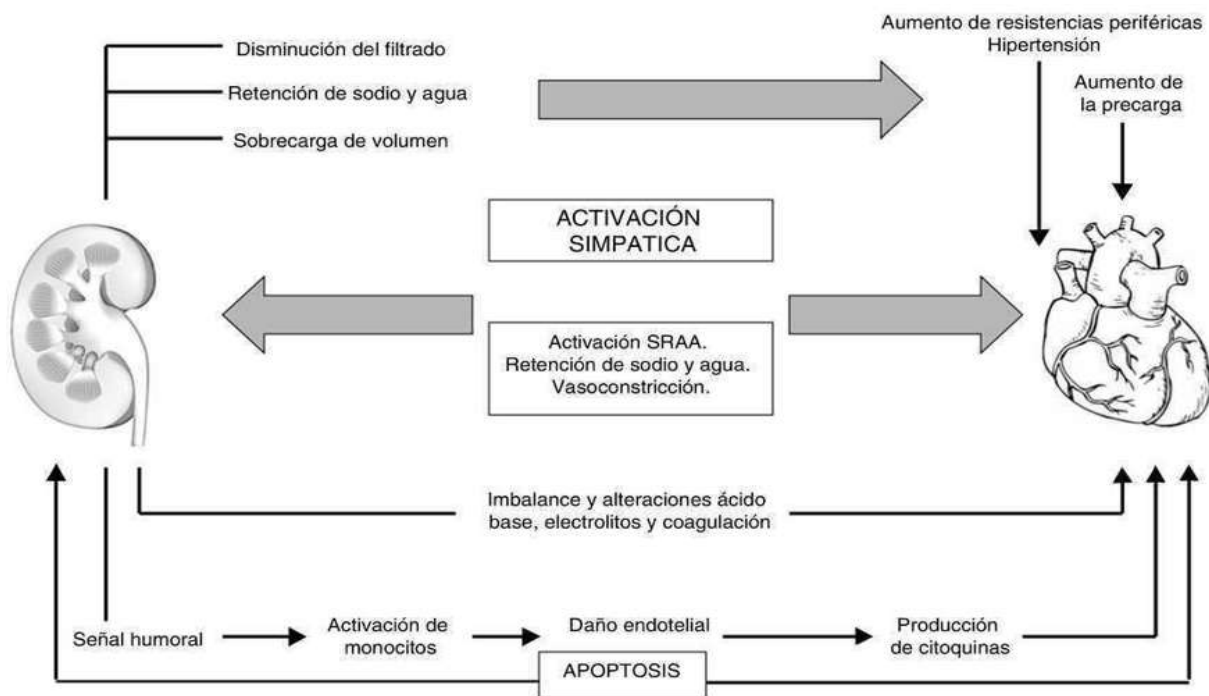


Figura 4 Síndrome cardio renal tipo III. Tomado de (46).

Asimismo, la activación del sistema nervioso simpático conlleva una estimulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona que contribuye a la liberación de angiotensina II, vasoconstricción y alteración de la homeostasis del líquido extracelular. La angiotensina II puede también jugar un papel en la modificación de la estructura del miocardio y su función, contribuir a la hipertrofia celular y precipitar la apoptosis de los miocitos cardiacos (52). La angiotensina II también es un potente estimulador de rutas intracelulares incluyendo aquellas involucradas en el estrés oxidativo, inflamación y regulación de la matriz extracelular (53). El (FRA) estimula la activación del sistema inmune innato y adaptativo y en modelos animales aumenta la liberación de factores proinflamatorios que se acompañan de evidencias de apoptosis de células cardiacas y cambios funcionales en la ecocardiografía (54). Datos experimentales sugieren que el daño cardiaco puede ser inducido directamente por mediadores inflamatorios, estrés oxidativo, apoptosis y activación del sistema neuroendocrino. Varios estudios en modelos experimentales han demostrado que existen niveles elevados de citoquinas proinflamatorias que pueden tener efectos depresores directos sobre la función cardiaca (55–57).

II.2.3.2 Interacción riñón-pulmón

La asociación entre la falla renal aguda y el daño pulmonar, (síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) está descrita en la literatura, ya que el pulmón responde ante mediadores liberados desde otros órganos como el riñón (interacción riñón-pulmón) (58). De hecho, la lesión pulmonar en el contexto de la falla renal se caracteriza por una marcada congestión vascular pulmonar, edema intersticial, hemorragia alveolar focal e infiltración de células inflamatorias (59). Los mecanismos involucrados en esta interacción deletérea son: alteraciones en el aclaramiento, reacción inflamatoria, respuesta inmune, estrés oxidativo, apoptosis y metabolismo de mediadores solubles (Figura 5) (59). Se considera que la sobrecarga de fluidos ocasionada por la falla renal es la causa del compromiso pulmonar, sin embargo, datos experimentales señalan que la FRA origina, además, directamente, inflamación pulmonar y alteraciones en los transportadores epiteliales de sal y agua (60). Obviamente, el exceso de líquidos que ocurre durante la (FRA) ocasiona un aumento de la presión hidrostática del capilar pulmonar (edema cardiogénico) y alteración del intercambio gaseoso (61).

La apoptosis endotelial pulmonar juega un importante rol en la fisiopatología del SDRA. En la transcripción de los genes relacionados con la apoptosis, se han encontrado relevantes cambios durante periodos precoces y tardíos de la FRA, particularmente con el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (tumor necrosis factor- α receptor 1) (62). Se ha demostrado que la FRA ocasiona un incremento en la permeabilidad vascular pulmonar. En modelos animales de daño renal por insuficiencia renal (IR) se observó que este aumento estaba mediado por productos derivados de macrófagos, con un pico en la permeabilidad a las 48 horas post-reperfusión (63). En modelos experimentales de daño renal por IR en ratas, se ha observado, a nivel pulmonar, baja la regulación de los transportadores epiteliales del canal de sodio, Na⁺/K⁺-ATPasa, como también de aquaporina-5, lo que finalmente resulta en un menor aclaramiento del fluido alveolar (60,64). La importancia clínica de la disminución de los sistemas de transporte epiteliales de sodio ha sido confirmada por la observación de un incremento del edema pulmonar mediante la administración de amiloride (bloqueador de canal de Na) u ouabaína (bloqueador Na⁺/K⁺-ATPasa) en modelos de insuficiencia renal pulmonar (65). La FRA isquémica provoca cambios inflamatorios en el pulmón, con activación de factores de transcripción como es el factor nuclear kappa-beta (NF- κ B). Se ha demostrado en ratones el efecto protector en la falla respiratoria inducida por FRA de la citoquina antiinflamatoria hormona α -estimulante de melanocitos (α -

MSH) (66), la cual disminuye los niveles de citoquinas inflamatorias, producción de monóxido de nitrógeno (NO) y expresión de moléculas de adhesión de neutrófilos (67). En estudios experimentales de FRA isquémica han constatado un aumento de los niveles de citoquinas circulantes (FNT- α , IL-1,IL-6), quimioquinas y leucocitos activados, siendo estos últimos los que infiltran, entre otros órganos, el parénquima pulmonar (68).

Recientemente, se evidenció en un modelo animal pediátrico de IR, un significativo incremento del agua extravascular pulmonar, siendo este de un inicio precoz (69). La inducción de estrés oxidativo participa en el daño pulmonar observado en la FRA. Así, en un modelo animal de rdbdomiólisis, se encontró un aumento de la permeabilidad vascular pulmonar, infiltración celular inflamatoria y peroxidación lipídica (70).

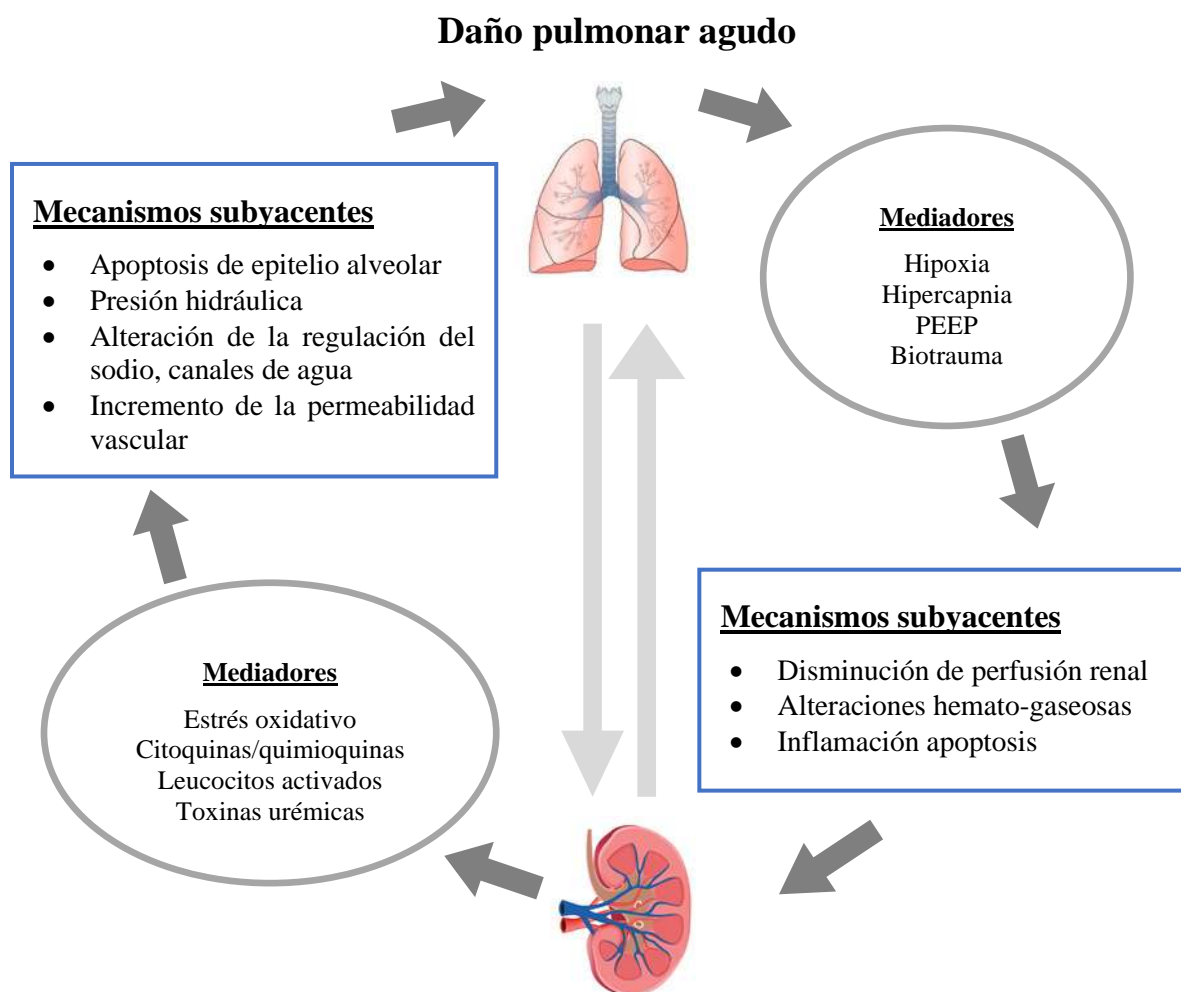


Figura 5 Interrelación entre el daño renal y pulmonar agudo. Tomado de (58).

II.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS ÁCIDOS GÁLICO Y ELÁGICO

II.3.1 Estructura química en forma aislada y como parte de los taninos hidrolizables

II.2.1.1 Ácido gálico

El ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico) es un sólido cristalino, ligeramente amarillo. Su peso molecular es 170.11954 g/mol y su fórmula molecular es $C_7H_6O_5$. La solubilidad de 1 g de ácido gálico es: 87 ml de agua; 6 ml alcohol; 100 ml éter y 10 ml de glicerol, siendo prácticamente insoluble en benceno, cloroformo y éter de petróleo y presentando una alta inestabilidad a la luz, el calor y el pH (71). El ácido gálico es una molécula plana, que consta de un anillo aromático, tres grupos hidroxilo fenólicos y un grupo de ácido carboxílico. Los tres grupos hidroxilo están unidos al anillo aromático en una posición orto con respecto al otro. Este orden de disposición es el principal determinante de su fuerte capacidad antioxidante.

Dependiendo de la orientación del componente carboxílico y grupos hidroxilo, el ácido gálico puede tener varias conformaciones. En general, se describen cuatro conformeros estables (Figura 6), que se diferencian en la orientación de los grupos hidroxilo alrededor del anillo. El conformero ácido gálico (I), que tiene los tres átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo orientados en la misma dirección, se considera como el conformero más estable (72). El ácido gálico puede formar enlaces de hidrógeno tanto intra (entre grupos hidroxilo) como intermoleculares. Por consiguiente, ácido gálico (I), ácido gálico (II), ácido gálico (III) y ácido gálico (IV) pueden tener dos, uno, uno y dos enlaces de hidrógeno intramoleculares, respectivamente. Con la formación de la estructura aniónica o radical aniónica, la carga negativa se redistribuye principalmente entre los átomos de oxígeno, lo que resulta en enlaces de hidrógeno más cortos y más fuertes (72).

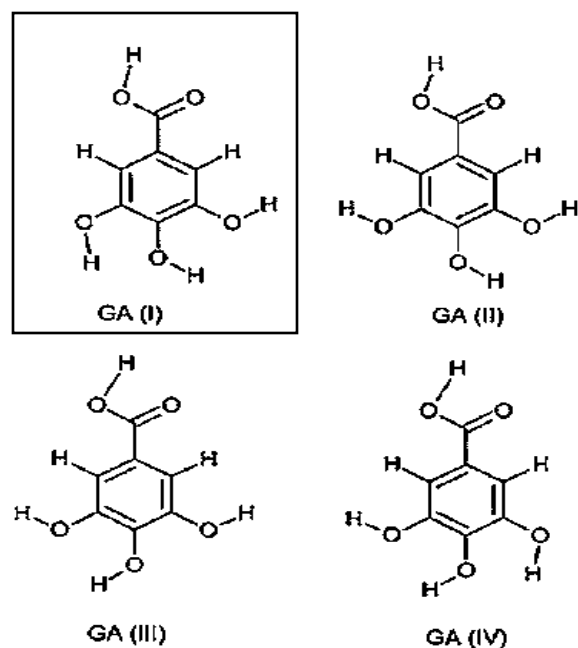


Figura 6 En el recuadro se representa la estructura química del ácido gálico. La figura en general esquematiza los diferentes confórmeros del ácido gálico. Tomado de (72).

II.2.1.2 Ácido elágico

El ácido elágico es un polifenol que está presente en forma libre en las plantas como producto de su metabolismo, o bien puede encontrarse a partir de sus precursores, los elagitaninos (73–75). El ácido elágico tiene un peso molecular de 338.2 g/mol, es una molécula altamente termostable debido a sus cuatro anillos, que representan el dominio lipofílico y cuatro grupos fenólicos y dos lactona que representan la zona hidrófila (Figura 7) (76). Esto otorga al ácido elágico la capacidad tanto para aceptar electrones de diferentes sustratos, como para participar en reacciones redox de antioxidantes (73,77). Estas propiedades del ácido elágico dan como resultado una solubilidad en agua relativamente baja (9.7 µg/ml); sin embargo, presenta alta solubilidad en soluciones alcalinas como el dimetilsulfóxido (DMSO) 0,14 mg/mL, soluciones de etanol al 80% o mayor o soluciones isotónicas (78). El ácido elágico es una molécula muy estable que tiene un punto de fusión de 350°C y por su naturaleza fenólica tiende a reaccionar formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos (79). En vista de estas propiedades, el ácido elágico puede contrarrestar los efectos nocivos para la salud de especies reactivas como los radicales libres, relacionados con los procesos de envejecimiento de las células del organismo; la formación de tumores y la aparición de cáncer (80).

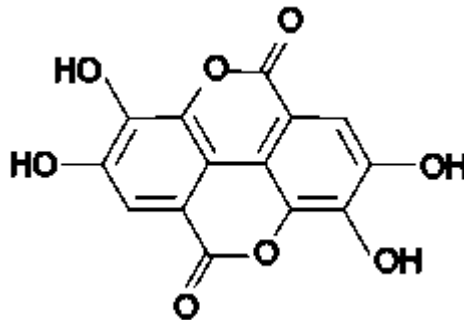


Figura 7 Estructura química del ácido elágico. Tomado de (74).

II.3.2 Actividad Biológica

II.3.2.1 Actividad antioxidante

El ácido gálico posee una potente actividad antioxidante, proporcionando una protección eficaz contra el daño oxidativo causado por especies reactivas que a menudo se encuentran en sistemas biológicos y se ha demostrado que es el principal componente antioxidante responsable de las propiedades antirradicales y anticancerígenas eficientes de varios extractos de plantas (72). Sin embargo, este compuesto también se asocia con un carácter prooxidante relacionado con la inducción de la apoptosis (81). Por consiguiente, el ácido gálico exhibe características antioxidantes y prooxidantes dependiendo de su concentración y sitio de acción.

La disposición aromática de los grupos fenólicos influye notablemente en la actividad antioxidante y varios factores como el número y la posición del grupo hidroxilo, la presencia de otros grupos funcionales y su posición con respecto a los grupos hidroxilo afectan la actividad antioxidante y antirradical. En general, la actividad antioxidante de una molécula aumenta con el aumento del número de grupos hidroxilo unidos al anillo aromático (72). Los ácidos fenólicos como el ácido gálico pueden actuar como antioxidantes ya sea donando un átomo de hidrógeno (transferencia de un átomo de hidrógeno o HAT) actuando como donante de electrón (transferencia de un solo electrón o SET) (72).

Estudios realizados han mostrado que los galotaninos poseen una fuerte actividad antioxidante y antiradicalaria, la cual es derivada de la presencia del OH fenólico que tiene la capacidad de donar un hidrógeno o transferir un electrón y así formarse un radical más estable (Figura 8) (82).

Los galotaninos son hidrolizados rápidamente en ácido gálico y glucosa. El alto poder antioxidante los convierte en sustitutos perfectos de los conservantes artificiales en los alimentos que son utilizados para prevenir la oxidación (82). Sin embargo, los galotaninos no son utilizados debido a su efecto antinutricional porque tienen interacción con macronutrientes (aminoácidos, proteínas, fosfolípidos) y pueden afectar la absorción de estos mismos (83).

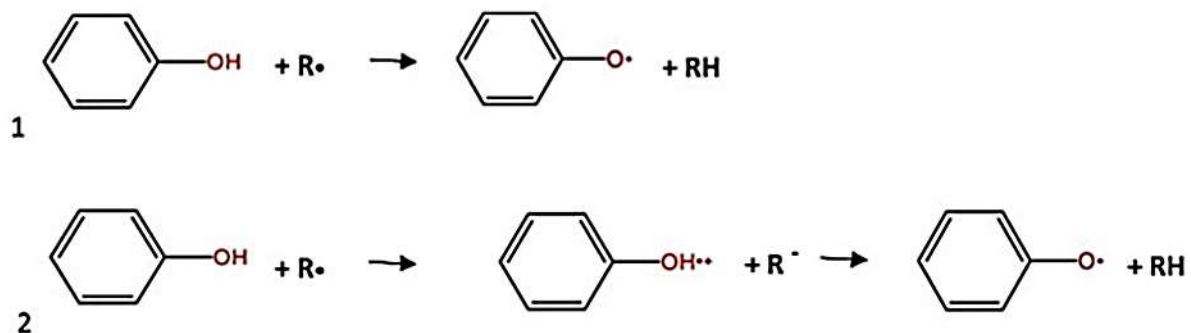


Figura 8 Mecanismos de acción para la formación de un radical más estable; 1) donación de un hidrógeno, 2) transferencia de un electrón. Tomado de (82).

El ácido elágico contiene cuatro grupos hidroxilo (dos grupos O-dihidroxi) y dos grupos de lactona en los que el grupo hidroxilo puede aumentar la actividad antioxidante contra la peroxidación de lípidos y proteger las células contra el daño oxidativo. La eficiencia antioxidante de ácido elágico se correlaciona directamente con su grado de hidroxilación y disminuye con la presencia de restos de glucosa (75). El mecanismo detrás de su actividad antirradical está relacionado con su capacidad para transferir el átomo de hidrógeno del grupo fenólico a un radical libre. Se ha demostrado que la abstracción formal del átomo de la reacción de ácido elágico involucra procesos complejos que proceden a través de al menos tres mecanismos diferentes: transferencia de átomos de hidrógeno, transferencia de electrones única seguida de la transferencia de protones y transferencia de electrones de pérdida de protones secuenciales (84).

El ácido elágico es un buen secuestrador de radicales, especialmente de los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), metoxilo ($\text{OCH}_3\cdot$) y dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$). En orden descendente su capacidad de captación de estos radicales es la siguiente: ($\text{OH}\cdot \gg \text{OCH}_3\cdot > \text{NO}_2\cdot$). Por lo que se cree que el

ácido elágico capta más eficientemente las ERO que de nitrógeno (85). Esta propiedad antirradical también se presenta con sus metabolitos quienes también son capaces de eliminar de manera eficiente una amplia gama de radicales libres, a menudo incluso más rápido que el ácido elágico. Además, en condiciones ambientales específicas, se predice que el ácido elágico se regenera continuamente después de eliminar dos radicales libres, un peroxilo (ROO^{\cdot}) y un superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) por ciclo, hasta que algunos de los intermedios se consumen en diferentes reacciones. Esto aumenta los efectos protectores del ácido elágico en concentraciones bajas, que es tanto un comportamiento deseable e inusual para un antioxidante (86).

Saeed et al (2019), sugirió que el ácido elágico puede usarse como pre-terapia para prevenir la hepatotoxicidad inducida por metotrexato (MIH), administrando por vía oral 10 mg/kg de ácido elágico durante 10 días. Observaron que el metotrexato disminuyó el nivel de glutatión reducido hepático y las actividades de las enzimas antioxidantes. El pretratamiento con ácido elágico atenuó notablemente las actividades de las aminotransferasas y fosfatasa alcalina (ALP), los niveles de parámetros de estrés oxidativo, aumentando la actividad de las enzimas antioxidantes (87). Otro estudio declaró que el efecto protector del ácido elágico es de 3-30 mg/kg, vía oral sobre las lesiones gástricas inducidas por NH_4OH en el estómago isquémico puede surgir a través de la eliminación de NH_2Cl , un factor estimulante de la producción de aniones superóxido e hidroxilo (88). El tratamiento con ácido elágico de 50 mg/kg, por vía oral también dio como resultado una disminución significativa en la actividad de las enzimas hepáticas séricas, así como una disminución en la bilirrubina total y los niveles de suero de bilirrubina directa, que pueden ser responsables de inducir la producción excesiva de radicales libres conduciendo a lesiones hepáticas severas (89). Se ha reportado que el ácido elágico es eficaz para inhibir la peroxidación lipídica, fundamentalmente relacionado con la producción de radicales hidroxilo y peroxilo a bajas concentraciones (90) Uzar et al.2012 encontró que el ácido elágico a 50 mg/kg/día causó una disminución en la peroxidación lipídica inducida por estreptozotocina y contrarrestó el deterioro oxidativo inducido por estreptozotocina (91).

II.3.2.2 Carácter prooxidante

Además de sus efectos antioxidantes, los ácidos gálico y elágico pueden actuar como prooxidantes al quelar metales aumentando así su capacidad para formar radicales libres a partir de peróxidos. De hecho, varios factores como el pH de los tejidos biológicos pueden influir en

la actividad antioxidante/pro-oxidativa de estos compuestos. Una disminución del pH aumentaría la actividad reductora del hierro y reduciría la capacidad de estos compuestos para quelar e inhibir la actividad catalítica del hierro. Un aumento de pH aumenta la desoxirribosa y la oxidación del ADN (92). En síntesis, el pH del tejido en particular, su estructura precisa, la proximidad o adyacencia de los grupos hidroxilo y la presencia de metales de transición, serán factores determinantes para que estos compuestos muestren o no una actividad prooxidante. Se ha sugerido que los radicales libres inducidos por el ácido gálico se generan si la proporción de ácido gálico con relación al contenido de hierro es inferior a 2, pero se observa lo contrario, es decir, la eliminación de radicales libres, cuando la misma proporción excede 2 (es decir, > 2) (93). La función pro-oxidativa del ácido gálico también se ve aumentada por la disminución concomitante de las enzimas antioxidantes celulares particularmente las superóxido dismutasas tanto citosólicas como mitocondriales conllevando a la acumulación de ROS dentro del medio celular (94).

Se ha reportado que los efectos prooxidantes de los taninos pueden deberse en parte a la formación de productos intermediarios prooxidantes o productos finales a través de su biotransformación. Además, esta actividad prooxidante podría deberse a la presencia de iones metálicos en altas concentraciones (25-100 μm) en el ambiente celular, los que acelerarían la formación de radicales hidroxilo y el daño del ADN *in vitro* (95). Teniendo en cuenta que los iones metálicos están presentes en cada célula y afectan numerosos procesos metabólicos se sugiere que durante la interacción entre estos iones y los fenoles existe la posibilidad de producir un complejo tóxico que puede causar daños a nivel molecular (96).

El carácter pro-oxidante del ácido gálico también se relaciona con su efecto anticancerígeno ya que favorece la inducción de la apoptosis de las células cancerosas, mostrando una citotoxicidad selectiva y una toxicidad mínima para las células normales, lo que lo hace una biomolécula importante para usos terapéuticos (81). Se ha señalado que los polifenoles antioxidantes derivados de plantas tienen propiedades pro-oxidativas y antioxidantes, dependiendo de factores tales como su potencial reductor de metales, comportamiento quelante, pH y características de solubilidad (92). Fukumoto y Mazza (2000) observaron una doble actividad antioxidante y prooxidante para una variedad de polifenoles derivados de plantas, incluidos los ácidos gálico y elágico (97). Sin embargo, en nuestros días, el volumen de investigación sobre las propiedades antioxidantes de los polifenoles en relación con sus efectos biológicos eclipsa en gran medida

el menor número de estudios sobre las consecuencias biológicas de la naturaleza pro-oxidante de los polifenoles y su impacto sobre la toxicidad (98).

II.3.3 Presencia de ácidos gálico y elágico en los alimentos, productos herbolarios y suplementos nutricionales

II.3.3.1 Presencia en alimentos

Los ácidos gálico y elágico se presentan en forma abundante en el reino de las plantas, bien en forma libre o como parte de los ya mencionados taninos hidrolizables. Los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) presentan una elevada distribución en frutas, verduras, en las especies de *Quercus*, y en algunas bebidas (como los vinos tintos o el té verde). Los galotaninos están presentes principalmente en dicotiledóneas leñosas y herbáceas (99). Los cereales son fuentes de taninos hidrolizables debido a que los compuestos fenólicos están ligados a los componentes de la pared celular (100). La β - glucogalina es uno de los componentes principales de la pulpa del mango (101). El zumaque (*Rhus coriaria L.*) y las agallas chinas (o agallas) son particularmente ricas en galotaninos (102). Mientras que los elagitaninos se encuentran principalmente en la piel y la semilla, aunque en la pulpa se han detectado cantidades o trazas muy bajas (103). Las granadas (fruta, jugo y mermelada) también son una fuente rica en elagitaninos, principalmente punicalagina y ácido elágico (104). Además, el contenido de galotaninos y elagitaninos puede verse considerablemente afectado por la variedad, madurez, partes de la fruta, origen geográfico, clima, estación, prácticas culturales y nutrición mineral (105). En la (Tabla 2) se muestra el contenido de ácido gálico y ácido elágico de algunos frutos y alimentos. Es posible observar en esta tabla que ambos compuestos coexisten en alimentos y bebidas de uso común, por lo que sería interesante el estudio de su combinación desde el punto de vista de sus propiedades biológicas y toxicológicas. Cabe señalar que, en los últimos años, estos compuestos polifenólicos han despertado gran interés por los diversos beneficios que brindan al cuidado de la salud.

Tabla 2. Contenido total de ácido gálico y elágico en los alimentos.

Alimentos	Contenido de ácido gálico	Referencia	Contenido de ácido elágico	Referencia
Frutos				
Frambuesa (<i>Rubus idaeus L, Rosaceae</i>)	-	-	Frambuesas amarillas 900 mg/100 g (FW)	(73)

			Frambuesas silvestres 270 mg/100 g (FW)	
Mora (<i>Rubus adenotrichus</i>)	Mora cruda 4.67 mg/100 g (FW)	(106)	37.60 mg/100 g (FW)	(107)
			Mora cruda 43.67 mg/100 g (FW)	(106)
Fresa (<i>Senga Sengana</i>)	-	-	68.6 mg/100 g (FW)	(108)
			Mermelada de fresa 23,8 mg/100 g (FW)	
Granada (<i>Punica granatum L.</i>)	-	-	Cáscara 50 mg/100 g (FW)	(109)
			Jugo 38 mg/100 ml	
Uva (<i>Vitis rotundifolia</i>)	Semillas 6.9 mg/100 g (FW)	(104)	Piel 16.5 mg/100 g (FW)	(104)
	Hojas 8.6 mg/100 g (FW)		Hojas 67.7 mg/100 g (FW)	
Bebidas				
Uva verde Muscadine, jugo puro	0.10 mg/100 ml	(110)	0.93 mg/100 ml	(111)
Granada, jugo puro	0.45 mg/100 ml	(112)	2.06 mg/100 ml	(113)
Té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	0.49 mg/100 ml	(114)	Hojas del té verde (<i>Camellia sinensis</i>) 75 mg/100 g FW	(115)
Bebidas alcohólicas				
Nogal, licor	15.15 mg/100 ml	(116)	1.22 mg/100 ml	(116)
Vino rojo	3.59 mg/100 ml	(117)	1.5 mg/100 ml	(118)
Coñac	0.23 mg/100 ml	(119)	1.13 mg/100 ml	(119)
Ron	0.06 mg/100 ml	(119)	0.21 mg/100 ml	(119)
Whisky escocés	0.09 mg/100 ml	(119)	0.82 mg/100 ml	(119)
Agallas de roble				
Agallas (<i>Quercus. Brantii</i>)	98.18 mg/100 (DW)	(120)	-	-

II.3.3.2 Presencia en productos herbolarios medicinales

Los ácidos gálico y elágico, así como los taninos hidrolizables son metabolitos secundarios comunes en muchas plantas medicinales, donde su forma libre está presente en concentraciones relativamente bajas. Ambas moléculas están presente en formas de glucósidos, es decir, conjugado con una unidad de sacárido, como glucosa, ramnosa, arabinosa, o en derivados complejos, como componente de los galotaninos y elagitaninos (121). La (Tabla 3) presenta una lista de plantas medicinales en las que se ha documentado la presencia de estos compuestos.

Tabla 3. Plantas medicinales con contenido de ácido gálico o ácido elágico.

Especies de plantas/utilidad terapéutica	Cantidad aislada de ácido gálico	Referencia	Especies de plantas/utilidad terapéutica	Cantidad aislada de ácido elágico	Referencia
<i>Phyllanthus amarus/antinflamatoria</i>	135.08 mg/g	(122)	<i>Ficus carica</i> <i>L/evitar caries</i>	38.54 ppm	(123)
<i>Momordica charantia</i> <i>L/hipoglucemiante</i>	97.35 mg/g	(122)	<i>Punica granatum</i> <i>L/antioxidante</i>	82.95 ppm	(123)
<i>Achillea schischkinii</i> <i>D.Sosn/diurética</i>	11.2 mg/g	(124)	<i>Psidium guajava</i> <i>L/antioxidante</i>	20.90 ppm	(123)
<i>Rhodiola crenulata/potenciar la función muscular</i>	8.1877 mg/g	(125)	<i>Olea europaea</i> <i>L/hipoglucemiante</i>	22.43 ppm	(123)
<i>Myrciaria dubia/antioxidante</i>	4.732 mg/g	(126)	<i>Terminalia arjuna/tratamiento de heridas</i>	438 µg/g	(127)

II.3.3.3 Presencia en suplementos nutricionales y herbolarios

Cabe señalar que, en los últimos años, los ácidos gálico y elágico se ha comercializado de manera controvertida como suplementos dietéticos con una serie de supuestos beneficios contra el cáncer, las enfermedades cardíacas y otros problemas médicos; en consecuencia, estas afirmaciones han recibido advertencias de la agencia regulatoria en materia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA) (Figura 9) (2). Las investigaciones con respecto a la evaluación de la seguridad y eficacia de suplementos herbolarios adicionados con ácido gálico o ácido elágico, aunque disponibles en la literatura científica, son relativamente escasas.



Figura 9 Algunos ejemplos de suplementos nutricionales que contienen ácidos gálico y elágico.

El estudio de Anthony et al (2010), evaluó la toxicidad reproductiva en ratas de un suplemento de hierbas (ruibarbo, astrágalo, salvia roja, jengibre y cúrcuma) (20%) suplementado con ácido gálico (80%) por vía oral. Los autores reportaron que la combinación del suplemento dietético y ácido gálico no mostró evidencia de toxicidad reproductiva a 430 mg/kg por día; aunque se redujo el peso corporal en el grupo que recibió 860 mg/kg por día en comparación con el placebo. De acuerdo con los resultados obtenidos se sugirió al suplemento dietético como una buena alternativa para el tratamiento de la obesidad (128). Los efectos del ácido gálico y ácido ferúlico en dos suplementos comerciales se analizaron sobre el tejido intestinal epitelial en un modelo *in vitro* usando diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/L). Los resultados indicaron que los ácidos gálico y ferúlico pueden ejercer efectos tóxicos en modelos celulares *in vitro* a altas concentraciones, lo que sugiere que un consumo excesivo y descontrolado de estos polifenoles podría inducir efectos deletéreos a nivel de la pared intestinal (129). En otro estudio se sugirió que la suplementación dietética de ácido elágico (10 mg/kg/día) contribuye en el efecto beneficioso de un extracto de granada en un modelo de colitis experimental considerándolo como una estrategia terapéutica para manejar la enfermedad inflamatoria intestinal (130).

II.3.3.4 Ingesta promedio

El consumo humano de productos alimenticios que contienen taninos es variado y depende tanto de la región como del estilo de vida. Se ha estimado que la ingesta diaria se encuentra en un rango promedio de 1 g/día (131–133). Como resultado del metabolismo de estos taninos ocurre

la liberación de ácido elágico y gálico, dos compuestos reconocidos por sus propiedades bioactivas. Se estima que el consumo promedio de ácido gálico se encontraría en el orden de 13.8 a 25.0 mg/kg de peso corporal al día, extrapolando a un individuo de 70 kg de peso promedio, el consumo sería alrededor de 970 a 1,750 mg de ácido gálico al día (133). Mientras que, la ingesta promedio de ácido elágico sería de 12.2 mg/kg de peso corporal; por lo tanto, para un individuo de 70 kg promedio, el consumo medio sería de aproximadamente 30 a 850 mg de ácido elágico/día (134). La ingesta de ácido elágico después de beber una taza de té (*Camellia sinensis*) elaborado con 4 g de té podría oscilar entre 0.59 y 17.89 mg (115). Aunque se trata obviamente de consumos promedio, es probable que la ingesta de ambos compuestos sea mucho más elevada en el caso de individuos vegetarianos, que consuman regularmente té, así como suplementos nutricionales y herbolarios conteniendo estos compuestos.

II.3.4 Metabolismo y biodisponibilidad por vía oral de los ácidos gálico y elágico

II.3.4.1 Metabolismo y biodisponibilidad de ácido gálico

La absorción de ácido gálico después de la administración oral está sujeta a cambios metabólicos (135) Se plantea en general que los polifenoles se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal, con un rápido metabolismo en el intestino humano y una alta tasa de eliminación *in vivo*, resultando en una biodisponibilidad oral baja e inconsistente (136–138). Debido a la complejidad de las estructuras químicas de los galotaninos y a su alto peso molecular, es poco probable que estos compuestos sean absorbidos sin una hidrólisis previa, pudiendo generarse la formación de tetra y penta-O-galoil-glucosas (82,139). En contraste, la degradación de elagitaninos conlleva a la liberación de ácido elágico libre después de la ingesta de alimentos como frambuesas y pudiera indicar que el ácido gálico también es hidrolizado a partir de galotaninos (139).

La presencia de ácido gálico libre después de la ingestión de galotaninos podría indicar de que la absorción se produce en el intestino delgado con una ulterior metilación como consecuencia del metabolismo (139). El ácido gálico se distribuye rápidamente en todos los órganos excepto en el bazo mientras que, en los pulmones, hígado, corazón y riñones, el ácido gálico alcanza concentraciones relativamente altas. Aproximadamente 12h después de la administración de ácido gálico, su concentración se reduce notablemente en todos los tejidos estudiados (140). La Figura 10 muestra la absorción, el metabolismo y la distribución de ácido gálico *in vivo*.

La investigación de Xiaoqing Chen y colaboradores (2018), nos proporciona mayor claridad, ya que sus resultados mostraron que el ácido gálico se distribuye rápidamente en los tejidos, y la distribución más alta la observaron en el tejido renal, seguida por el corazón, el hígado, el bazo y los pulmones (143). Mientras que, en otro estudio donde investigaron la distribución tisular y la excreción urinaria de ácido gálico después de la administración oral en ratas del extracto acuoso de *Polygonum capitatum* administrado a 60 mg/kg (equivalente a 12 mg/kg de ácido gálico) se demostró que el ácido gálico se distribuyó principalmente en el tejido renal alcanzando una concentración de 1218,62 ng/g, seguido del tejido pulmonar (258,08 ng/g). En cambio, la concentración de ácido gálico en el hígado y el corazón fue ligeramente más baja que en el pulmón. En el análisis de la excreción urinaria, aproximadamente el 16,67% de la ingesta de ácido gálico se excretó en forma inalterada, mientras que su metabolito predominante fue el ácido 4-O-metil-gálico (144). En resumen, los estudios reportados revelaron colectivamente que los riñones pueden ser el principal órgano metabólico del ácido gálico y donde este se encuentra en una mayor concentración.

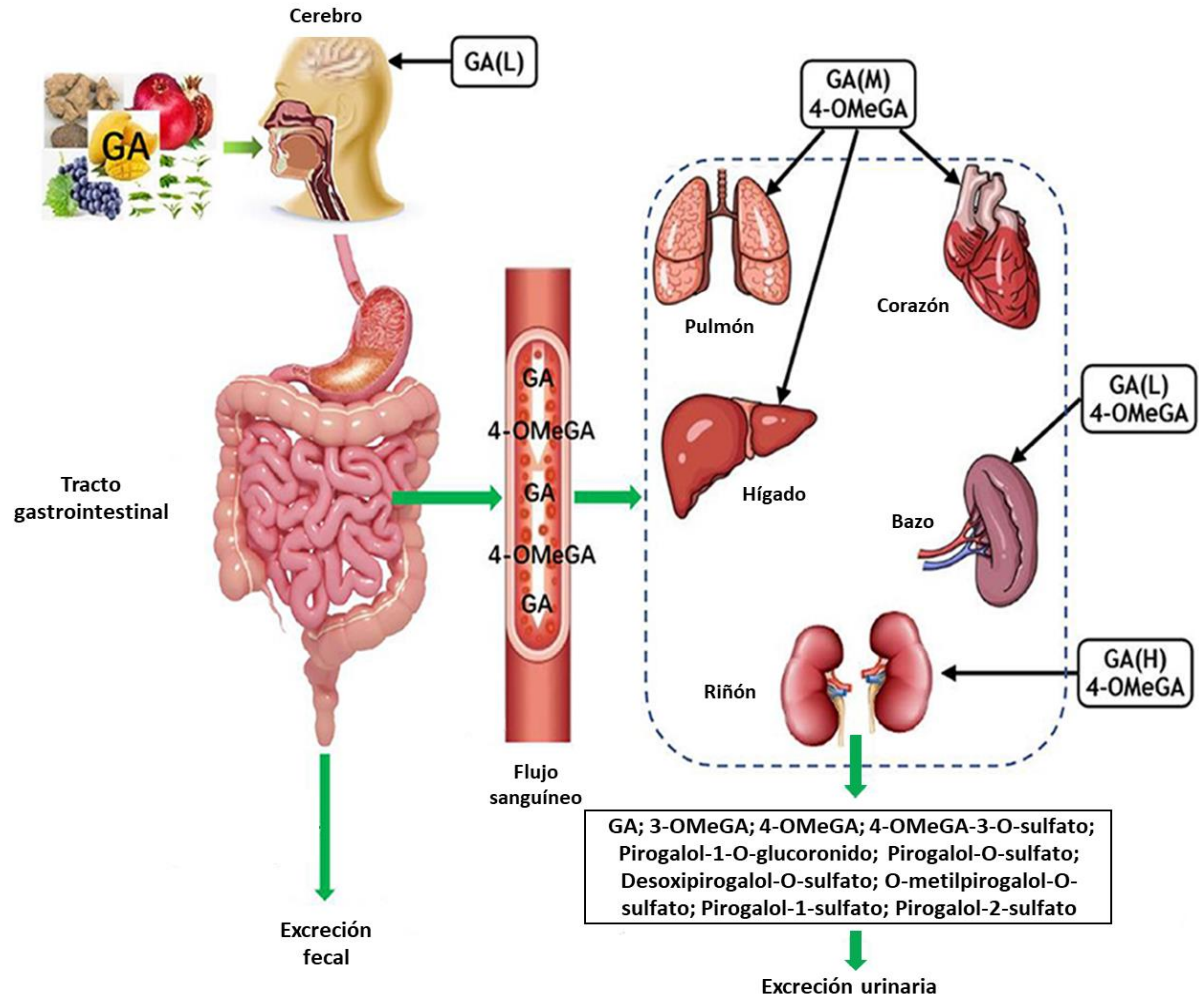


Figura 10 La absorción, metabolismo y distribución del ácido gálico (GA). Ácido 4-OMeGA, 4- O- metílico; Ácido 3-OMeGA, 3- O- metílico; H, M y L representan el contenido alto, medio y bajo de GA en los tejidos y órganos correspondientes, respectivamente; el 4-OMeGA en cajas negras representa que es el principal metabolito de GA en diferentes órganos. Tomado de (137).

II.3.4.2 Metabolismo y biodisponibilidad de ácido elágico

Estudios de biodisponibilidad han demostrado que los elagitaninos no se encuentran biodisponibles como tales y nunca se han detectado en el plasma humano después del consumo normal de alimentos ricos en este tipo de compuestos. Posiblemente, este comportamiento farmacocinético se deba a su tamaño, polaridad relativamente alta y la presencia de enlaces C-C. Además, algunos elagitaninos son resistentes a la hidrólisis ácida y básica en el tracto gastrointestinal y pueden llegar casi intactos al intestino grueso. Sin embargo, los elagitaninos que resultan sensibles a la hidrólisis ácida y básica en el estómago y el duodeno, son capaces de

liberar ácido elálgico, con una baja biodisponibilidad (105). Esta característica la atribuyen a la baja solubilidad en agua y a su capacidad para unirse irreversiblemente al ADN y proteínas celulares, o para formar complejos poco solubles con iones de calcio y magnesio que afectan la absorción transcelular (132,133,141).

Una pequeña proporción del ácido elálgico libre de la dieta se absorbe en el estómago; mientras que, los microorganismos intestinales metabolizan el ácido elálgico y los elagitaninos no absorbidos, generando diferentes tipos de urolitinas mediante la reducción de uno de los dos grupos lactona seguida de descarboxilación y deshidroxilación secuencial que implica una reducción paso a paso que va desde la formación de tetrahidroxi (urolitina D), trihidroxi (urolitina C), dihidroxi (urolitina A e isourolitina A) y monohidroxi dibenzopiranonas (urolitina B), las que por su parte que se absorben de manera más eficiente en el colon (Figura 11) (142–145). Se cree que el proceso de absorción del ácido elálgico es a través de la difusión pasiva impulsada por un gradiente de concentración, sin que aún se hayan identificado transportadores específicos que faciliten la absorción de ácido elálgico a través del epitelio intestinal (134).

Una vez en el hígado, los metabolitos sufren otras transformaciones químicas para producir diglucurónidos y/o sulfatos, generando una combinación completa de metabolitos secretados en la bilis (146). En comparación con el ácido elálgico libre, las urolitinas poseen una tasa de absorción mucho más alta, presumiblemente debido al aumento de su lipofilia. En consecuencia, las urolitinas están presentes en la circulación en concentraciones mucho más altas y durante más tiempo debido a la recirculación enterohepática (147–149). De hecho, las urolitinas poseen una excreción persistente en orina por 7 días (150). El estudio de Espín et. al (2007), demostró el perfil de metabolitos presentes en el plasma y en la orina, que contuvieron principalmente los glucurónidos de urolitina A y B; lo que demuestra que solo aquellos que se metabolizan suficientemente se excretan en la orina, mientras que los metabolitos tetrahidroxi (urolitina D) y trihidroxi (urolitina C) se absorben más temprano en el intestino, sufriendo la circulación enterohepática y evitando que entren en el plasma sanguíneo y la orina hasta que la metabolización llegue a reducir el número de hidroxilos fenólicos. El metabolito urolitina B parece ser el último producto de degradación en el metabolismo del ácido elálgico por la flora intestinal. Esta molécula se puede glucuronidar una sola vez a nivel de un grupo hidroxilo. La urolitina A es el principal metabolito derivado de los elagitaninos que se detecta en las heces (115). La Figura 12 indica el metabolismo de los elagitaninos a urolitinas; mientras que su

distribución en los tejidos y fluidos biológicos se presenta en la (Figura 11) (150). También se ha visto que las urolitinas solo se encuentran presentes a concentraciones elevadas en la vesícula biliar y en la vejiga, alcanzando concentraciones también muy altas en el intestino grueso. Sin embargo, estos metabolitos no se encuentran en cantidades significativas en el tejido muscular, adiposo, hígado, riñón o corazón. Las urolitinas se encuentran principalmente como agliconas en el colon, y como derivados conjugados con ácido glucurónico y sulfato, en plasma, bilis y orina. Aunque estos metabolitos se pueden ver expuestos a concentraciones bajas mientras están siendo transportados al plasma (151). Yan y colaboradores en (2014), analizaron la farmacocinética y la distribución tisular del ácido elágico en ratas Sprague-Dawle. Después de su administración oral (50 mg/kg), la concentración máxima (C_{max}) de ácido elágico en plasma fue de 93,6 ng /mL (0,31 μ M). El perfil de absorción fue de 457,2 ng /mL \times h, lo que indica que la absorción de ácido elágico fue extremadamente baja. Los valores de t_{max} , $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ fueron de 0.5 h, 2.5 h y 6.86 h, respectivamente, lo que sugiere que el ácido elágico entró en el compartimento central (circulación general) en una forma rápida, luego se distribuyó desde el compartimento central rápidamente a los compartimentos periféricos, y finalmente se eliminó o metabolizó de forma moderadamente lenta (152).

Por lo que, desde el punto farmacocinético, se ha descrito un sistema bicompartimental con escasa absorción y rápida eliminación, atribuible a la pobre solubilidad del ácido elágico, considerándose que la primera absorción ocurre en el estómago y la parte superior del intestino delgado, con un t_{max} corto, conduciendo a la rápida eliminación, debido al metabolismo de primer paso y recirculación enterohepática débil (134).

De hecho, en un estudio cruzado con humanos que recibieron 130 mg de punicalagina más 524 mg de ácido elágico libre (dosis alta) o 279 mg de punicalagina más 25 mg de forma libre (dosis baja); se reveló que la aparición y el aclaramiento de ácido elágico en el plasma depende en gran medida de la proporción ácido elágico libre, aunque es un proceso que parece ser saturable ya que una dosis muy elevada de este compuesto no mejoró su biodisponibilidad en comparación con la dosis más baja, además se sugirió que la saturación de la absorción ocurriría en el intestino delgado (156).

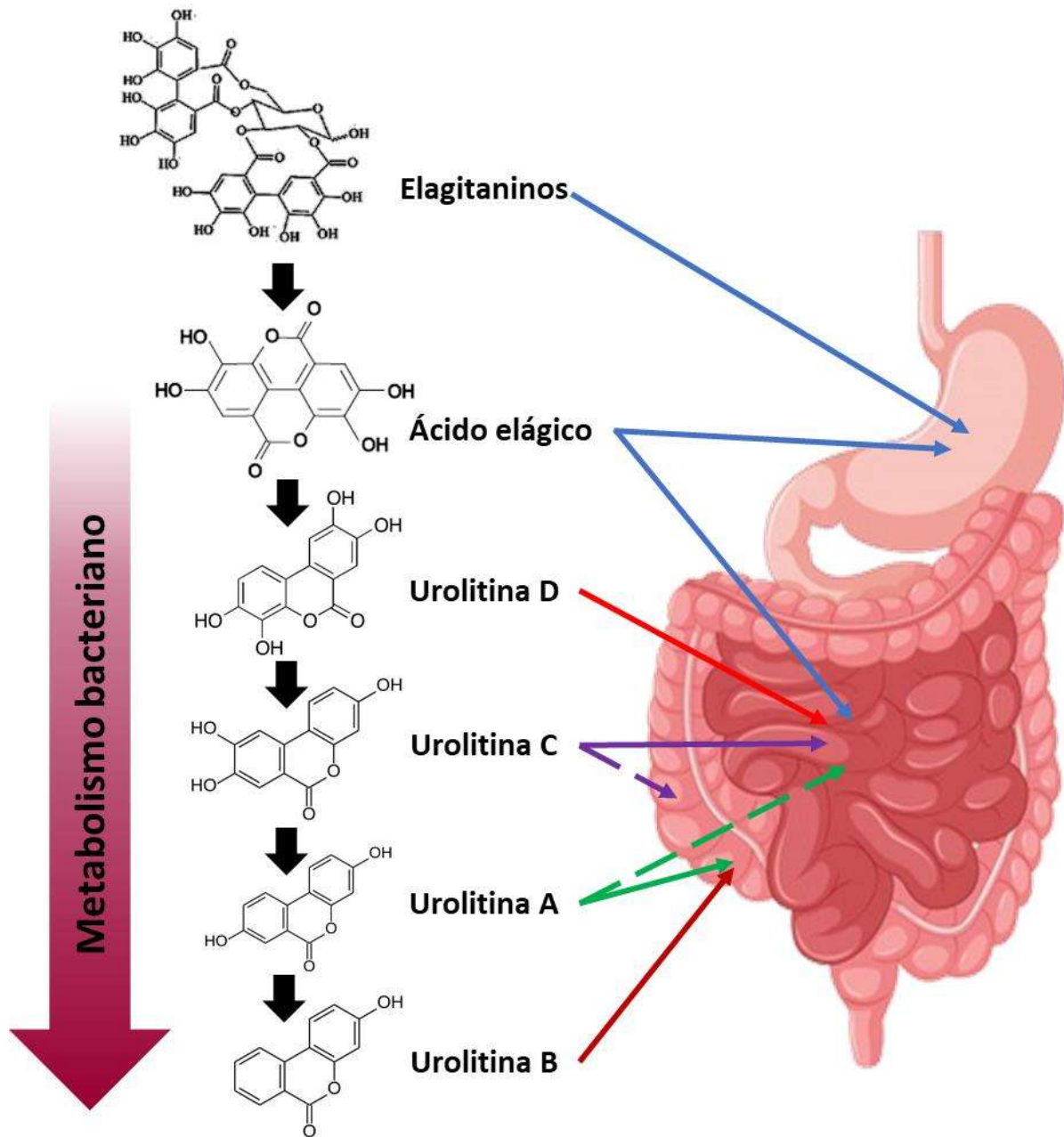



Figura 11 Producción de urolitinas en diferentes compartimentos del aparato digestivo. Tomado de (146).



	Plasma	Yeyuno		Colon		Bilis	Orina	Heces
		Lumen	Tejido	Lumen	Tejido			
Elagitaninos	-	+	-	Trazas	-	-	-	+
Ácido eláxico	+(a)	++++	-	-	-	+(a)	+(a)	Trazas
Urolitina D	-	+++	+	+	+	+(b,c)	-	-
Urolitina C	+(b)	++	++(b)	-	-	+++ (b,c)	Trazas	-
Urolitina A	+++ (b)	+	++++ (b)	++++	+	++ (b,c)	++++ (b)	++
Urolitina B	++ (b)	-	-	+	Trazas	-	+++ (b)	-

Figura 12 Metabolismo de elagitaninos a urolitinas; distribución de tejidos y fluidos biológicos: (a) dimetilglucurónido; (b) glucurónidos; (c) metilglucurónidos. Las cruces designan la abundancia relativa de metabolitos (no con fines cuantitativos) en las diferentes muestras analizadas de cerdos, siendo “+” los valores más bajos y “++++” los más altos. "Trace" indican que los metabolitos se detectaron solo en algunas muestras y siempre en cantidades muy pequeñas (cerca del límite de detección). Tomado de (151).

Después de la administración oral, se detectó ácido eláxico en el corazón, hígado, los riñones e incluso el cerebro. Sin embargo, la concentración fue relativamente baja excepto en el hígado y riñón. Media hora después del consumo de ácido eláxico, la concentración en el hígado alcanzó su punto máximo y fue tres veces mayor que la concentración máxima en plasma. A este tiempo, el riñón contenía cantidades moderadas de ácido eláxico y los tejidos del corazón, pulmón y cerebro contenían una concentración baja. Después de 4 h de la administración oral, el hígado y riñón todavía mantenían concentraciones comparativamente altas de ácido eláxico, mientras que el corazón, pulmón y cerebro tenían concentraciones relativamente bajas (152). En los humanos el metabolismo del ácido eláxico y la consecuente producción de las urolitinas dependería básicamente de la edad. Se ha planteado que con la edad existe un metabolismo que conduce a la disminución de la producción de urolitina A concomitante a un incremento de la producción de isourolitina A y/o urolitina B hasta los 30-40 años, después de lo cual el metabolismo de las urolitinas permanecería casi constante (153).

II.3.5 Estudios toxicológicos realizados con ácido gálico y ácido elálgico

II.3.5.1 Estudios toxicológicos con ácido gálico/galotaninos

Algunos estudios de toxicidad pueden encontrarse en la literatura respecto al ácido gálico y los galotaninos. El primero se refiere a un estudio de toxicidad aguda y subaguda de dosis repetidas durante 28 días de ácido gálico en ratones albinos de tres meses de edad con un peso de 25-90 g que fue realizado siguiendo las guías 423 y 407 de la OCDE. El estudio de toxicidad aguda se realizó con 2 grupos con 3 ratones hembra, un grupo fue el control y al otro grupo se le administró por vía oral una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal. El resultado de este estudio no mostró alteraciones significativas en el comportamiento de los animales después de su administración, ni en el peso corporal, de hecho, ambos grupos experimentales sobrevivieron sin síntomas de toxicidad lo cual sugirió que la DL_{50} fue mayor a 2000 mg/kg. Para la realización del estudio de toxicidad subaguda se formaron 4 grupos de 10 animales (5 hembras y 5 machos) como sigue: 1) Grupo control (administrado con agua), 2) Grupo administrado 100 mg/kg de ácido gálico, 3) Grupo administrado con 300 mg/kg de ácido gálico, 4) Grupo administrado con 900 mg/kg de ácido gálico. La administración fue vía oral diariamente durante 28 días, los resultados indicaron que no hubo un impacto importante en el consumo de alimentos y agua, ni se mostraron comportamientos extraños en los animales. Los resultados de estos estudios sugieren que la ingestión de ácido gálico no tiene efectos adversos o toxicidad aguda o subaguda que tenga alguna preocupación para la salud, aunque los autores observaron a nivel histopatológico la presencia de adipocitos en médula ósea, la que asociaron con una supresión medular no significativa (154).

Posteriormente se realizó un estudio de toxicidad subcrónica con ácido gálico por administración oral en ratas F344 de 5 semanas de edad. El ácido gálico fue administrado en la dieta durante un período de 13 semanas. En los resultados se encontró que en el grupo que recibió 5% del ácido gálico la ganancia de peso corporal fue significativamente menor que la de los controles hasta el final del experimento. Los efectos tóxicos tras la administración incluyeron reducción de la concentración de hemoglobina, hematocrito y recuentos de glóbulos rojos y aumento de reticulocitos. Además, se reportó la presencia de hematopoyesis extramedular, depósito de hemosiderina y congestión en los bazo de algunos animales. Adicionalmente, se observó hipertrofia centrolobulillar de las células hepáticas, reflejada en un aumento del peso

del hígado, en animales de ambos sexos del 1,7%. Sin embargo, la gravedad de estos cambios patológicos fue leve. Con base en los datos de toxicología, determinaron que 0,2% de ácido gálico correspondía al nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) en ratas. Este nivel era equivalente 119 y 128 mg/kg/día, respectivamente para ratas macho y hembra (155).

En un estudio toxicológico *in vitro* realizado sobre células testiculares se observó que el ácido gálico inhibe el crecimiento y la proliferación de estas células en forma dosis-dependiente y aumenta significativamente el nivel intracelular de peróxido de hidrógeno en espermatogonias de ratón ($p < 0,05$). En consecuencia, los autores sugirieron que el ácido gálico ejerce efectos citotóxicos sobre las células testiculares por su actividad pro-oxidativa (156). Los resultados de una evaluación *in vivo* realizada usando la curcumina y el ácido gálico en forma aislada y combinados en ratas Wistar durante 30 días a una dosis de 100 mg/kg por vía oral demostraron que el tratamiento con ácido gálico disminuyó la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa e incrementó la actividad de la glutatión transferasa comparativamente a los niveles basales. Del mismo modo, las concentraciones basales de malonaldehído a nivel hepático se incrementaron por 123 veces como consecuencia del tratamiento con ácido gálico, mientras que la actividad basal de la superóxido dismutasa hepática decreció, y la de la catalasa se incrementó. Los niveles de proteína total, el nivel de creatinina basal, la actividad de la lactato deshidrogenasa y la fosfatasa alcalina en el suero de los animales aumentaron significativamente en un 6,81%, 136,3%, 29% y 68,81%, respectivamente, después del tratamiento con ácido gálico en comparación con los valores basales. El tratamiento con el ácido gálico también provocó un incremento en el conteo de plaquetas mientras que a nivel histopatológico en el hígado de las ratas tratadas con este compuesto se presentó una leve infiltración celular periportal de células mononucleares. Sin embargo, los hallazgos histopatológicos más preocupantes se encontraron nivel renal donde se observó la presencia de células inflamatorias y pérdida parcial de la cápsula de Bowman (157).

Otro estudio *in vivo* determinó la NOAEL del ácido gálico en ratones albinos de 6 a 8 semanas de edad, a los cuales se les administró una dosis de 5000 mg/kg de peso corporal. Los autores no constataron signos de toxicidad o mortalidad, concluyendo que dicho compuesto no es tóxico hasta un nivel de 5000 mg/kg. Además, se realizó un estudio subagudo, administrándoles a los ratones una dosis diaria de 1000 mg/kg por vía oral durante 28 días, sin observar ningún cambio apreciable en el peso corporal, aunque hubo una leve disminución en la ingesta

comparativamente al grupo control, y no hubo grandes diferencias en los análisis hematológicos, lo que indica la no existencia de una toxicidad acumulativa (158). La hepatotoxicidad y nefrotoxicidad del extracto enriquecido con galotaninos aislados de *Galla Rhois* se determinó en ratones hembras de 8 semanas de edad. Para ello se tuvo en cuenta el peso corporal, peso de órganos, la composición de la orina, la patología hepática y renal después de la administración oral de 250, 500 y 1000 mg/kg/día de *Galla Rhois* enriquecido con galotanino durante 14 días. En los resultados el peso corporal, peso de los órganos, los fenotipos clínicos, los parámetros urinarios y la mortalidad de los ratones no difirieron entre los grupos tratados con galotanino y el grupo tratado con vehículo. Estos resultados sugieren que el galotanino aislado de *Galla Rhois* no induce ninguna toxicidad específica en el hígado y en órganos renales a dosis de 1000 mg/kg/día, lo que indica que no es trata de un nivel de efecto adverso observado (NOAEL) (159). Haciendo un resumen de los estudios toxicológicos publicados pueden apreciarse contradicciones en cuanto al análisis del potencial tóxico del ácido gálico libre y los galotaninos, lo que nos lleva a reanalizar nuevamente el carácter tóxico intrínseco de este compuesto y su impacto a nivel de órganos como el corazón, hígado, riñón y pulmón.

II.3.5.2 Estudios toxicológicos con ácido elágico

Existen relativamente pocos estudios toxicológicos con ácido elágico comparativamente a los encontrados con ácido gálico. En un estudio se evaluó la toxicidad oral aguda de cuatro flavonoides (ácido boswélico, ácido elágico, quercetina y rutina), utilizando ratas de Wistar albino (170-200 g). Las ratas se agruparon (n = 3), y la dosis de los animales de prueba se determinó según la directriz 423 de la OCDE. Los autores reportan que los animales que recibieron el ácido elágico, como los otros flavonoides no mostraron ningún cambio en su patrón de comportamiento. Además, no se constataron diferencias significativas en los pesos corporales y el consumo de alimentos en comparación con el grupo tratado con vehículo, ni se evidenciaron cambios patológicos. Por lo tanto, concluyeron que el ácido boswélico, ácido elágico, quercetina y rutina no generan toxicidad a la dosis de 2000 mg/kg (160).

En el siguiente reporte evaluaron el perfil de toxicidad aguda y subaguda de los extractos etanólicos de *Punica granatum* (L), fruta entera, semillas y ácido elágico sintético, administrando por vía oral a 2000 mg/kg de peso corporal en ratones albinos suizos, siguiendo las directrices de la OCDE 425. Los resultados arrojaron que el valor LD₅₀ es mayor de 2000

mg/kg de peso corporal. No hubo mortalidad o alteraciones de comportamiento registrados en los grupos tratados. Tampoco se observaron alteraciones significativas ($P > 0.05$) en la ganancia del peso corporal, la ingesta de alimentos y agua. Los parámetros hematológicos y bioquímicos y los pesos de órganos no evidenciaron ninguna alteración significativa ($P > 0.05$) en los grupos tratados en comparación con el control. El examen detallado de la histopatología del hígado y el riñón no reveló ningún daño celular observable, tanto para la evaluación de la toxicidad aguda como la subaguda (161). Este estudio concuerda con Tasaki M et al, (2008); quienes evaluaron la toxicidad subcrónica del ácido elálgico en ratas F344 los que estimaron que el nivel de efecto no observado (NOEL) era del 5% (3,011 mg/kg pc por día) para los machos mientras que en hembras la NOAEL correspondió a (3,254 mg/kg pc/día) (162).

Hoy en día, entre los investigadores, existe una tendencia generalizada a pensar que las urolitinas, en lugar del ácido elálgico, podrían ser las moléculas bioactivas realmente responsables de los beneficios y la toxicidad provenientes de los elagitaninos y los alimentos ricos en ácido elálgico. Esta hipótesis está respaldada por el conocimiento de que, aunque los hallazgos *in vitro* han demostrado que el ácido elálgico y las urolitinas son igualmente activos, los estudios *in vivo* han podido detectar solamente a las urolitinas en los fluidos biológicos, células y tejidos por lo que a ellas se les atribuyen los mayores efectos relacionados con el ácido elálgico (163). En realidad, las urolitinas son moléculas que poseen un doble efecto, capaces de ser beneficiosas pero, dependiendo de su estructura, condiciones ambientales, las células bajo estudio, edad y estado de salud de los individuos, también podría resultar dañinas para la salud (164). La cantidad y tipología de las urolitinas producidas en el intestino depende de la actividad metabólica de la microbiota, que se caracteriza por una gran heterogeneidad interindividual. La absorción de las urolitinas, la concentración sanguínea y tisular, y la variabilidad entre sujetos, son variables impredecibles, que conducen a respuestas biológicas heterogéneas que, paradójicamente, podrían promover efectos adversos (164).

En el 2017, se evaluó por primera vez la genotoxicidad, toxicocinética y la seguridad de dosis repetidas del de la urolitina A, uno de los metabolitos descritos para el ácido elálgico, administrada por vía oral en ratas. En los estudios de 28 días se administraron 0, 0.175, 1.75 y 5.0% urolitina A mezclada en la dieta mientras que en los estudios de 90 días (0, 1.25, 2.5 y 5.0% urolitina A mezclada en la dieta). Los resultados obtenidos no mostraron alteraciones en los parámetros clínicos, química sanguínea, citometría hemática, y ningún órgano diana indicó

algún mecanismo tóxico específico. La NOAEL fue la dosis más alta probada, 5% urolitina A por peso en la dieta, o 3,451 mg/kg pc/día en machos y 3,826 mg/kg pc/día en hembras en el estudio oral de 90 días (165).

Sin embargo, en otra investigación llevada a cabo en personas obesas, se observó que existían individuos que, como resultado de su metabolismo producían isourolitina A y/o urolitina B en adición a la urolitina A, los que se encontraban en riesgo de complicaciones cardiovasculares comparativamente a aquellos que solo producían urolitina A o los que no generaban urolitinas como resultado de su metabolismo. De hecho, en este estudio se puso de manifiesto que los efectos positivos de las urolitinas pueden verse ensombrecidos por efectos secundarios negativos de la iso-urolitina A y la urolitina B generadas como consecuencia del metabolismo en ciertos individuos (166). Estos resultados sugirieron que existe un efecto personalizado hacia los alimentos que contienen elagitaninos y ácido elágico que podría explicar las controvertidas acciones de estos compuestos para la salud. Las propiedades redox de la urolitina A y B fueron investigadas y comprobaron que, aunque estas moléculas son potentes antioxidantes en el ensayo ORAC, se comportan mayoritariamente como fuertes pro-oxidantes en ensayos basados en células, lo que podría explicar la toxicidad asociada a su consumo por vía oral (167). Un estudio realizado en células epiteliales demostró que el ácido elágico a 5 µg/mL es capaz de incrementar la toxicidad de compuestos como el benzopireno en células epiteliales bronquiales (168). No obstante, Saba y colaboradores (2013), estudiaron el efecto protector del ácido elágico sobre la toxicidad pulmonar en ratas expuestas a bleomicina y ciclofosfamida (169).

En resumen, los resultados provenientes de estudios de toxicidad del ácido elágico muestran resultados contradictorios que merecen un análisis más exhaustivo. Dado que el ácido elágico es prácticamente insoluble y solo una fracción insignificante de este se absorberá en el tracto gastrointestinal, se ha postulado que esencialmente toda la molécula ingerida será metabolizada por la microbiota intestinal a urolitinas, las que son de fácil absorción y circularán en la sangre alcanzando células y tejidos (164). Como ya se explicó, dependiendo de la edad de los individuos, sus condiciones de salud y la composición de su microbiota intestinal, los tipos de urolitina producidas y su concentración pueden variar, así como las respuestas biológicas a esta exposición pudiendo generarse efectos adversos graves e impredecibles para la salud.

II.4 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y NEFROTOXICIDAD

II.4.1 Características estructurales y funcionales de la mitocondria

La mitocondria es el orgánulo esencial para la vida de las células eucariotas y cuenta con su propio genoma; su estructura está dada por dos membranas que separan dos compartimentos distintos, el espacio intermembranal y la matriz. La membrana interna se encuentra plegada en crestas y presenta invaginados los complejos de la cadena del transporte de electrones y la F_1F_0 ATP sintasa que controlan las tasas básicas del metabolismo celular (170–172).

Son reconocidas como la fuente principal de energía de la célula, gracias a su capacidad para producir ATP, mediante el proceso de fosforilación oxidativa. Además, las mitocondrias están implicadas en los procesos de señalización celular, diferenciación, crecimiento y muerte celular programada, así como en el control del ciclo celular (173). La respiración celular aeróbica se compone de tres partes: glucólisis, ciclo del ácido cítrico (Krebs) y fosforilación oxidativa. En la glucólisis, la glucosa se metaboliza en dos moléculas de piruvato, de ATP y NADH. Cada piruvato se oxida en acetil CoA y una molécula adicional de NADH y CO_2 . La acetil CoA se usa luego en el ciclo del ácido cítrico, que es una cadena de reacciones químicas que producen CO_2 , NADH, FADH_2 y ATP. En el paso final, los tres NADH y un FADH_2 acumulados en los pasos anteriores se utilizan en la fosforilación oxidativa para producir agua y ATP (174).

Los electrones son transferidos a los complejos I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa), respectivamente. La ubiquinona o coenzima Q acepta los electrones de estos dos complejos, reduciéndose a ubisemiquinona y ubiquinol, recibiendo un electrón a la vez. Estos electrones son transportados al complejo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa), al citocromo *c* y al complejo IV (citocromo *c* oxidasa) que los emplea para reducir al O_2 hasta H_2O . Este mecanismo se encuentra acoplado al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generándose un potencial de membrana que emplea al F_1F_0 -ATP sintasa para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP (175,176). El propósito fundamental de la cadena transportadora de electrones es la de generar el gradiente electroquímico necesario para que se efectúe la síntesis de ATP (Figura 13). A continuación, se describen las características de los 4 complejos de esta cadena.

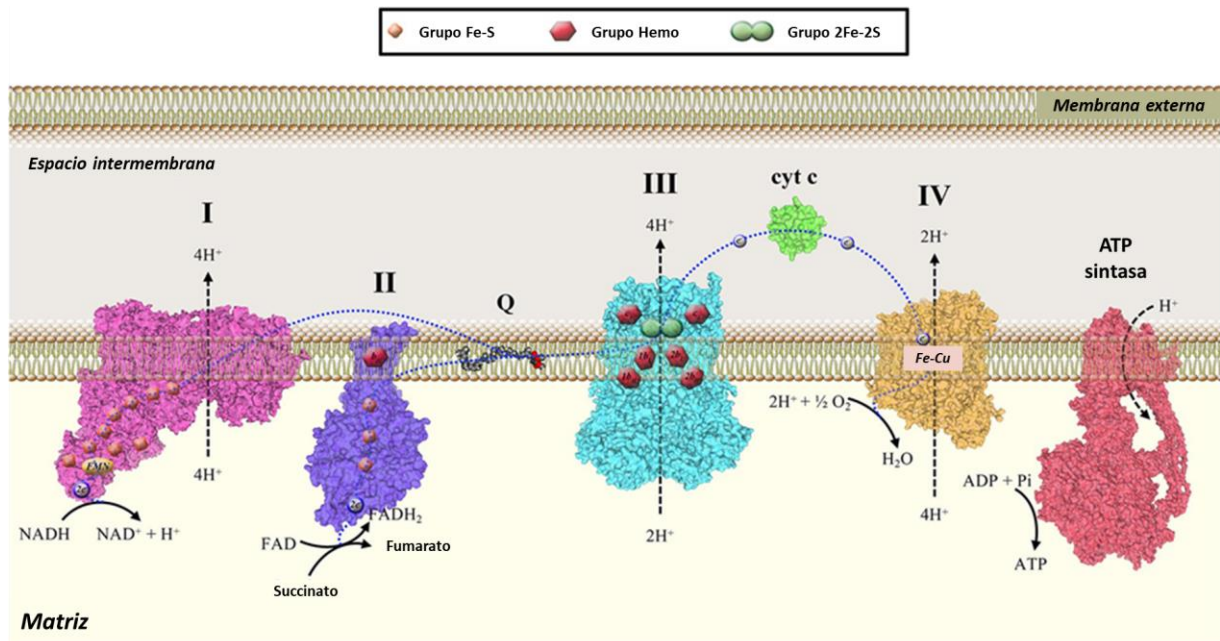


Figura 13 Complejos constituyentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Complejo I (NADH-coenzima Q reductasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (coenzima Q-citocromo *c* reductasa) y Complejo IV (citocromo *c* oxidasa). Los complejos I, III y IV establecen el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial para la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Tomado de (177).

Complejo I – NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidoreductasa

El complejo I lleva a cabo la oxidación del NADH a NAD^+ , proceso en el cual se transfieren 2 electrones a la molécula de ubiquinona (o coenzima Q) reduciéndola de este modo a ubiquinol lo que va acompañado del transporte de 4 protones (177).

El complejo I está conformado por 45 subunidades, presenta una estructura en forma de L, de manera que uno de los brazos es hidrofóbico y está embebido en la membrana interna mitocondrial, mientras que el otro es hidrofílico y se proyecta hacia la matriz mitocondrial. En el dominio hidrofílico se encuentra el cofactor flavina mononucleótido (FMN) y una cadena de grupos hierro-azufre (Fe-S) (1 [2Fe-2S] y 6 [4Fe-4S]) que conecta el FMN con el sitio de unión de la ubiquinona, además de un grupo 2Fe-2S en el lugar opuesto de la FMN. Este último grupo (N2) es el encargado de donar los electrones a la ubiquinona (178–180).

El punto de entrada de los electrones es la molécula de FMN oxidando al NADH, el par de electrones generados son transferidos secuencialmente a través de los grupos Fe-S hasta el lugar de unión de la ubiquinona donde es reducida a ubiquinol. Dicha reducción puede ocurrir en dos pasos, de manera que con la llegada del primer electrón se reduce a ubisemiquinona y con el

segundo se reduce a ubiquinol. En el proceso de reducción de la molécula de ubiquinona genera ERO como la reducción de O_2 a superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o a H_2O_2 (177,179).

Complejo II – Succinato deshidrogenasa o Succinato coenzima Q reductasa

El complejo II está compuesto por 4 subunidades: SDHA, SDHB, SDHC y SDHD. Es el complejo más pequeño de la cadena de transporte de electrones (CTE), así como el único codificado sólo por ADN nuclear y que no bombea protones al espacio intermembranal (181). Forma parte del ciclo de Krebs ya que se encarga de la oxidación de la molécula de succinato a fumarato y los electrones generados reducen la molécula de ubiquinona (180).

Las subunidades SDHC y SDHD se encuentran ancladas a la membrana mitocondrial interna, mientras que la subunidad SDHB y la SDHA forman el grupo hidrofílico responsable de la oxidación de succinato. En la subunidad SDHA se localiza el sitio de unión del succinato y contiene el cofactor flavina (FAD). La subunidad SDHB está integrada por una cadena de 3 centros Fe-S ([2Fe–2S], [4Fe–4S] y [3Fe–4S]) (180).

En la subunidad SDHC y SDHD se encuentran los 2 sitios de unión de la ubiquinona (UQ), el UQ_P (próximo a los grupos Fe-S) y UQ_D (distal a los grupos Fe-S). Así, los electrones producidos por la oxidación del succinato son transportados al cofactor flavina (FAD), pasan por los tres grupos Fe-S y finalmente llegan a la UQ que se encuentra en el sitio UQ_P . Al igual que el complejo I, con el primer electrón que se transfiere se forma un radical ubisemiquinona y con el segundo se forma el ubiquinol (181,182). Se ha determinado la formación de ERO en el complejo II, aunque que la mayor producción de ERO en la mitocondria es en los complejos I y III (182).

Complejo III – Complejo citocromo bc_1 o Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa

El citocromo bc_1 o ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, corresponde al complejo III, es un dímero simétrico con 11 subunidades por monómero; cada uno cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c, así como el bombeo de 4 protones a través de la membrana (180,183,184).

La mayoría de estas proteínas están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citosol y se importan a las mitocondrias mediante rutas de orientación específicas. Este complejo contiene 4 grupos prostéticos redox activos: un centro Fe-S [2Fe-2S], un citocromo c_1 que contiene un

grupo hemo *c* y un citocromo *b* que contiene 2 grupos hemo *b* que catalizan la oxidación del ubiquinol y están asociados con la reducción del citocromo *c*. Tres subunidades forman el núcleo catalítico de transferencia de electrones y contienen los grupos activos redox; hemos y el grupo [2Fe2S], citocromo *b*, citocromo *c*₁ y la proteína Rieske Fe-S (185). Las subunidades que conforman el citocromo *b* están codificadas por ADN mitocondrial. Tiene 8 hélices α , 4 de ellas forman un haz que se une a los 2 hemos *b* por 2 histidinas. Estos grupos están localizados perpendicularmente al plano de la membrana y en los lados opuestos de ésta. El citocromo *c*₁ tiene un dominio globular que alberga el grupo hemo *c* y proyecta hacia el espacio intermembrana. La proteína Fe-S tiene proyecciones hacia el espacio intermembrana (EIM) y contiene un centro Rieske cuyos átomos de Fe están ligados a 2 residuos de cisteína y a 2 residuos de histidina (179,186).

Complejo III: Mecanismo de transferencia de electrones y bombeo de protones

La oxidación de ubiquinol se cataliza en el sitio Q_o de unión a ubiquinona (UQ) (Figura 14), cerca del espacio intermembranario (EIM) dentro del bolsillo de citocromo *b* que está cerca de uno de los hemos *b*, denominado *b*_L debido a su menor potencial. El sitio completo solo se forma cuando el dominio globular de la proteína Fe-S gira hacia él. Esto permite que el ubiquinol (UQH₂) se una mediante un puente entre los residuos de ambas proteínas. La reacción redox que tiene lugar entonces es notable porque uno de los electrones UQH₂ se transfiere al centro Fe-S y el segundo a hemo *b*_L. Ambos protones UQH₂ se liberan en el EIM. El dominio globular de la proteína Fe-S luego rota hacia el citocromo *c*₁ donde el electrón en el centro Fe-S pasa a través del hemo *c*₁ al citocromo *c*. El electrón del hemo *b*_L se mueve a través de la membrana para reducir el segundo hemo *b* de mayor potencial, denominado *b*_H. El complejo III tiene un sitio adicional, el sitio Q_i que puede unir UQ y reducirlo de nuevo a su forma UQH₂. Este sitio está cerca de la hemo *b*_H y en contacto con la matriz. UQ se reduce en dos pasos a UQH₂ con dos electrones producidos por dos cambios de oxidación de UQH₂ en el sitio Q_o, y con dos protones tomados del espacio de la matriz (179,185).

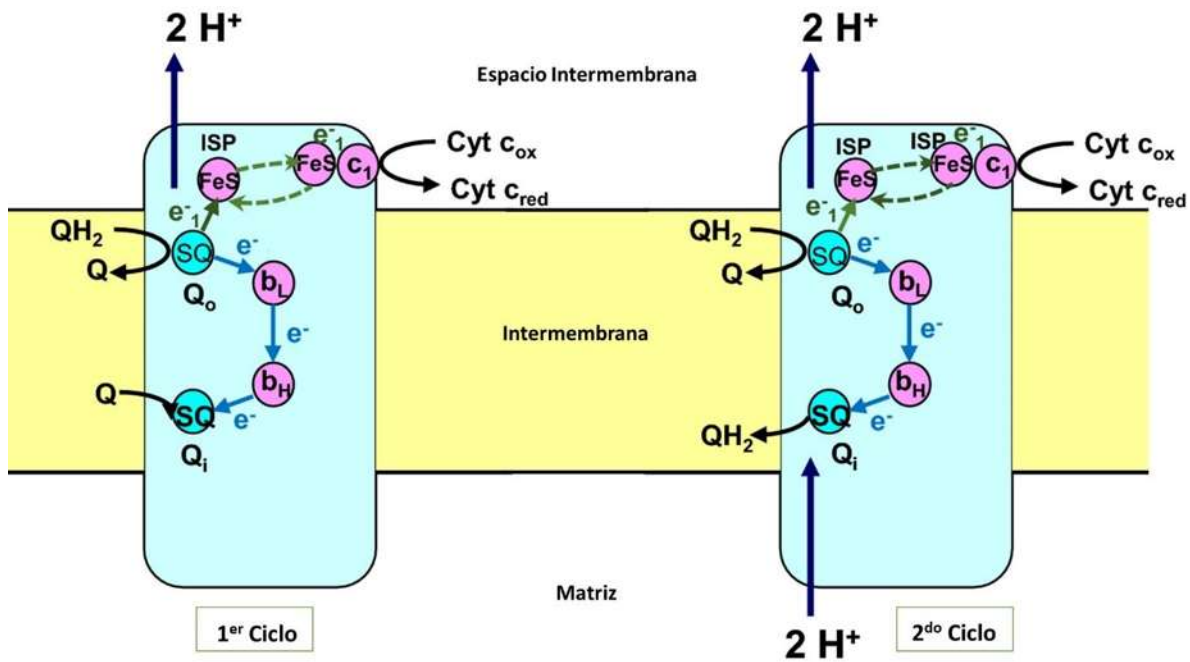
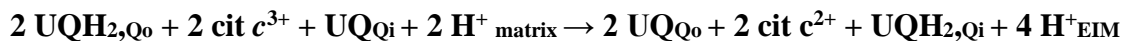


Figura 14. El ciclo Q define dos sitios de reacción: oxidación de quinol (Q_o) y reducción de quinona (Q_i)

El primer paso implica la oxidación de ubiquinol (UQH_2) en el sitio Q_o , en el que un electrón (e^-) se transfiere a la proteína hierro-azufre (ISP), al citocromo c_1 y al citocromo c (cadena de alto potencial), que luego transfiere al siguiente complejo en el ETC. Y el otro (e^-) que termina en el sitio Q_i a través de los hemes b_L y b_H (cadena de bajo potencial) forma una semiubiquinona y libera dos protones a EIM. El segundo UQH_2 se oxida de la misma manera en el sitio Q_o , pero su electrón de cadena de bajo potencial termina reduciendo la semiubiquinona y liberando un UQH_2 al recoger dos protones de la matriz. Como resultado del ciclo Q, se transfieren cuatro protones al EIM y se recogen dos protones de la matriz y se oxida un UQH_2 . Tomado y modificado de (188).

Por tanto, el ciclo catalítico implica la oxidación secuencial de dos UQH_2 en el sitio Q_o con liberación de cuatro protones al EIM. Dos electrones, uno de cada UQH_2 , pasan a lo largo de la cadena para reducir dos citocromos c . Dos electrones, nuevamente uno de cada UQH_2 , pasan a través de los hemes b y reducen un UQ a UQH_2 en el sitio Q_i con el consumo de dos protones de la matriz (187). Por tanto, la reacción completa es:



Dado que las moléculas de UQ son indistinguibles cuando dejan sus sitios de unión y se vuelven a disolver en la membrana mitocondrial interna (MMI), esto se simplifica a:



En un ciclo catalítico completo en el que se oxidan dos UQH_2 en el sitio Q_o , se liberan cuatro protones en el EIM y se toman dos protones de la matriz (179,185).

Inhibidores para el Complejo III

Existen numerosos inhibidores que actúan sobre el complejo del citocromo bc_1 y que se unen específicamente al sitio de oxidación de ubiquinol Q_0 o al sitio de reducción de ubiquinona Q_i . Estos han demostrado ser especialmente útiles para establecer el mecanismo de la enzima y para selectivamente bloquear las reacciones de transferencia de electrones en cualquiera de los dos sitios de reacción en la enzima para facilitar el análisis cinético (188). La antimicina A es un antibiótico que se ha usado como plaguicida y que se une a la citocromo c reductasa en el sitio de unión de Q_i . Esta actividad evita que la ubiquinona se una y acepte un electrón, bloqueando así el reciclaje de ubiquinol ($CoQH_2$) por el ciclo Q (174). La estigmatelina inhibe el complejo bc_1 al unirse al bolsillo de oxidación del ubiquinol, de esta manera, el inhibidor bloquea la proteína de Rieske en una conformación próxima al citocromo b (188).

Hidroxiquinonas, como UHDBT, un benzoxitiazol (3-undecil-2-hidroxi-1,4-benzoxitiazol) y atovacuna, una hidroxinaftoquinona (2- [trans-4- (40-clorofenil) ciclohexil] -3-hidroxi-1, 4 hidroxi-naftoquinona), también se unen al bolsillo de oxidación del ubiquinol y forman un enlace de hidrógeno con His181 de la proteína Rieske. Al igual que la estigmatina, estos ligandos aumentan el potencial de punto medio y cambian el espectro EPR del grupo hierro-azufre (188). Los metoxiacrilatos, como el mixotiazol, también se unen al bolsillo de oxidación del ubiquinol, pero no interactúan directamente con la proteína de Rieske. Estos inhibidores se unen proximalmente al hemo b_L y afectan sus propiedades espectrales y termodinámicas (188).

Complejo III: Mecanismos de producción ERO

El citocromo bc_1 se considera uno de los productores importantes de ERO. Es bien sabido que la inhibición del flujo de electrones dentro del complejo III mitocondrial conduce a una alta producción de ERO liberando superóxido al menos parcialmente en el espacio intermembrana y el citoplasma. La producción de $O_2 \bullet^-$ por el complejo bc_1 se atribuye a la ubisemiquinona ($UQH \bullet$) formada en el sitio Q_0 . Se ha propuesto que la $UQH \bullet$, intermediario en la bifurcación de electrones entre las cadenas de alto y de bajo potencial, puede generarse a través de dos mecanismos: 1) a partir de la reacción directa de oxidación del UQH_2 , cuando el grupo 2Fe-2S oxidado de la proteína de Rieske (cadena de alto potencial) acepta un electrón del UQH_2 unido al sitio Q_0 ; o 2) como consecuencia de la transferencia reversa de electrones desde el hemo b_L

reducido (cadena de bajo potencial) hacia la ubiquinona unida a dicho sitio Q_o . Los mecanismos se denominan semi-adelante y semi-reversa, respectivamente (189,190).

En condiciones fisiológicas, la producción de $O_2^{\bullet-}$ por el complejo III se incrementa a elevado $\Delta\Psi$, compatibles con el estado 4. El potencial de membrana se opone a la transferencia de electrones entre los citocromos b_L y b_H ; por lo tanto, elevados $\Delta\Psi$ permiten la acumulación de electrones en la cadena de bajo potencial, favoreciendo la formación o estabilización de la UQH^{\bullet} en el sitio Q_o y su autooxidación. La velocidad de generación de $O_2^{\bullet-}$ también aumenta en presencia de antimicina. En estas condiciones, la unión del inhibidor al sitio Q_i impide la oxidación de los citocromos b en la cadena de bajo potencial. El incremento en la (UQH_2), junto a la acumulación de electrones en los hemo b , limita la oxidación de la UQH^{\bullet} en el sitio Q_o , incrementando su tiempo de vida media y, por consiguiente, la probabilidad de interacción con el O_2 (190–192).

Complejo IV – Citocromo c oxidasa

El complejo IV cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c reducido al oxígeno molecular (O_2), generando de este modo moléculas de H_2O . La reducción de 2 moléculas de H_2O requiere la transferencia de 4 electrones del citocromo c junto con 4 protones provenientes de la matriz. En este proceso se liberan 4 protones al espacio intermembrana (179). La citocromo c oxidasa es un homodímero formado por monómeros de 13 subunidades. El núcleo funcional está formado por 3 subunidades, la I y II catalizan las reacciones de transferencia de electrones y protones mientras que la III proporciona el canal a través del cual difunde el O_2 al sitio activo. Estas 3 subunidades están codificadas por ADN mitocondrial (193,194)

La subunidad II tiene 2 hélices α transmembranales y un dominio hidrofílico que proporciona un sitio de anclaje para el citocromo c . Además, cuenta con un centro de cobre, Cu_A , que proporciona un punto de entrada para los electrones. La subunidad I es la más grande del núcleo de proteínas, está compuesta por 12 hélices α formando 4 grupos que dejan 3 cavidades. En una cavidad se encuentra la molécula hemo a que está ligada por 2 residuos de histidina, en otra cavidad el hemo a_3 junto con una histidina ligada a un átomo de cobre, Cu_B (179,180). Los electrones son transferidos del citocromo c al Cu_A , de aquí se transfieren al hemo a , a continuación, se transfieren al hemo a_3 y de aquí al Cu_B , para finalmente reducir el O_2 . La

reducción de O_2 a 2 moléculas de agua requiere 4 electrones y 4 protones que llegan individualmente (180).

F₀F₁-ATP sintasa

La *F₀F₁-ATP sintasa*, está formada por 2 dominios que se comportan como 2 motores rotatorios, el F_0 es transmembranal y es el encargado del transporte de protones y el F_1 es el encargado de la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial (Figura 15). El dominio F_1 está formado por las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ mientras que el dominio F_0 está formado por las subunidades ab_2c_n que están embebidas en la membrana mitocondrial interna (180,195).

Utilizando la diferencia de concentración de H^+ (ΔpH) y el potencial eléctrico ($\Delta\psi$) a través de la membrana, se produce la rotación de los dos motores rotatorios. El anillo de subunidades c en F_0 rota a lo largo de las subunidades γ , δ y ε en F_1 a la que está unido, entonces, los protones pasan por el anillo c y la rotación de la subunidad γ en el hexámero $\alpha_3\beta_3$ proporciona la energía para la síntesis de ATP. Cada subunidad β cambia de conformación, en una se une el ADP y el P_i , en la siguiente se forma el ATP y en la última este ATP es liberado. La hidrólisis de ATP sigue la misma ruta, pero en sentido contrario. Estas transiciones son causadas por la rotación de la subunidad γ . El hexámero $\alpha_3\beta_3$ debe permanecer fijo con la subunidad a durante la catálisis, lo cual ocurre a través del tallo periférico (196,197).

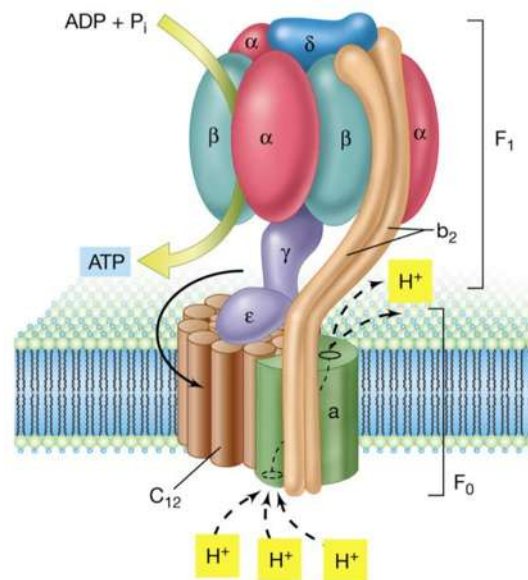


Figura 15 Estructura del complejo V. Tomado de (196).

Transportadores de electrones

Existen dos moléculas transportadoras de electrones en la CTE mitocondrial. La molécula de ubiquinona es un componente móvil, que transfiere los electrones de los complejos I y II al III y el citocromo *c* que los transporta del complejo III al IV.

Ubiquinona – Coenzima Q

La ubiquinona, también llamada coenzima Q, es una 2,3-dimetoxi-5- metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona. Se caracteriza por ser una molécula activa redox, lipofílica que se encuentra en la membrana mitocondrial interna presente en todas las células eucariotas y transfiere electrones del complejo I y II al III. Su grupo principal de benzoquinona con actividad redox está conjugado con una cadena lateral poliisoprenoide de longitud específica de especie (6-10 subunidades), que confina la molécula a estructuras ricas en lípidos. Más aún, cuenta con un papel central en la generación de energía mitocondrial y la producción de ERO, aunque su forma reducida se considera un potente antioxidante (198).

La ubiquinona puede presentar 3 estados redox diferentes: completamente oxidada (UQ), parcialmente reducida (UQ⁻) y completamente reducida (UQH₂), aunque la existencia de diferentes niveles de protonación incrementa las posibles formas redox del anillo de quinona (199).

Citocromo c

El citocromo *c* es una hemoproteína que se encuentra principalmente en estado soluble en el espacio intermembrana. Sin embargo, se puede ensamblar a la membrana mitocondrial interna a través del lípido cardiolipina el cual forma parte de esta membrana, la unión a cardiolipina es necesaria para la inserción, retención, estabilidad y función del citocromo *c* así como en el bombeo de protones en el complejo IV (200).

El citocromo *c* participa en la transferencia de electrones del complejo III al IV. El hierro de su cofactor hemo puede ser reducido u oxidado. Entre las funciones del citocromo *c*, además de transportar electrones, está la de estabilizar el complejo IV ya que se ha descrito una degradación de las subunidades de la citocromo *c* oxidasa en ausencia de este citocromo. Asimismo, el

citocromo c está involucrado en la apoptosis celular ya que su liberación al citosol desencadena este proceso (201). También, se ha descrito que posee actividad peroxidasa (202).

Mitocondria y especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las mitocondrias consumen más del 90% del oxígeno de las células, considerándose el órgano principal de la producción de ERO. En condiciones fisiológicas, el 0.2-2% de los electrones de la CTE no siguen el orden de transferencia normal, sino que se escapan directamente de la CTE e interactúan con el oxígeno para producir superóxido o peróxido de hidrógeno (Figura 15) (175,180,203).

Los radicales superóxido se convierten en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (SOD), que además puede formar el radical hidroxilo altamente reactivo. Las enzimas antioxidantes mitocondriales (MnSOD y glutatión peroxidasa-4) y citosólicas (Cu-SOD y catalasa) eliminan las ERO y limitan su toxicidad (175,203). Las ERO juegan un papel importante en la regulación de los procesos de señalización celular y en la citoprotección; por tanto, su generación controlada es necesaria para la supervivencia celular. Por otro lado, cuando se produce en exceso de las reservas de antioxidantes celulares, se produce daño del mtDNA por peroxidación de lípidos, disfunción de fosforilación oxidativa y daño a las enzimas que contienen Fe-S. El estrés oxidativo en el mtDNA o nuclear da como resultado rupturas de cadenas y modificaciones de bases, seguidas de disfunción celular, mutagénesis y carcinogénesis (204).

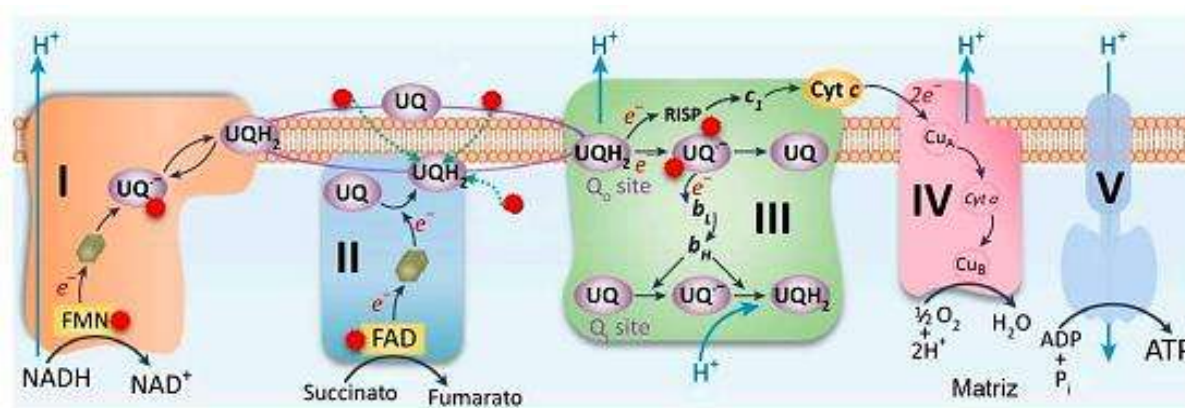


Figura 16 Esquema del flujo de electrones a través de los diferentes complejos que integran la CTE mitocondrial. En rojo, puntos de formación de ERO. Tomado y modificado de (180).

Las mitocondrias están involucradas en la muerte celular por al menos tres mecanismos generales: la liberación de proteínas que desencadenan la activación de la familia de proteasas de caspasas, la interrupción de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, y la modificación del potencial de reducción-oxidación celular (redox). Cada uno de esos mecanismos puede resultar en muerte celular programada (apoptosis) o necrosis celular. Dependiendo de la cantidad de inhibidores de citocromo *c* y caspasa disponibles, la célula sufre necrosis o apoptosis (175). Las mitocondrias responden activamente a estímulos estresantes que desafían la homeostasis celular, por lo que la aparición de numerosas enfermedades está estrechamente relacionada con el aumento de la producción de ERO.

II.4.2 Nefrotoxicidad y disfunción mitocondrial

El riñón requiere una gran cantidad de ATP para eliminar los desechos de la sangre y regular el equilibrio de líquidos y electrolitos. Las mitocondrias proporcionan el ATP necesario para impulsar estas importantes funciones y pueden adaptarse a diferentes condiciones metabólicas a través de una serie de vías de señalización que permiten equilibrar la dinámica mitocondrial y energética en aras de mantener la homeostasis mitocondrial. La disfunción mitocondrial conduce a una disminución en la producción de ATP, alteraciones en las funciones y estructura celular y la pérdida de la función renal. La disfunción mitocondrial persistente tiene un papel en las primeras etapas y la progresión de las enfermedades renales, como la lesión renal aguda que puede ser inducida por agentes tóxicos (205).

La mitocondria de la célula tubular renal es el lugar de acción de muchas nefrotoxinas. Estas interfieren con la fosforilación oxidativa y con la consiguiente producción de ATP, alterando las funciones de transporte celular y produciendo muerte celular (9,10). Aunque las células epiteliales tubulares son ricas en mitocondrias, la disfunción mitocondrial y el daño inducido por ERO también se presenta en el podocito glomerular, que tiene una capacidad limitada de regeneración y puede representar el principal mecanismo de daño renal progresivo (206,207).

La reabsorción de solutos por las células tubulares es un proceso que exige mucho ATP y, por lo tanto, esas células tienen el mayor contenido mitocondrial en el riñón. El daño tisular inducido por mitocondrias defectuosas durante la insuficiencia renal aguda está influenciado por la disminución de la producción de ATP, la síntesis de macromoléculas, un estado redox desequilibrado, los desequilibrios en la homeostasis del Ca_2^+ , la apoptosis, necrosis y

necroptosis. Los fragmentos celulares liberados por la ruptura de células necróticas o ADNmt circulante actúan como patrones moleculares asociados al daño, que activan respuestas inmunes innatas y adaptativas y la infiltración de células inflamatorias. La inflamación persistente, la muerte celular y la reprogramación metabólica defectuosa causada por la disfunción mitocondrial durante la lesión renal aguda puede provocar enfermedad renal crónica (10).

La alteración de la homeostasis mitocondrial en las primeras etapas de la lesión renal aguda se considera un factor importante que impulsa la lesión tubular y la disfunción renal persistente. Se ha considerado que la corrección de la función anormal de la CTE y/o el mejoramiento de las vías que regulan la biogénesis mitocondrial podría mejorar el funcionamiento renal al restaurar la función mitocondrial y estimular la reparación de órganos (205).

II.4.3 Ácidos gálico y eláxico y la disfunción mitocondrial

Se ha reportado en múltiples publicaciones científicas las propiedades antioxidantes, antiapoptóticas, cardioprotectoras, neuroprotectoras y anticancerígenas del ácido gálico y los galatos, y en su mayoría han demostrado sus propiedades antioxidantes o prooxidativas dependiendo de las concentraciones utilizadas y el entorno biológico. Sin embargo, se ha prestado muy poca atención a los ensayos clínicos, y esto ha restringido su uso a nivel clínico (208).

La gran mayoría de las publicaciones, describen el efecto protector del ácido gálico en mitocondria, sobre todo cuando se usa en concentraciones relativamente bajas (inferiores a 300 mg/kg) y asociado a otros compuestos tóxicos. Los resultados de un estudio bastante reciente, indicaron que las dosis de 50 y 100 mg/kg de ácido gálico y 10 mg/kg de ácido nano-gálico disminuyeron significativamente la formación de ERO, el daño de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), la producción de malonaldehído (MDA) mitocondrial, de factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) inducida por cisplatino, un reconocido fármaco anticancerígeno. Además, el ácido gálico generó un aumento significativo del glutatión reducido (GSH), de la MnSOD, la gpx-4 y catalasa en comparación con el grupo tratado con cisplatino (209). Sin embargo, en células cancerosas se ha descrito que, el ácido gálico puede inhibir la proliferación de células T24 de cáncer de vejiga, bloqueando la metástasis y promoviendo la apoptosis, produciendo disfunción mitocondrial y la supresión de la señalización de PI3K/Akt /NF- κ B (210). El efecto del ácido gálico, en su forma nativa, sobre la respiración mitocondrial en células

animales no se ha estudiado en detalle, pero se ha informado que sus ésteres podrían afectar la bioenergética mitocondrial (271). Un estudio comparativo con una serie de derivados de alquilo del ácido gálico sobre líneas celulares de sarcoma de ratón y carcinoma mamario revela que la inhibición máxima de la respiración mitocondrial podría lograrse con el galato de n-octilo seguido de otros derivados mientras que el ácido gálico mostró el potencial inhibitorio más bajo (211). Con todos los galatos, la inhibición más importante se constató sobre el complejo I previniendo la generación del gradiente de protones y la síntesis de ATP y conduciendo eventualmente a la muerte celular.

Respecto a las investigaciones con ácido elágico se ha descrito que este compuesto tiene efectos pleiotrópicos y específicos con respecto al tipo celular sobre la función mitocondrial. Al igual que en el caso del ácido gálico, cuando se usa en concentraciones relativamente bajas (inferiores a 300 mg/kg) y asociado a otros compuestos tóxicos sus efectos tienden a ser protectores sobre la función mitocondrial (212,213). Sin embargo, a altas dosis (superiores a 1000 mg/kg), el ácido elágico puede influir en las vías glucolíticas e inducir la muerte celular. Además, este compuesto puede influir en la función mitocondrial a concentraciones terapéuticamente relevantes (214). Se ha reportado que el tratamiento con ácido elágico induce una reducción en el número de células precedida por alteraciones del potencial de la membrana mitocondrial y activación de caspasa 9 y 3, fragmentación del ADN y muerte celular por apoptosis dependiente de la dosis y el tiempo (215).

En resumen, existen pocas investigaciones relacionadas con los efectos de los ácidos gálico y elágico solos y combinados en concentraciones elevadas sobre la función mitocondrial. Esto supone un desconocimiento de su potencial intrínseco tóxico sobre este orgánulo y su relación con la toxicidad sobre órganos específicos esenciales para la sobrevivencia. Nuevas investigaciones son necesarias para elucidar los efectos de ambas moléculas sobre la función mitocondrial dada la importancia que esto posee sobre la síntesis de ATP, la homeostasis celular y el funcionamiento de órganos esenciales.

III. JUSTIFICACIÓN

Los ácidos gálico y elágico son ácidos fenólicos presentes en una gran variedad de alimentos, en plantas medicinales de uso frecuente por la población y además coexisten en múltiples frutas, verduras y bebidas de gran aceptación popular. En los últimos años, el mercado de productos naturales ha incrementado el número de suplementos nutricionales que contienen ambas sustancias bajo atribuciones de supuestos efectos beneficiosos para la salud de los consumidores. El uso indiscriminado de suplementos nutricionales, ligado con el consumo de frutas, verduras, té, así como plantas medicinales ricas en estos compuestos podría generar un incremento en la ingesta total de estas sustancias conduciendo a la aparición de eventos adversos e intoxicaciones, siendo esto motivo de preocupación por agencias regulatorias como la FDA. Por ello, se hace necesario estudiar el potencial intrínseco tóxico de estas moléculas solas y en combinación con vistas a proponer soluciones terapéuticas ante intoxicaciones, además interesa conocer las dosis seguras para esquemas de administración continua. Aunque existen investigaciones acerca de la toxicidad aguda de los ácidos gálico y elágico en roedores, los resultados son contradictorios y no se conocen los efectos tóxicos que la administración conjunta de ambos compuestos podría tener sobre modelos animales, ni tampoco es conocido su impacto sobre órganos diana como el riñón, hígado, corazón y pulmón. En consecuencia, en el presente trabajo nos hemos propuesto estudiar la toxicidad oral aguda de estos dos compuestos solos y en combinación sobre ratas Wistar siguiendo el protocolo estandarizado de la OCDE en su guía 423. Dado que la lesión en órganos diana como el riñón puede ser causada por la disfunción mitocondrial (216) en la presente investigación se determinará si estos compuestos químicos solos y combinados alteran la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico así como la producción de ERO en las mitocondrias renales.

IV. HIPÓTESIS

Los ácidos gálico y elágico administrados en forma aislada y en combinación inducen toxicidad en altas dosis por vía oral generando alteraciones sobre la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias renales mediante el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Determinar la toxicidad oral aguda de los ácidos gálico y elágico solos y en combinación en ratas Wistar según el método de clases de toxicidad y analizar su impacto sobre la CTE y la producción de ERO en mitocondrias renales.

V.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la toxicidad oral aguda de los ácidos gálico, elágico y su combinación mediante análisis macroscópico e histopatológico, determinación de peso corporal, consumo de alimentos y medición de parámetros hematológicos y bioquímicos.
2. Determinar el efecto de estas moléculas en las actividades enzimáticas de los 4 complejos de la CTE en mitocondrias de riñón.
3. Evaluar el efecto de los ácidos gálico, elágico y su combinación, sobre la producción de ERO en las mitocondrias de riñón.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental llevada a cabo en el presente trabajo de investigación se representa en la (Figura 17).

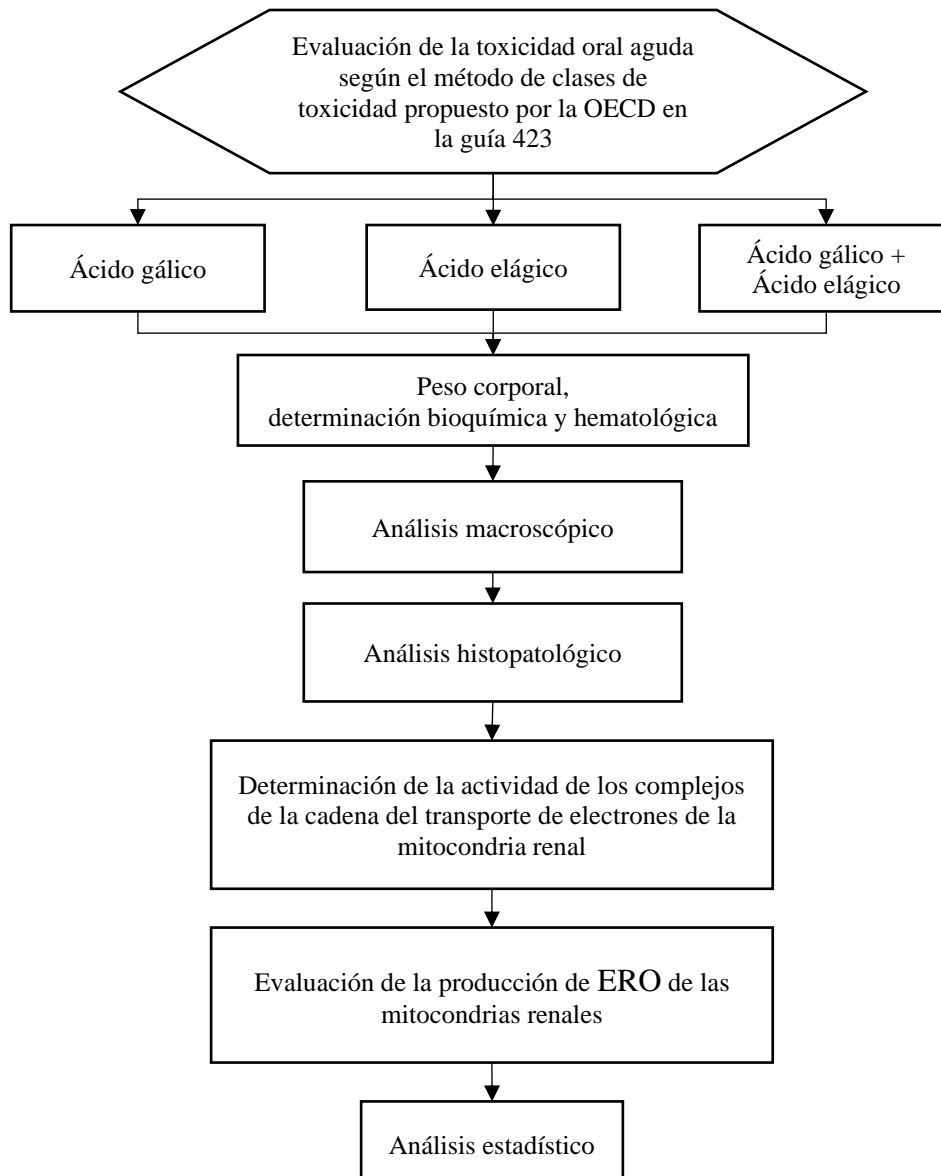


Figura 17 Estrategia metodológica empleada en el presente trabajo

VII.MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Estudio de toxicidad oral aguda de los ácidos gálico, elágico y la combinación

VII.1.1 Animales de experimentación

Como modelo biológico se utilizaron ratas Wistar hembras de 7 a 12 semanas de edad siguiendo los lineamientos de la guía 423 de la OCDE. Los animales fueron alimentados con dieta para roedores Nutricubos® (elaborado por: Agribrands Purina México, S.A de C.V. Prol. P de la Reforma 1015, Torre A, 3er. Piso. Col. Desarrollo Sta. Fe Delegación Álvaro Obregón C.P. 01376 México, D.F.) y se mantuvieron en el bioterio del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo las siguientes condiciones: 22 °C ± 3°C, humedad 70%, luz artificial con periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, alimento y agua *ad libitum*. El trabajo con los animales se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la Normatividad Mexicana con respecto al uso y cuidado de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, México). El estudio presentado fue aprobado por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

VII.1.2 Estudio de toxicidad oral aguda

Se evaluó la toxicidad oral aguda de los ácidos gálico, elágico y la combinación según el método de clases de toxicidad propuesto por la OECD en la guía 423 (31). Se asignaron tres ratas de manera aleatoria al grupo control (C1) y tres ratas a cada uno de los grupos de estudio (G1, G2, G3) a los que se les administró las concentraciones de 200, 1000 y 2000 mg/kg de ácido gálico (Meyer® CAS No:5995-86-8), en dosis única utilizando una cánula intragástrica, mientras que el grupo control fue administrado con agua purificada. En el caso del ácido elágico tres ratas fueron asignadas a cada uno de los grupos experimentales (GAE1, GAE2, GAE3), a los que, en forma similar a la administración realizada con ácido gálico, se les administró concentraciones de 200, 1000 y 2000 mg/kg de este compuesto (LTK Laboratories, Inc. Minnesota EUA. CAS No:476-66-4) en dosis única; mientras que el grupo control fue administrado con

dimetilsulfóxido (DMSO) Merck® [CAS: 67-68-5] al 0.2%; cuidando de no exceder 2 ml/100 g de peso del animal para todas las administraciones, tal y como lo establece la guía 423 de la OCDE. Se decidió el uso del DMSO al 0.2% en agua destilada considerando la baja polaridad del ácido elálgico y teniendo en cuenta que este solvente ha sido utilizado en otras investigaciones donde el ácido elálgico se ha empleado por vía oral en roedores (217–220). Los grupos correspondientes a la combinación fueron administrados con una mezcla de ácidos gálico + ácido elálgico a una concentración de 1000 mg/kg ácido gálico + 1000 mg/kg ácido elálgico en dosis única, tal y como se recomienda en la guía 423 de la OCDE (221).

Al séptimo día, posterior a la adaptación, los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 h, se pesaron y se les administró con ayuda de una cánula intragástrica, una dosis única de solución acuosa en las concentraciones antes descritas; los grupos experimentales se mantuvieron en observación constante la primera media hora, cada media hora las primeras 4 horas, cada hora durante las siguientes 24 horas y una vez al día durante los próximos 13 días para determinar muerte o presenciar signos y síntomas de toxicidad. Los signos de toxicidad evaluados fueron los siguientes: aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, lagrimeo, excretas), comportamiento (actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación); otras alteraciones (temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteración de los reflejos, tamaño de pupila, opacidad corneal, lesiones en piel).

Posterior a esto, las ratas fueron pesadas a los 0, 7 y 14 días después de la administración, para registrar el consumo de alimento y peso corporal. El día catorce después de la administración, los grupos experimentales se mantuvieron en ayuno durante 12 h y se procedió al sacrificio de los animales después de ser anestesiados con Pentobarbital de uso veterinario (Pisabental® No. de Registro: Q-7833-215) a dosis de 80 mg/kg. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca para las determinaciones bioquímicas y hematológicas. Además, se extrajeron los órganos quienes fueron utilizados para el análisis macroscópico e histopatológico.

VII.1.3 Determinaciones bioquímicas y hematológicas

Las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca se utilizaron para realizar determinaciones bioquímicas (glucosa, creatinina, urea, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, alanina amino-transferasa, aspartato amino-transferasa y gamma glutaril-transferasa) y hematológicas (leucocitos totales, linfocitos, bandas, segmentos, monocitos, eosinófilos,

basófilos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, volumen corpuscular medio de la hemoglobina, concentración hemoglobina corpuscular media, amplitud de distribución de glóbulos rojos, conteo de plaquetas, volumen corpuscular medio de las plaquetas). Los análisis fueron realizados por el laboratorio EDULAB, situado en la Ciudad de Morelia, Michoacán.

VII.1.4 Análisis macroscópico

Para el análisis macroscópico se extrajeron y se pesaron los siguientes órganos: corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, y encéfalo, los cuales fueron depositados para su conservación en una solución fijadora de formaldehído Meyer® [CAS: 50-00-0] al 10%, tamponada a un pH de 7.0. El peso relativo del órgano se calculó sobre la base de lo siguiente: $\text{Peso relativo del órgano (\%)} = \text{peso del órgano/peso corporal en el sacrificio} \times 100$ (216).

VII.1.5 Análisis histopatológico

Para el análisis histopatológico, se deshidrataron los órganos antes mencionados en concentraciones de alcoholes ascendentes; se aclararon con un líquido diafanizador (xilol) Meyer [CAS:1330-20-7], dándole un aspecto translúcido a la muestra, brindándole la solubilidad que requiere para su posterior inclusión en parafina Paraplast Leica®. Los cortes histopatológicos se efectuaron en el Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo con un micrótopo de rotación RM2125 RTS Leica Biosystems, se realizaron los cortes a 3 y 5 μm y se montaron en una laminilla para su posterior tinción con la técnica de hematoxilina-eosina.

VII.2 Análisis del impacto de los ácidos gálico, elágico y la combinación sobre la mitocondria renal

VII.2.1 Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias renales se aislaron mediante centrifugación diferencial (222). Se obtuvo un homogeneizado de riñón completo en una solución (Medio 1) que contenía 220 mM manitol [CAS: 69-65-8], 70 mM sacarosa [CAS: S0389/ 57-50-1], 2 mM ácido 4-morfolinpropanosulfónico (MOPS) [CAS: 1132-61-2], 1 mM ácido etilen-bis (oxietilenitrilo) tetraacético tetrasódico (EGTA) (pH 7,4) [CAS: 13368-13-3] y se centrifugó a 314xg. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 4410xg. El sedimento resultante se lavó

con una solución (Medio 2) que contenía manitol 220 mM, sacarosa 70 mM y MOPS 2 mM (pH 7,4) y se centrifugó a 6350xg. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 500 μ l de medio 2. Cada centrifugación se realizó durante 10 min a 4 ° C. La concentración de proteína mitocondrial se determinó mediante el método de Biuret con modificaciones menores (223).

VII.2.2 Determinación de las actividades de los complejos de la CTE

Para evaluar las acciones de los ácidos gálico y elágico sobre los complejos de la CTE, se consideraron 5 ratas por grupo experimental que fueron administradas con ácido gálico (2000 mg/kg), ácido elágico (2000 mg/kg) y la combinación (1000 mg/kg ácido gálico + 1000 mg/kg ácido elágico) en dosis única por vía oral siguiendo el procedimiento previamente descrito para el análisis de la toxicidad aguda. Se escogió trabajar con la máxima dosis considerando que este nivel representa una dosis suficientemente elevada para poder observar la toxicidad intrínseca tóxica de los compuestos sobre la CTE de las mitocondrias renales. Después de 14 días de la exposición, las ratas se sacrificaron y se procedió al aislamiento de las mitocondrias renales. Para determinar la actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I) se resuspendieron 0.1 mg/mL de mitocondrias en cbp 2 mL de tampón 50 mM KH_2PO_4 y se incubaron con 1 μ g de antimicina A más 1 mM KCN Sigma aldrich. Después de 5 minutos, se añadió 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y se siguió la absorbancia durante 1 minuto a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550. Luego, se añadió 0.5 mM NADH Sigma aldrich y se midió su oxidación durante 4 min. La tasa de oxidación de NADH se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $16.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para NADH.

Para medir la actividad de los complejos II, III y IV se solubilizaron mitocondrias con Triton X-100 (270), antes de cada ensayo con el fin de mejorar la accesibilidad de los sustratos e inhibidores a los sitios redox de la CTE. Para medir la actividad del complejo II se resuspendieron 0.1 mg/ml de mitocondrias solubilizadas en 1 ml cbp de tampón 50 mM KH_2PO_4 y se incubaron con 0.01 mM rotenona Cayman más 1 μ g de antimicina A más 2 mM KCN durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) y se midió espectrofotométricamente a 600 nm siguiendo la reducción del DCIP en presencia de succinato 10 mM como sustrato.

Se siguió la actividad succinato-citocromo *c* oxidorreductasa (complejo III) incubando 0.1 mg/ml mitocondrias solubilizadas con 0.01 mM de rotenona más 2 mM KCN durante 5 minutos

a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 0.45 mM de citocromo *c* oxidado midiendo a 550 nm la reducción del citocromo *c* sensible a antimicina A. La actividad de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) se evaluó incubando 0.1 mg/ml de mitocondrias solubilizadas en 1 ml cbp de tampón 50 mM KH₂PO₄ más 1 µg de antimicina A más 0.01 mM rotenona. Después de 5 minutos se adicionó citocromo *c* reducido midiendo la oxidación a 550 nm, a los 20 segundos se agregó 2 mM KCN (224).

VII.2.3 Evaluación de la producción de ERO

La generación de ERO se estimó registrando la oxidación de la 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH). Se incubaron 0.1 mg/mL de mitocondrias descongeladas y 1.25 mM de H₂DCFDA, en un tampón que contenía 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 3 mM KH₂PO₄ (pH 7.4) durante 20 min a 4 °C bajo agitación constante. Posteriormente, se colocó la suspensión mitocondrial en una cubeta de cuarzo y se registró la fluorescencia basal durante 1 minuto, se añadió glutamato-malato 10 mM o succinato 10 mM más rotenona y los cambios en la fluorescencia de H₂DCFDA fueron seguidos adicionalmente durante 20 min en un espectrofluorofotómetro RF-5301PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) (λ ex 491 nm; λ em 518 nm). Los niveles de ERO se calcularon considerando la diferencia de la fluorescencia (ΔF) en unidades arbitrarias, restando la fluorescencia máxima alcanzada 20 min después de la adición del sustrato menos la fluorescencia basal antes de la adición de los sustratos (225).

VII.3 Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron expresados como media \pm desviación estándar de las seis repeticiones. Para las pruebas de toxicidad oral aguda, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0.05$) y se realizó una prueba de Tukey para la comparación de medias ($P < 0.05$). El análisis estadístico se efectuó en los programas JMP 6, GraphPad Prism 8.

Para el análisis estadístico de la medición de los cuatro complejos de la CTE y actividad de ERO, los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de 5 experimentos independientes utilizando muestras de diferentes animales para cada experimento. Las diferencias estadísticas de los datos ($P < 0.05$) se determinó mediante la prueba ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey para los complejos y prueba post-hoc de Dunn's para la medición de ERO, utilizando el software SigmaPlot 11.0.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Detección de signos y síntomas de toxicidad aguda de los ácidos gálico, elágico y la combinación de ambos compuestos

La administración oral de los ácidos gálico y elágico y de la combinación, no generó ningún signo o síntoma de toxicidad, respecto a la apariencia general de los ojos, la piel, el pelaje y la mucosas. Tampoco se observó presencia de lagrimeo, piloerección, patrón discontinuo respiratorio e incremento/disminución pupilar en los animales estudiados. Del mismo modo, no se registraron alteraciones en la postura y la marcha de las ratas. Además, no hubo ningún signo de movimientos tónico-clónicos, comportamientos estereotípicos como aseo excesivo y círculos repetitivos o cualquier comportamiento extraño como caminar hacia atrás y automutilarse. Las actividades motoras tampoco se vieron afectadas, todas las ratas sobrevivieron al experimento a los diferentes niveles de dosis administrados.

VIII.2 Consumo de alimento

Las ratas que fueron tratadas con ácido gálico mostraron una tendencia hacia la disminución del consumo de alimento más marcada del día 7 al 14 con diferencias estadísticas significativas para las dosis de 1000 y 2000 mg/kg (Figura 18-A); mientras que para la dosis de 200 mg/kg se apreció un consumo de alimentos similar al control al día 7 después de la administración, con una tendencia leve hacia la disminución hacia el día 14.

En cuanto al consumo de alimentos del ácido elágico se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) para las dosis de 1000 y 2000 mg/kg, al mostrarse una marcada disminución del consumo de alimento respecto al control. La administración de la combinación mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control en el consumo de alimento a los días 7 y 14. En la Figura 18-B se observa incremento del consumo de alimento en función del tiempo en comparación con el control. Estos resultados indican que la combinación mejoró el consumo de alimentos de los animales comparativamente a cada uno de los compuestos por separado.

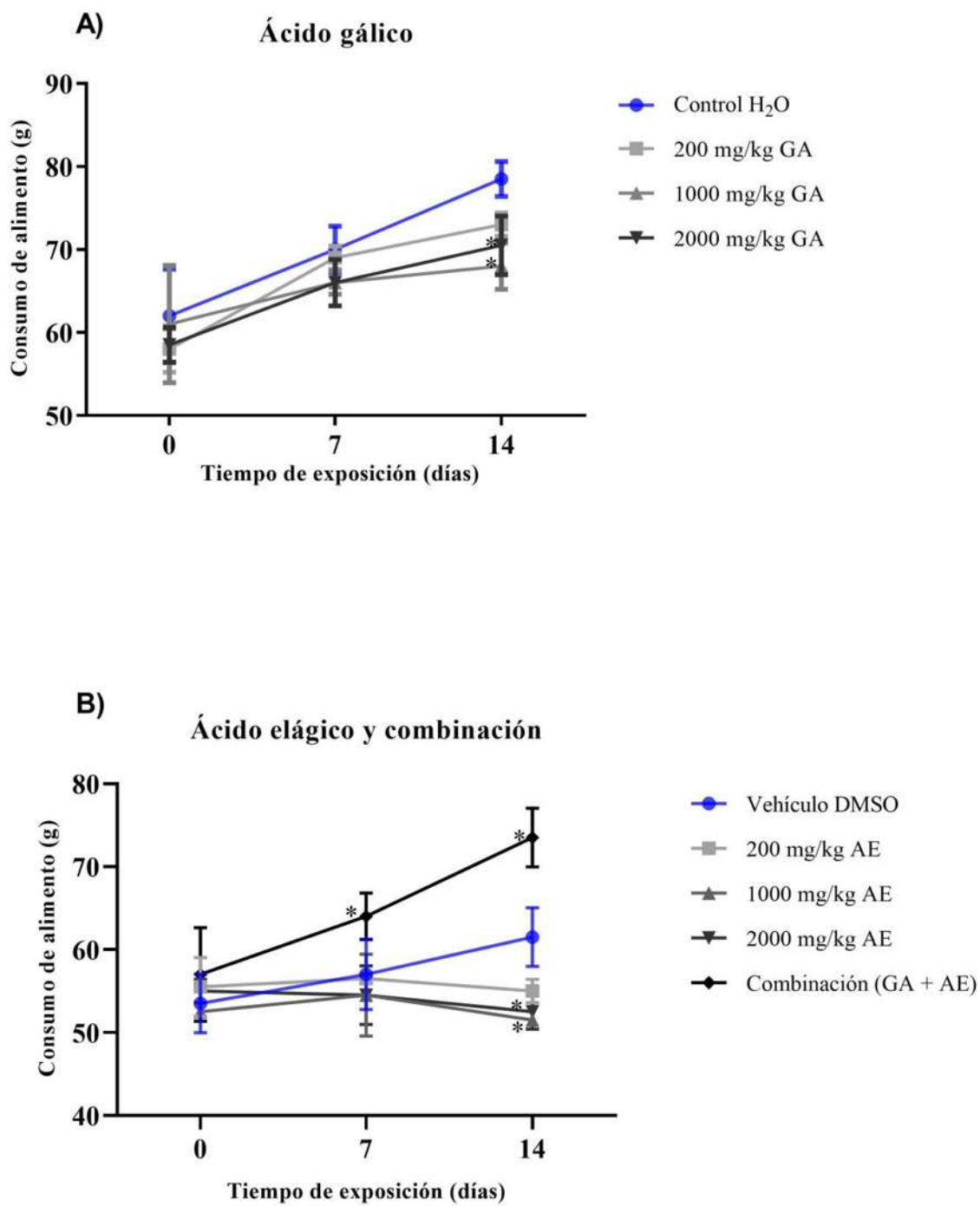


Figura 18. Consumo de alimento de los animales tratados con ácido gálico, ácido elágico y la combinación los días 0, 7 y 14 después de la administración. El gráfico muestra la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía con prueba de Tukey post hoc, ($p < 0.05$) $n=30$. Los (*) representan las diferencias estadísticas significativas.

VIII.3 Peso corporal

El peso corporal y la ingesta de alimento son algunos parámetros cruciales para la evaluación toxicológica, ya que a través de ellos puede detectarse tempranamente la presencia de toxicidad (10). En la Figura 19-A. puede observarse que el grupo control mostró un incremento del peso corporal más notable al día 14. Los animales tratados con 200 mg/kg incrementaron su peso corporal el día 7, aunque este no mostró variaciones significativas el día 14 con respecto al control. En el nivel de dosis de 1000 y 2000 mg/kg, se constató un incremento de peso ($p < 0.05$) respecto al control el día 7. Sin embargo, en cada uno de los grupos experimentales se apreció lentitud en el ritmo entre el día 7 y el 14.

Con respecto a la evolución de peso corporal de los animales tratados con ácido elágico a los días 0,7 y 14 se observó que el grupo control mostró una tendencia hacia el aumento del peso corporal en función del tiempo, así como los animales tratados con 200 mg/kg (Figura 19-B). Sin embargo, los animales tratados con ácido elágico en el nivel de dosis de 1000 mg/kg se observó lentitud en el ritmo de crecimiento hacia el día 7 hasta el 14. Mientras que a la dosis de 2000 mg/kg del día 7 al 14, el peso se mantuvo constante. Interesantemente, los animales que fueron tratados con la combinación mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) para los días 7 y 14, observándose un incremento del peso corporal en comparación al control.

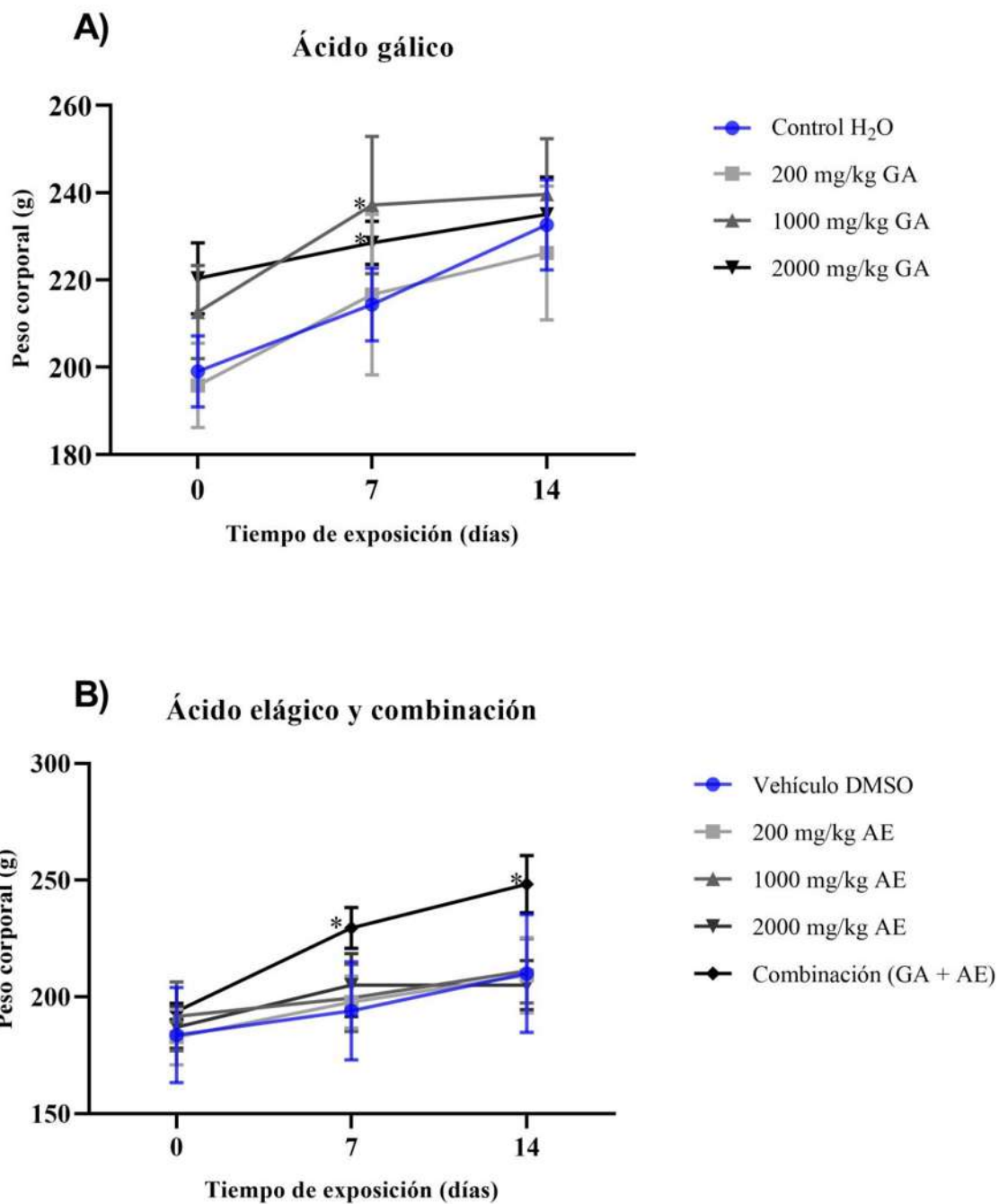


Figura 19. Peso corporal de los animales tratados con ácido gálico, elágico y la combinación los días 0, 7 y 14 después de la administración. El gráfico muestra la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA de una vía con prueba de Tukey post hoc, ($p < 0.05$) $n=30$. Los (*) representan las diferencias estadísticas significativas.

VIII.4 Análisis macroscópico

En el análisis macroscópico de los órganos no se observaron cambios morfológicos visibles en cuanto al color y la posición en el hígado, encéfalo, timo, bazo, estómago, páncreas, riñón y suprarrenal derecha e izquierda de los animales tratados con el ácido gálico, ácido elágico y la combinación con respecto al grupo control. Sin embargo, en los pulmones a los diferentes niveles de dosis administrados de ácido elágico, se observa una disminución de la coloración en comparación al control representado en la (Figura 20).

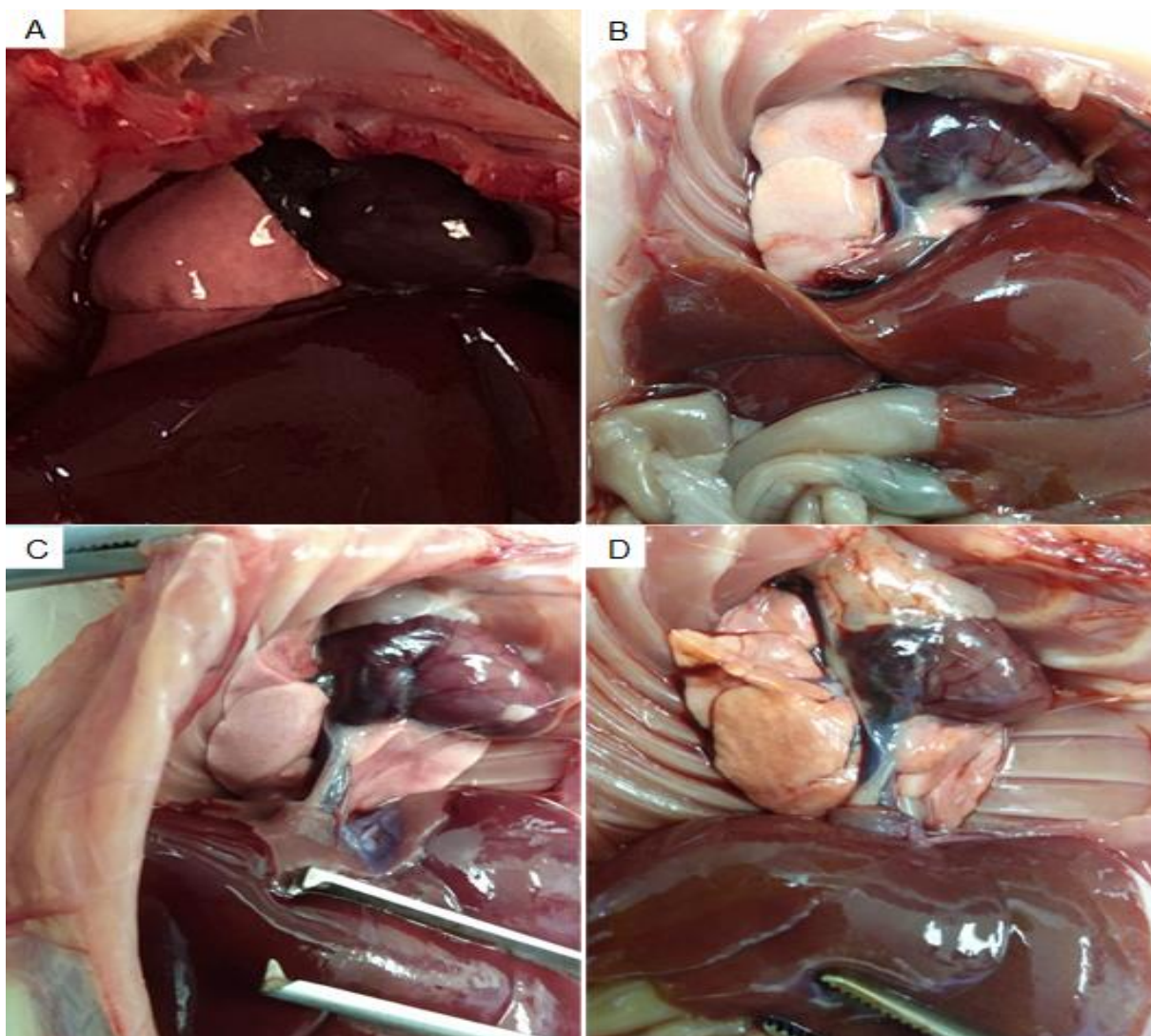


Figura 20. Análisis macroscópico de los pulmones 14 días después de la administración con ácido elágico. Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D).

En corazón, dos ratas del grupo administradas con ácido elágico a la dosis de 2000 mg/kg presentaron desgarre de la capa más externa del corazón (pericardio) representado en la (Figura 21). Pese a estos hallazgos, no se encontraron otras alteraciones macroscópicas en pulmones y corazón con la administración del ácido gálico y la combinación.

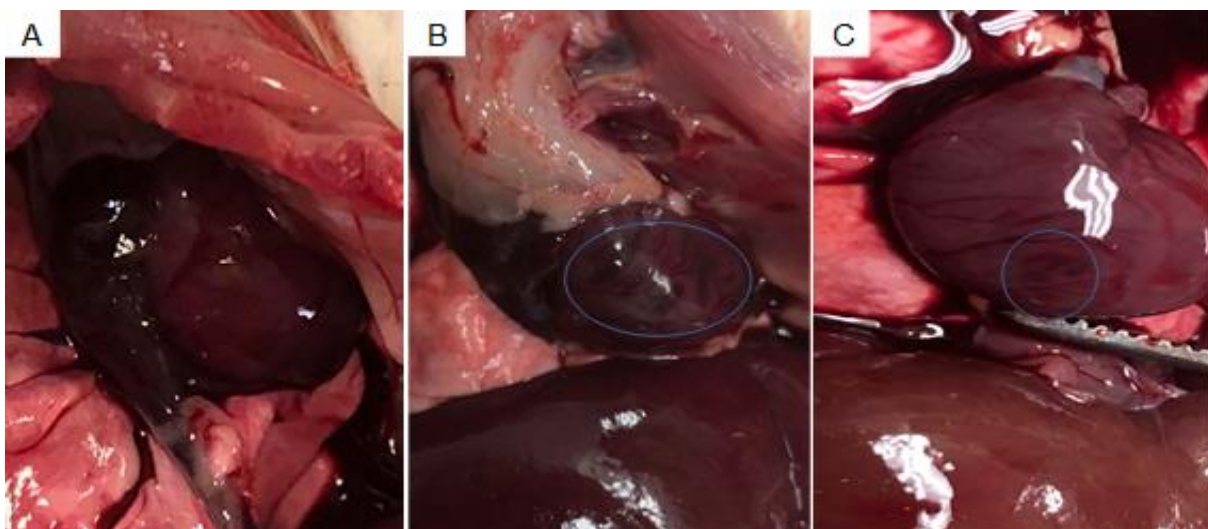


Figura 21. Análisis macroscópico. Desgarre pericárdico en los animales tratado con ácido elágico a los 14 días después de la administración. Control (A), Rata 1 (B) 2000 mg/kg, Rata 2 (C) 2000 mg/kg

VIII.5 Peso relativo de los órganos

La (Tabla 4) muestra el peso relativo de los órganos de los diferentes grupos experimentales. En los tratamientos con ácido gálico se apreció una disminución estadística significativa del peso relativo del riñón derecho a la dosis de 2000 mg/kg, mientras que el peso relativo del riñón izquierdo mostró una tendencia a la baja en las dosis de 1000 y 2000 mg/kg. En el caso del ácido elágico no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso de los órganos. Este comportamiento se mantuvo con la combinación, ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el peso de los órganos en comparación al control.

Tabla 4. Influencia de los ácidos gálico, elálgico y la combinación sobre el peso relativo de los órganos de las ratas Wistar.

Órganos	ÁCIDO GÁLICO				ÁCIDO ELÁLGICO Y COMBINACIÓN				
	Control H ₂ O	200 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Vehículo DMSO	200 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Combinación
Hígado	3.90±0.2 1 ^a	3.89±0.09 ^a	3.77 ±0.12 ^a	3.76±0.34 ^a	4.19±0.15 ^a	3.19±0.21 ^a	4.17±0.36 ^a	3.91±0.29 ^a	4.5±0.20 ^a
Encéfalo	0.78±0.06 ^a	0.79±0.04 ^a	0.76±0.06 ^a	0.78±0.03 ^a	0.88±0.09 ^a	0.87±0.04 ^a	0.89±0.04 ^a	0.89±0.07 ^a	0.83±0.05 ^a
Corazón	0.43±0.04 ^a	0.40±0.03 ^a	0.43±0.04 ^a	0.43±0.03 ^a	0.42±0.02 ^a	0.43±0.04 ^a	0.42±0.03 ^a	0.42±0.04 ^a	0.39±0.02 ^a
Bazo	0.35±0.05 ^a	0.34±0.04 ^a	0.34±0.04 ^a	0.32±0.03 ^a	0.39±0.04 ^a	0.42±0.05 ^a	0.41±0.05 ^a	0.38±0.05 ^a	0.36±0.04 ^a
Estómago	0.69±0.09 ^a	0.78±0.08 ^a	0.76±0.1 ^a	0.73±0.08 ^a	0.77±0.06 ^a	0.73±0.06 ^a	0.78±0.09 ^a	0.79±0.04 ^a	0.72±0.03 ^a
Timo	0.17±0.06 ^a	0.18±0.04 ^a	0.21±0.02 ^a	0.18±0.02 ^a	0.17±0.03 ^a	0.19±0.03 ^a	0.19±0.03 ^a	0.17±0.02 ^a	0.16±0.02 ^a
Páncreas	0.23±0.09 ^a	0.32±0.10 ^a	0.29±0.07 ^a	0.27±0.05 ^a	0.25±0.05 ^a	0.30±0.09 ^a	0.24±0.04 ^a	0.26±0.07 ^a	0.32±0.01 ^a
Riñón derecho	0.43±0.03 ^a	0.43±0.03 ^{ab}	0.40±0.02 ^{ab}	0.39±0.03 ^b	0.42±0.02 ^a	0.40±0.03 ^a	0.39±0.03 ^a	0.38±0.05 ^a	0.37±0.02 ^a
Riñón izquierdo	0.42±0.04 ^a	0.41±0.03 ^{ab}	0.38±0.01 ^b	0.38±0.02 ^b	0.39±0.01 ^a	0.39±0.02 ^a	0.39±0.02 ^a	0.37±0.04 ^a	0.37±0.01 ^a
Suprarrenal derecha	0.02±0.01 ^a	0.02±0.005 ^a	0.02±0.004 ^a	0.02±0.004 ^a	0.016±0.001 ^a	0.017±0.004 ^a	0.018±0.004 ^a	0.017±0.005 ^a	0.019±0.003 ^a
Suprarrenal izquierda	0.02±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.02±0.004 ^a	0.02±0.004 ^a	0.017±0.003 ^a	0.016±0.002 ^a	0.017±0.004 ^a	0.016±0.004 ^a	0.017±0.001 ^a
Pulmón derecho	0.34±0.02 ^a	0.35±0.08 ^a	0.38±0.05 ^a	0.43±0.09 ^a	0.35±0.04 ^a	0.37±0.04 ^a	0.34±0.08 ^a	0.35±0.02 ^a	0.40±0.03 ^a
Pulmón izquierdo	0.26±0.04 ^a	0.24±0.04 ^{ab}	0.21±0.02 ^{ab}	0.22±0.04 ^{ab}	0.21±0.03 ^a	0.17±0.08 ^a	0.22±0.06 ^a	0.19±0.03 ^a	0.18±0.02 ^a

Los valores son expresados como media ± DE. Letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía con prueba de Tukey post hoc, $p < 0.05$).

VIII.6 Resultados bioquímicos y hematológicos

En la (Tabla 5) se ilustran los resultados bioquímicos y hematológicos de los grupos tratados con ácido gálico, ácido elálgico, y la combinación, así como los controles. La administración de ácido gálico como la combinación mostró una disminución de la alanina-aminotransferasa

(TGP) en forma dosis dependiente para los diferentes grupos experimentales en comparación al grupo control.

En el hemograma se constató la disminución del volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM) a la dosis de 1000 mg/kg de ácido gálico; mientras que las plaquetas aumentaron significativamente a los niveles de dosis de 1000 y 2000 mg/kg de ácido gálico y la combinación respecto al control. Tanto la combinación como los grupos administrados con ácido elágico a 1000 y 2000 mg/kg mostraron un incremento significativo de la urea con relación al control. La creatinina se encontró aumentada solamente para el grupo de máxima dosis administrado con ácido elágico en comparación al control.

Tabla 5. Efectos de la administración oral aguda de los ácidos gálico, elálgico y la combinación, sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos de ratas Wistar.

Parámetro	Valor de referencia	DOSIS DE ÁCIDO GÁLICO				DOSIS DE ÁCIDO ELÁLGICO				Combinación
		Control H ₂ O	200 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	Vehículo DMSO	200 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	
Glucosa (mg/dL)	76.0 - 175.0	166.30±40.83 ^a	154.49±47.38 ^a	165.37±24.97 ^a	151.02±34.20 ^a	161.67±5.92 ^a	154.35±6.81 ^a	160.71±4.80 ^a	155.71±8.51 ^a	158.51±7.21 ^a
Urea (mg/dL)	38.33 - 87.9	40.68±6.65 ^a	39.61±6.03 ^a	43.51±8.47 ^a	51.17±8.83 ^a	44.05±3.20 ^b	49.77±5.71 ^a	52.22±4.52 ^a	56.71±3.13 ^a	57.36±5.26 ^a
Creatinina (mg/dL)	0.2 - 0.6	0.23±0.05 ^a	0.30±0.06 ^a	0.27±0.05 ^a	0.32±0.08 ^a	0.33±0.082 ^b	0.37±0.052 ^b	0.43±0.521 ^{ab}	0.53±0.15 ^a	0.32±0.045 ^b
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.005-0.18	0.050±0.05 ^a	0.050±0.05 ^a	0.060±0.05 ^a	0.083±0.04 ^a	0.017±0.04 ^a	0.00±0.00 ^a	0.033±0.05 ^a	0.017±0.04 ^a	0.06±0.16 ^a
Bilirrubina Directa (mg/dL)	0.03-0.06	0.033±0.05 ^a	0.017±0.04 ^a	0.050±0.05 ^a	0.033±0.05 ^a	0.017±0.04 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.033±0.05 ^a	0.00±0.00 ^a
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	0.03-0.5	0.033±0.05 ^a	0.033±0.05 ^a	0.067±0.08 ^a	0.050±0.05 ^a	0.033±0.05 ^a	0.00±0.00 ^a	0.033±0.05 ^a	0.05±0.03 ^a	0.06±0.16 ^a
TGO (u/L)	65.0 - 203.0	154.42±43.66 ^a	109.82±21.64 ^{ab}	105.8±5.7 ^b	123.36±26.79 ^{ab}	156.45±31.86 ^a	139.78±31.96 ^a	133.47±20.45 ^a	140.20±35.60 ^a	117.53±29.66 ^a
TGP (u/L)	32.7 - 84.1	46.35±3.63 ^a	37.81±4.81 ^b	37.35±6.15 ^b	36.65±5.30 ^b	66.05±9.79 ^a	52.48±6.17 ^a	51.42±8.90 ^{ab}	56.25±11.38 ^a	47.08±5.49 ^b
Fosfatasa alcalina (u/L)	82.8 - 297.3	97.50±14.75 ^a	101.21±15.03 ^a	96.58±11.90 ^a	88.03±16.82 ^a	141.08±33.53 ^a	104.87±24.04 ^a	131.52±17.66 ^a	102.52±46.26 ^a	95.38±14.95 ^a
GGT (u/L)	0 - 1.43	0.00±0.00 ^a	0.33±0.53 ^a	0.40±0.70 ^a	0.00±0.00 ^a	0.10±0.16 ^b	0.06±0.12 ^b	0.60±0.36 ^{ab}	1.08±0.15 ^a	0±0 ^b
Eritrocitos (X10 ⁶ /uL)	6.5 - 7.9	6.35±0.74 ^a	6.28±0.45 ^a	6.67±0.57 ^a	6.37±0.54 ^a	6.19±0.29 ^a	6.23±0.59 ^a	6.69±0.49 ^a	6.89±0.45 ^a	5.98±0.46 ^a
Hemoglobina (g/dL)	13.7 - 16.8	14.38±0.68 ^a	14.35±0.83 ^a	13.83±0.60 ^a	14.0±0.91 ^a	14.53±0.52 ^a	14.91±1.12 ^a	15.37±0.77 ^a	15.20±0.50 ^a	14.18±0.50 ^a

Hematocrito (%)	37.9 - 49.9	39.45±6.73 ^a	39.91±5.21 ^a	37.02±2.70 ^a	36.73±2.25 ^a	39.70±2.40 ^{ab}	41.46±3.92 ^a	42.43±3.43 ^a	43.61±2.78 ^a	35.65±2.25 ^b
VGM (fL)	49.9 - 65.3	63.06±4.50 ^a	63.43±5.07 ^a	55.56±1.34 ^b	57.73±1.91 ^{ab}	64.10±2.54 ^{ab}	66.70±4.06 ^a	63.73±4.57 ^{ab}	63.45±4.17 ^{ab}	58.43±1.93 ^b
HCM (pg)	17.8 - 24.9	22.83±1.84 ^a	22.90±0.61 ^a	20.82±1.05 ^b	22.02±1.03 ^{ab}	19.45±9.55 ^a	23.98±1.83 ^a	23.12±0.83 ^a	22.11±1.22 ^a	23.30±0.93 ^a
CMHG (g/dL)	33.2 - 37.9	36.45±4.98 ^a	36.26±3.08 ^a	37.45±1.31 ^a	38.133±1.16 ^a	36.05±1.64 ^{ab}	36.05±2.83 ^a b	36.43±2.75 ^{ab}	34.93±2.45 ^b	39.88±1.39 ^a
RDW (%)	10.5 - 14.9	12.21±1.09 ^{ab}	12.15±1.30 ^{ab}	10.68±0.59 ^b	13.05±2.09 ^a	12.03±1.02 ^a	12.42±1.31 ^a	11.71±0.88 ^a	12.73±0.85 ^a	11.20±0.43 ^a
Leucocitos totales (u/L)	1,100 - 7,500	4966.67±1646.41 ^a	4483.33±964.19 ^a	3950±1234.10 ^a	3983.33±1139.15 ^a	3450.00±824.01 ^a	3650±1011.43 ^a	4650.00±314.64 ^a	4183±1205.68 ^a	4983.3±1790.44 ^a
Neutrófilos (%)	7 - 33	11.83±3.48 ^a	9.67±4.23 ^a	15.20±4.38 ^a	13.67±9.09 ^a	7.83±3.60 ^a	7.67±2.94 ^a	17.33±10.32 ^a	8.33±1.63 ^a	15.33±8.45 ^a
Linfocitos (%)	62 - 90	85.50±2.81 ^a	87.00±2.97 ^a	81.00±6.22 ^a	82.66±8.80 ^a	85.50±5.43 ^a	88.50±5.32 ^a	78.83±9.81 ^a	88.33±1.96 ^a	80.16±9.13 ^a
Monocitos (%)	1.0-5.0	2.67±1.21 ^a	3.00±2.00 ^a	2.40±3.28 ^a	2.33±1.51 ^a	4.00±2.91 ^a	3.83±3.65 ^a	3.83±1.60 ^a	3.33±1.86 ^a	3.00±1.67 ^a
Plaquetas (u/L)	680 - 1200000	732,667±121832 ^b	772,333±169189 ^b	1,048,833±162534 ^a	1,062,333±163309 ^a	572667±224636 ^b	658833±57217 ^b	670333±47429 ^b	656500±216556 ^b	1,056,833±158669 ^a

Los valores son expresados como media ± DE. Letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía con prueba de Tukey post hoc, $p < 0.05$). (RBC) recuento de glóbulos rojos; (VGM) volumen globular medio; (HCM) hemoglobina corpuscular media; (CMHC) concentración media de hemoglobina corpuscular; (RDW) ancho de distribución de glóbulos rojos.

VIII.7 Análisis histopatológico

En el análisis histopatológico realizado, no se encontraron alteraciones microscópicas en el encéfalo, hígado, timo, páncreas, estómago, bazo, suprarrenal derecha e izquierda, como consecuencia de la administración del ácido gálico, elágico y la combinación por vía oral. Sin embargo, pudo evidenciarse daño a nivel del corazón, riñón y pulmón. Los hallazgos más significativos por órgano serán explicados a continuación

VIII.7.1 Riñón

Al evaluar los cambios histopatológicos, pudo constatar que las ratas controles presentaron glomérulos con oville capilar normocelular, cápsula de Bowman intacta, aparato yuxtaglomerular y macula densa bien definida, así como sistema tubular conservado con relación al túbulo contorneado proximal. Sin embargo, el tratamiento con ácido gálico generó alteraciones glomerulares en forma dosis-dependiente. De hecho, a la dosis de 200 mg/kg se observó entre un 5 y 10% de glomérulos con hiperplasia glomerular, mientras que a 1000 mg/kg se observó entre un 10 y 15% de glomérulos con esta condición y a 2000 mg/kg, se encontró de un 15 al 20% de los glomérulos con hiperplasia (Figura 22-1 B, C, D). Cabe señalar que en la dosis de 2000 mg/kg además de la hiperplasia glomerular también se observaron de un 5 a 10% de glomérulos con atrofia. Como leves hallazgos, en las tres dosis de ácido gálico, solo algunos glomérulos presentaron necrosis a nivel del aparato yuxtaglomerular (Figura 22-1 C, D) y de 1 a 2 glomérulos con necrosis total. Las tres dosis de ácido gálico se vieron acompañadas por nefritis intersticial aguda en el mesénquima de los túbulos de la nefrona, además de necrosis tubular aguda y depósitos de proteínas en la luz de los túbulos. También se observaron pequeñas regiones de la médula renal donde ya no se observan túbulos y fueron sustituidos por tejido conectivo, en un intento de reparación.

Por su parte, la administración con ácido elágico generó hiperplasia del oville glomerular que se presentó en forma dosis-dependiente. Las ratas que recibieron la dosis de 200 mg/kg mostraron un 20% de glomérulos con hiperplasia, mientras que a los máximos niveles de dosis 1000 y 2000 mg/kg se apreció un 70% de hiperplasia glomerular (Figura 22-2 F, G, H). Este compuesto también generó daño glomerular en forma dosis-dependiente, observándose de 4 a 9 glomérulos por corte colapsados y con retracción del oville glomerular, en algunos glomérulos se apreció sangrado (Figura 23-1 B, C, D, E) y glomérulos con pérdida total del oville

glomerular (Figura 23-2 G, H, I, J) característico de necrosis. A nivel tubular, se observó necrosis tubular aguda a partir de la dosis de 1000 y 2000 mg/kg, con amiloidosis (depósitos de proteína) en túbulos contorneados y extravasación de eritrocitos en el mesénquima renal.

En el caso de las ratas tratadas con la combinación el daño renal fue menor, probablemente por la presencia del ácido gálico, quien generó menor nivel de daño sobre el riñón que el ácido eláxico. En este grupo experimental, se observó la región glomerular con un 40% de glomérulos con hiperplasia (Figura 22-2 I), escasa necrosis del aparato yuxtglomerular y del glomérulo. También se observaron escasos depósitos de proteína en los túbulos contorneados. Comparando los daños histológicos de los tres tratamientos podría decirse que se aprecia mayor daño renal con el ácido eláxico seguido por la combinación y por último el ácido gálico.

VIII.7.2 Corazón

La Figura 24 muestra la histopatología correspondiente a los hallazgos generales en corazón en todos los grupos experimentales. El grupo control se aprecia con miofibrillas alargadas normales, núcleos vesiculosos centrales y citoplasmas homogéneos. Libres de inflamación, edema y sangrado.

Los hallazgos histopatológicos detectados con los tratamientos de ácido gálico a las diferentes dosis a nivel cardíaco mostraron la presencia de infiltrado inflamatorio agudo constituido por leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, hemosiderina y eritrocitos, indicando hemorragia reciente y antigua, además de edema entre las células. Pequeñas áreas de los miocitos con escasa hipertrofia, citoplasmas densos y refringentes, algunos con cariólisis, característico de la necrosis coagulativa (Figura 24-1 B, C, D). Además, pudo constatarse la presencia de cambios histológicos patognomónicos característicos del infarto agudo al miocardio.

En los grupos experimentales tratados con ácido eláxico se observó tejido intersticial edematoso con escasa inflamación compuesta por infiltrado inflamatorio de leucocitos polimorfonucleares y extravasación de eritrocitos. Los miocitos presentaron hipertrofia, con citoplasmas eosinófilos y núcleos picnóticos característicos de necrosis coagulativa (Figura 24-2 F, G, H). También se encontraron hallazgos de necrosis licuefactiva con miocitos que presentan pérdida de su estructura y cariólisis, formando una masa homogénea (Figura 25-1 B, C D). El ácido eláxico provocó infarto agudo al miocardio que se apreció por la gran cantidad de fibras hipercontraídas con bandas de contracción (Figura 25-2 F, G H). Se observó importante hiperplasia de pericardio

(Figura 26-1 B, C), engrosado por células mesoteliales e infiltrado inflamatorio compuesto por células mononucleares; así como derrame pericárdico (Figura 26-1 D, E, F).

Por su parte, la administración de ambos compuestos generó menor daño que el constatado por el ácido elágico, al observarse solamente edema, inflamación y necrosis coagulativa (Figura 24-2 I). De hecho, en este grupo experimental no se observó presencia de necrosis licuefactiva, bandas de contracción de las fibras miocárdicas, ni tampoco hiperplasia de células mesoteliales o derrame pericárdico.

Comparando los hallazgos histopatológicos en corazón de los tres tratamientos, puede constatar que el daño más importante se presenta con la administración del ácido elágico, seguido por el ácido gálico y por último la combinación.

VIII.7.3 Pulmón

La Figura 27 muestra las alteraciones histopatológicas a nivel pulmonar en todos los grupos experimentales. En el grupo control se observaron bronquios y bronquiolos con epitelio pseudoestratificado ciliado de características normales y libres de inflamación. Los alveolos, muestran la pared alveolar formada por neumocitos I y II bien diferenciada, observándose la barrera de intercambio gaseoso, tabiques interalveolares delgados y vasos sanguíneos normales.

En el caso del ácido gálico, las ratas tratadas con 200 mg/kg, mostraron inflamación leve, compuesta principalmente por leucocitos polimorfonucleares. La inflamación comenzó a nivel vascular (arterias y venas) y continuó hacia el mesénquima pulmonar (Figura 27-1 B). Los bronquios, bronquiolos y alveolos se encontraron libres de inflamación y con características normales. Para la dosis de 1000 mg/kg, se apreciaron los bronquios y bronquiolos con moco y sangrado en la luz y con leve inflamación en el mesénquima (Figura 27-1 C). La inflamación estuvo compuesta principalmente por leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos. Los alveolos además de presentar escasa inflamación también presentaron un engrosamiento de los tabiques interalveolares. Al mayor nivel de dosis de 2000 mg/kg, se constató la presencia de abundante inflamación, compuesta principalmente por leucocitos polimorfonucleares, la cual se encontró localizada en el mesénquima de bronquios, bronquiolos, alveolos y vasos sanguíneos (Figura 27-1 D). Además, los alveolos presentaron engrosamiento de los tabiques interalveolares. También se observó ruptura de la membrana basal y músculo liso de algunos de los bronquiolos, asociada a la presencia de leucocitos polimorfonucleares. En la luz de los bronquios y

bronquiolos se observó sangrado y moco. La inflamación observada en las tres dosis de ácido gálico se presentó en forma dosis dependiente.

El comportamiento del ácido elágico en pulmón mostró bronquiolos con una gran cantidad de infiltrado inflamatorio compuesto por leucocitos polimorfonucleares que rompen el tejido muscular que envuelve a los bronquios. La dosis de 200, 1000 y 2000 mg/kg, presentaron abundante sangrado e inflamación en el lumen de los bronquiolos (Figura 27-2 F, G, H). Los alveolos se observaron colapsados con tabiques interalveolares gruesos y abundante infiltrado inflamatorio compuesto por leucocitos polimorfonucleares. La inflamación observada se vio compuesta por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, indicando inflamación aguda y crónica. En la combinación por su parte, se observaron bronquiolos con poco sangrado y abundante infiltrado inflamatorio compuesto por leucocitos polimorfonucleares en el lumen (Figura 27-2 I). Tabiques interalveolares gruesos y colapsados por abundante infiltrado inflamatorio indicando inflamación aguda.

En resumen, si se compara la toxicidad del ácido gálico, elágico y la combinación sobre este órgano puede constatar que la mayor inflamación se presentó con el ácido gálico, seguido por el ácido elágico y finalmente con la combinación.

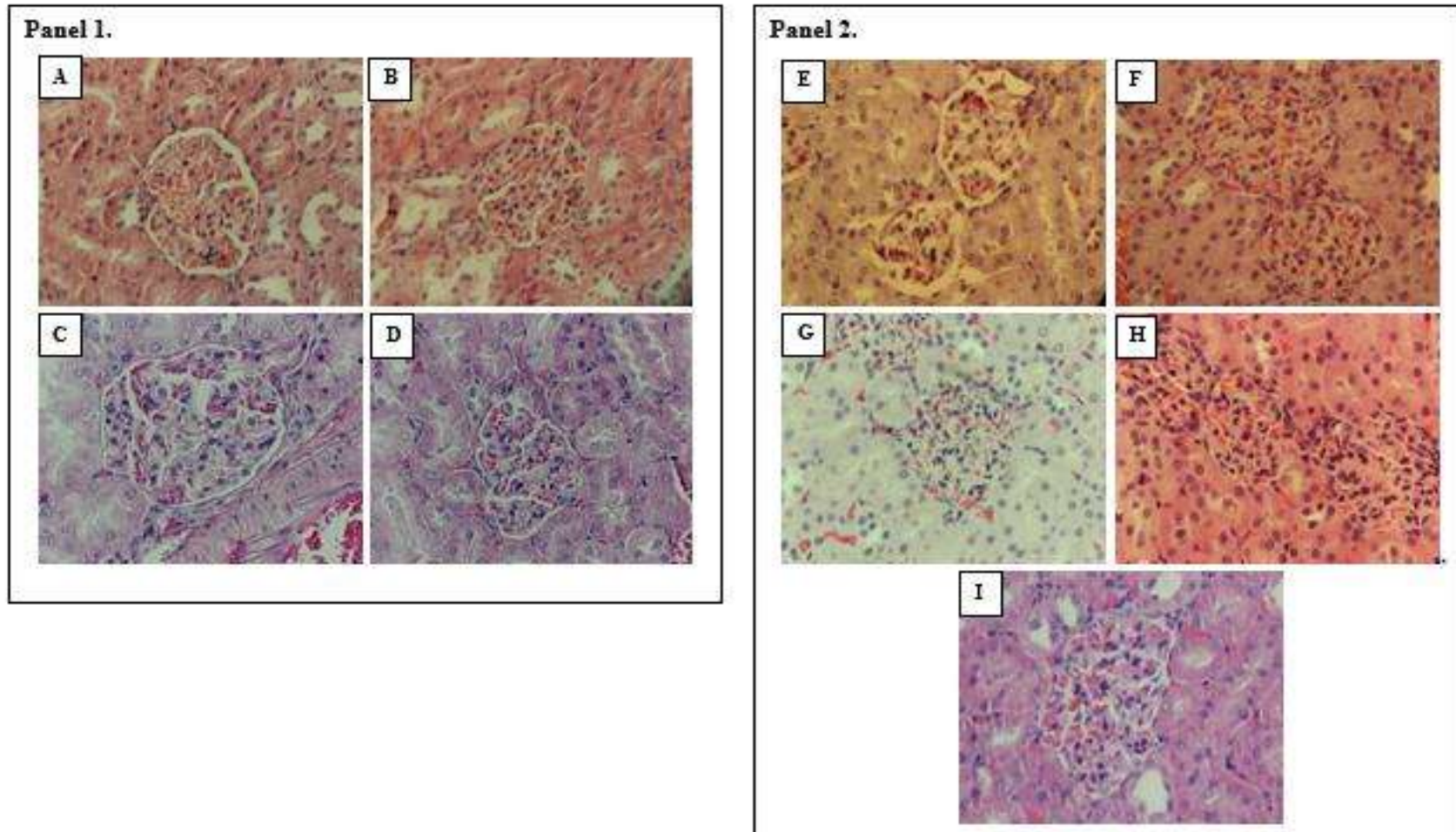


Figura 22 Hallazgos histopatológicos a nivel renal después de la exposición aguda al ácido gálico, elágico y la combinación. Panel 1. Ácido gálico. Grupo control (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Ácido elágico y la combinación. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) y combinación (I). La Hiperplasia de glomérulo se presenta en forma dosis-dependiente solamente para ácido gálico y elágico.

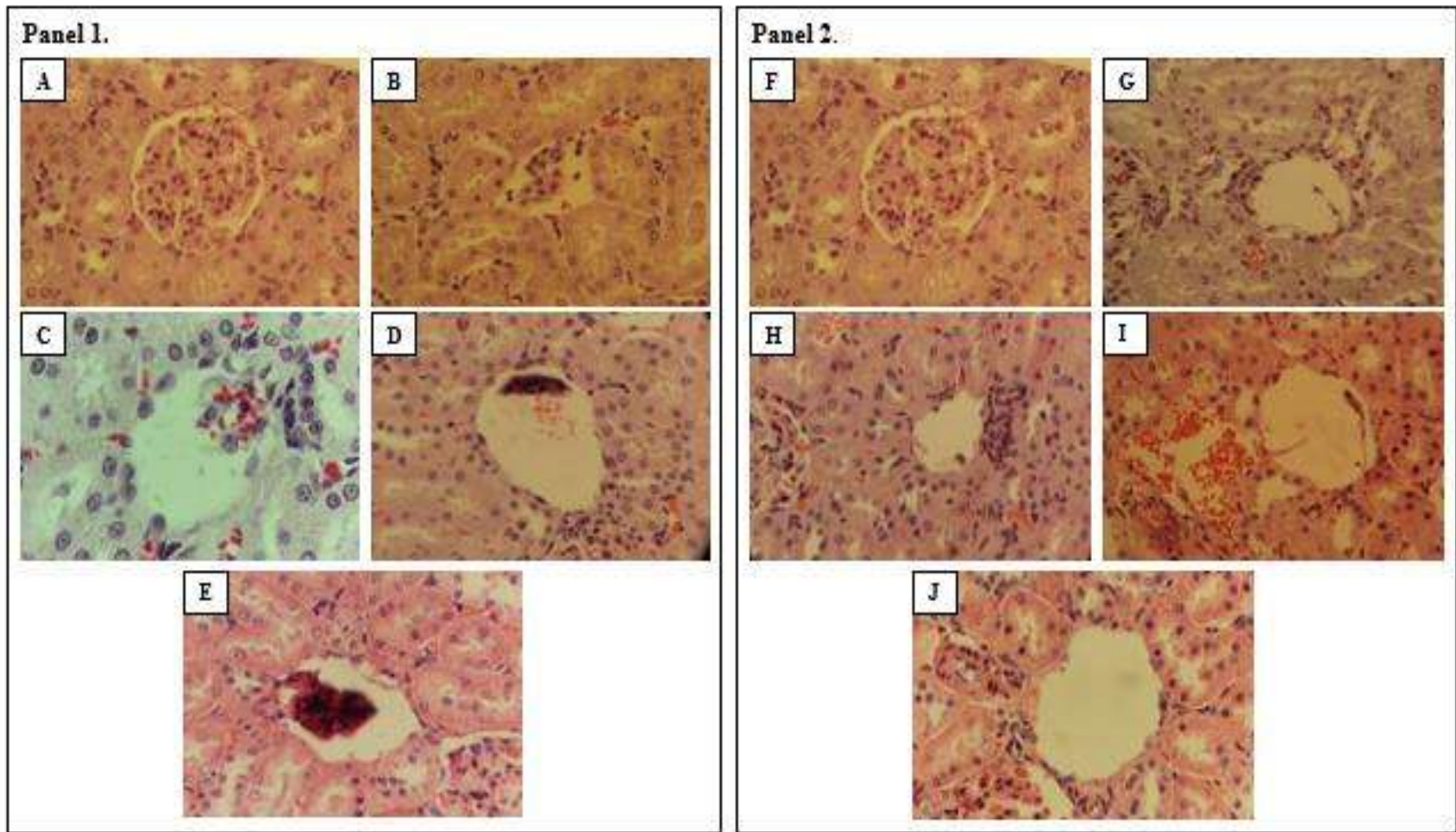


Figura 23 Hallazgos histopatológicos a nivel renal después de la exposición aguda al ácido elágico y la combinación. Panel 1. Necrosis glomerular. Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) dosis 2000 mg/kg (D), y combinación (E). Panel 2. Glomérulos sin el penacho glomerular. Vehículo DMSO (F), dosis 200 mg/kg (G), dosis 1000 mg/kg (H) dosis 2000 mg/kg (I), y combinación (J).

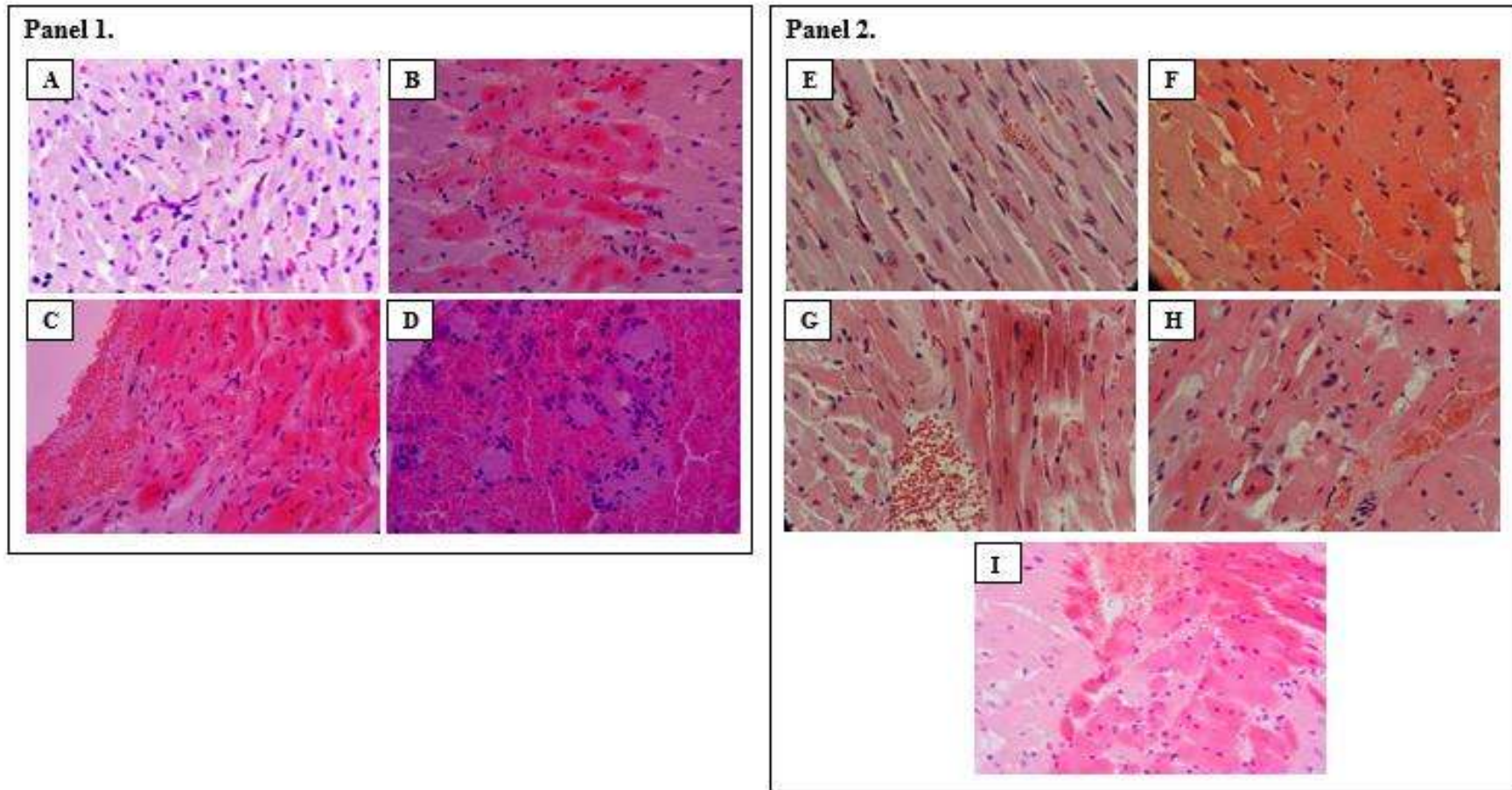


Figura 24 Histopatología de corazón de los animales tratados con ácido gálico, elágico y la combinación. Panel 1. Ácido gálico. Grupo control (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Ácido elágico y la combinación. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) y combinación (I). La necrosis coagulativa se presentó en forma dosis dependiente, solamente en los tratamiento con ácido gálico y elágico.

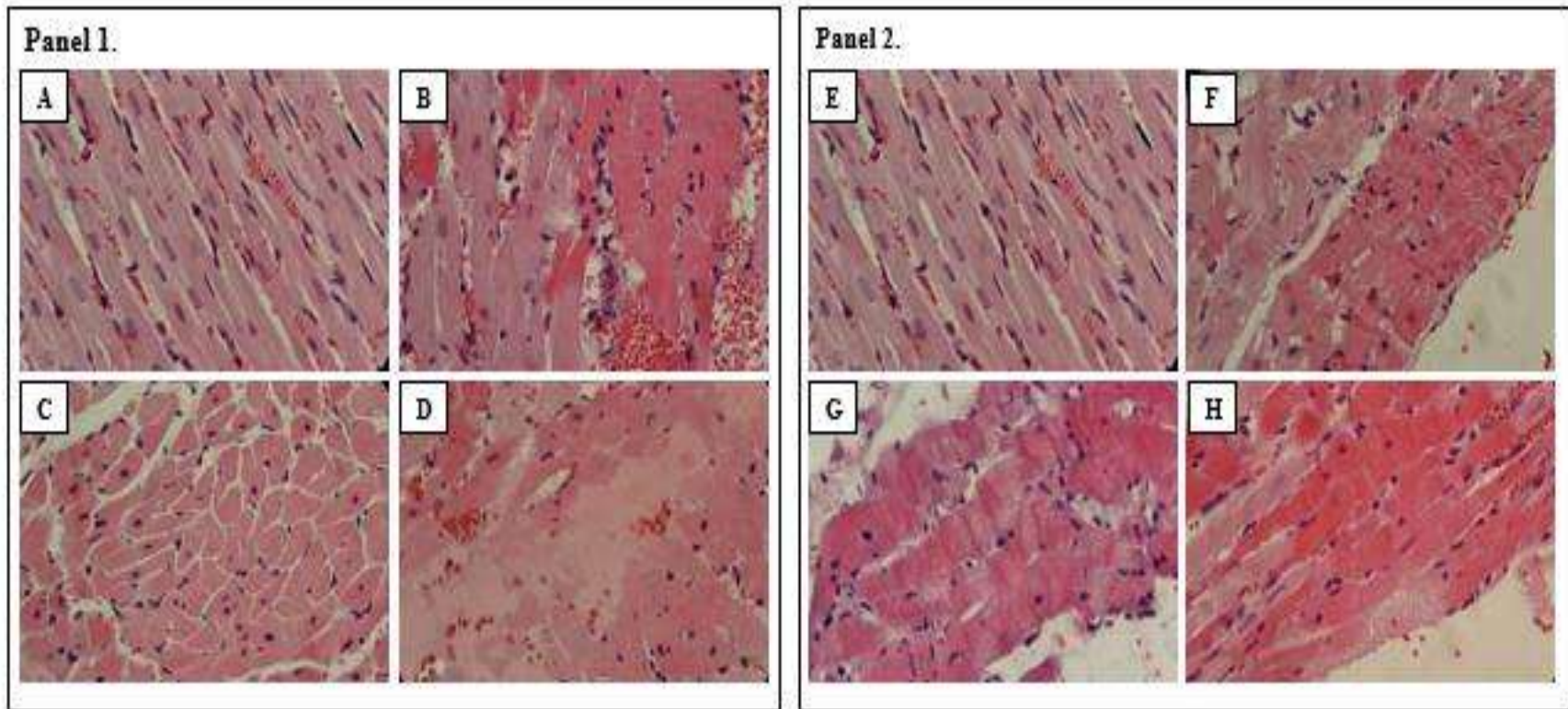


Figura 25 Histopatología de corazón de los animales tratados con ácido elágico. Panel 1. Necrosis licuefactiva. Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Bandas de contracción. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) La necrosis licuefactiva se presentó en forma dosis dependiente, solamente en el tratamiento con ácido elágico.

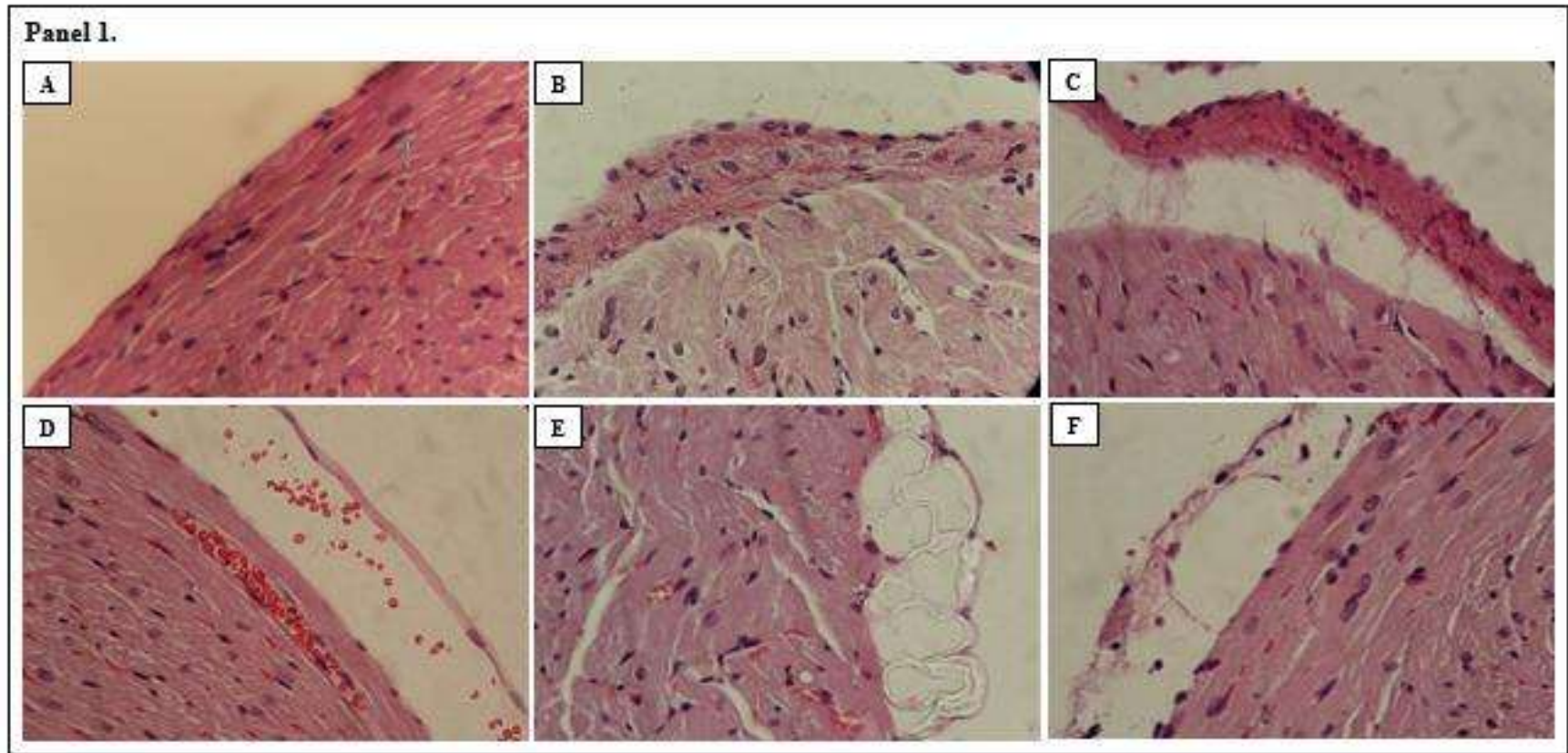


Figura 26 Histopatología de corazón de los animales tratados con ácido elágico. Panel 1. Vehículo DMSO (A), Hiperplasia de pericardio, dosis 1000 mg/kg (B) y dosis 2000 mg/kg (C). Edema de pericardio, dosis 200 mg/kg(C), dosis1000 mg/kg (D), y dosis 2000 mg/kg (F)

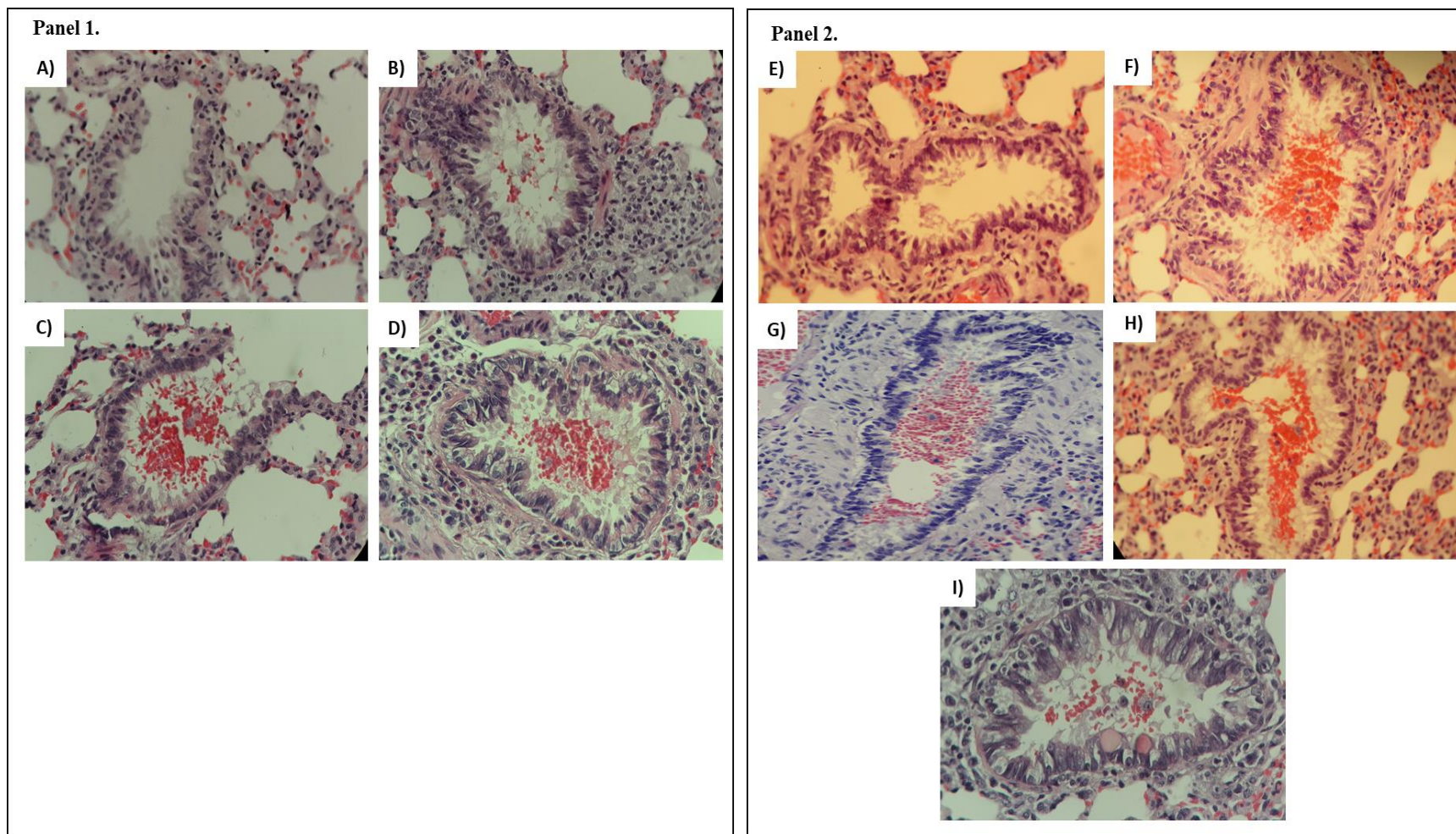


Figura 27 Histopatología pulmonar de los animales tratados con ácido gálico, elágico y la combinación. Panel 1. Ácido galico. Grupo control (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1000 mg/kg (C) y dosis 2000 mg/kg (D). Panel 2. Ácido elágico y la combinación. Vehículo DMSO (E), dosis 200 mg/kg (F), dosis 1000 mg/kg (G), dosis 2000 mg/kg (H) y combinación (I).

VIII.8 Efecto de los ácidos gálico, elágico y su combinación sobre la actividad de los complejos de la CTE de mitocondrias de riñón.

La Figura 28 representa la actividad de los ácidos gálico, elágico y su combinación sobre los cuatro complejos de la CTE de las mitocondrias de riñón. Al evaluar la actividad del complejo I (Figura 28-A) se observó que los ácidos gálico, elágico, o su combinación, no afectaron esta enzima. Con relación a la actividad del complejo II (Figura 28-B), se detectó una disminución estadísticamente significativa de la actividad de este complejo en las ratas tratadas con los ácidos gálico, elágico y su combinación, donde el efecto más marcado fue observado con el ácido elágico.

Con respecto al complejo III, la Figura 28-C muestra una inhibición con el vehículo 0.2% de DMSO, con respecto al grupo control. Por otro lado, se observó una disminución más pronunciada de la actividad del complejo III con los ácidos gálico, elágico y su combinación, mostrándose una tendencia más marcada con el ácido elágico.

En la Figura 28-D se observa la actividad del complejo IV, donde se observó una disminución de su actividad con ácido gálico y la combinación. El grupo que recibió la combinación mostró la mayor disminución de la actividad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas con el ácido elágico respecto al control.

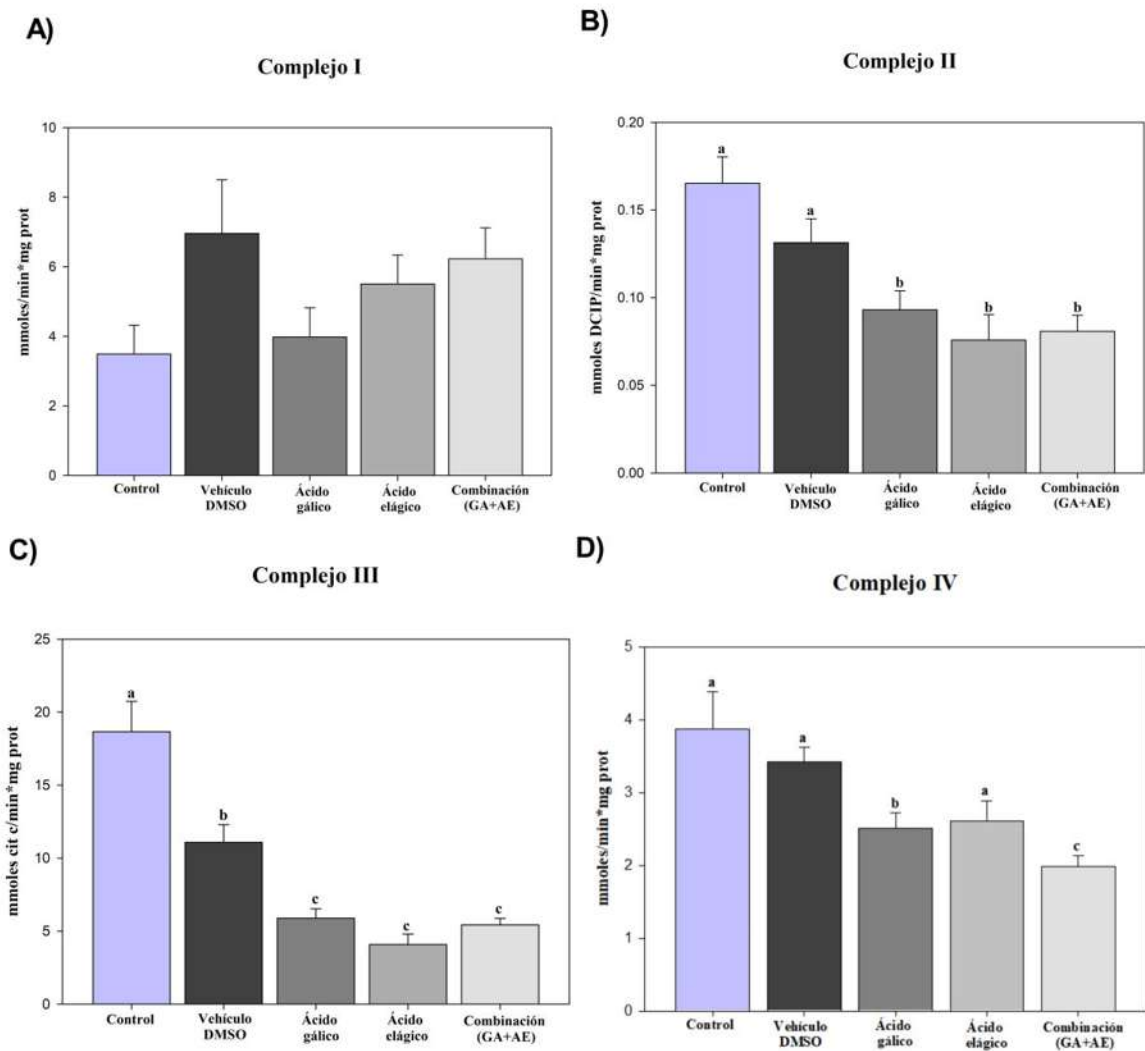


Figura 28 Efecto de los ácidos gálico, elágico y su combinación, sobre la actividad de los complejos I, II, III y IV de la CTE de mitocondrias de riñón. Los datos se presentan como la media \pm EE $n > 5$. ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

VIII.9 Efecto de los ácidos gálico, elágico y la combinación sobre la generación de ERO en mitocondrias de riñón

Con el objetivo de determinar si las alteraciones en los complejos de CTE están relacionadas con la producción de ERO, se midió este parámetro en presencia de glutamato-malato, como sustrato del complejo I para estimar la producción de ERO en flujo directo (Figura 29-A), succinato como sustrato del complejo II para inducir la producción de ERO en el complejo I mediante flujo reverso (Figura 29-B) y succinato + rotenona (Figura 29-C) para estimar la

formación de ERO en el complejo III. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción basal de ERO para ninguna de las tres condiciones en las mitocondrias de riñón y para los diferentes tratamientos ácido gálico, ácido elágico y su combinación en comparación con las mitocondrias de las ratas control. Se adicionó antimicina A para estimular la producción de ERO en el complejo III. Incluso con este tratamiento tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales.

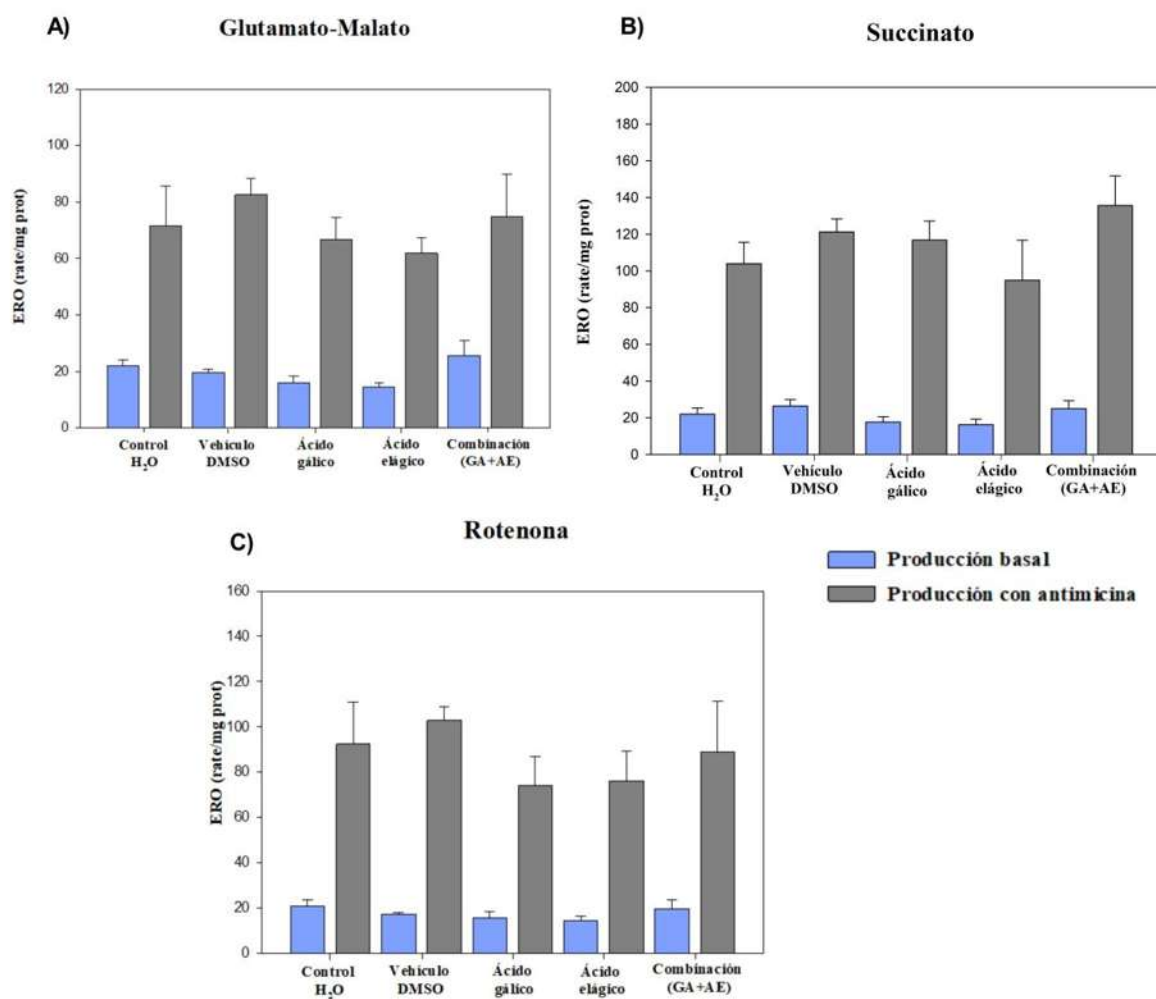


Figura 29. Efecto de los compuestos fenólicos ácido gálico, ácido elágico y su combinación en los niveles de ERO de mitocondrias renales. Como sustratos se utilizaron glutamato-malato (A), succinato (B) y succinato + rotenona (C). Los niveles de ERO se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f.). Los datos se presentan como la media \pm EE de $n \geq 5$. $P < 0.05$ (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Dunn's) utilizando el software Sigma Plot v11.0.

IX. DISCUSIÓN

La investigación presentada permitió evaluar la toxicidad oral aguda de los ácidos gálico, elágico y su combinación en ratas Wistar según el método toxicológico alternativo descrito en la Guía 423 de la OCDE, método que considera altas dosis para consumo humano. Es importante hacer notar que, por lo novedoso del tema, durante la revisión bibliográfica acerca de la evaluación de la toxicidad oral de la mezcla de ácido gálico y elágico, no fue posible encontrar ningún estudio similar en la literatura científica, aunque pueden encontrarse estudios que incluyen mezclas de ácidos fenólicos.

Durante la administración oral de altas dosis de los compuestos estudiados no llegaron a observarse signos o síntomas de toxicidad, ni muertes relacionadas por lo que no fue posible determinar con precisión la DL_{50} , que correspondería a un valor superior al máximo nivel de dosis empleado de 2000 mg/kg. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones previas tanto para el ácido gálico como ácido elágico (154,155,160,161).

El peso corporal y la ingesta de alimento son algunos parámetros cruciales para la evaluación toxicológica, ya que a través de ellos puede detectarse tempranamente la presencia de toxicidad. En cuanto al consumo de alimentos se observaron diferencias en todos los grupos experimentales. Las ratas que fueron tratadas con ácido gálico y elágico mostraron una tendencia hacia la disminución del consumo de alimento hacia el día 14, siendo esta disminución más importante a los máximos niveles de dosis. En cambio, las ratas tratadas con la combinación incrementaron su consumo de alimentos en función del tiempo respecto al control ($p < 0.05$), indicando que la combinación mejoró la ingesta de alimentos de los animales comparativamente al ácido gálico y elágico por separado.

Estos resultados respecto al ácido gálico fueron similares a los descritos por Rajalakshmi y colaboradores (2001) quienes reportaron una disminución en el consumo de alimentos en el grupo tratado con 1000 mg/kg de ácido gálico con respecto al control (158). Además, estos resultados coinciden con los hallazgos descritos por Niho y colaboradores (2001) al reportar que la ganancia de peso de los animales de ambos sexos al máximo nivel de dosis de ácido gálico fue significativamente menor que la del control (155). La tendencia a la disminución del peso

corporal en los animales tratados con ácido gálico podría explicarse por los efectos protectores del ácido gálico sobre la ganancia de peso corporal de los animales. En un estudio publicado por Doan y colaboradores (2015) se demostró que el ácido gálico administrado a 10 mg/kg protegió a animales tratados con una dieta rica en grasas del incremento del peso corporal durante 12 semanas (226). Los autores relacionaron este efecto con la activación de vías de señalización implicadas en el balance energético global del organismo como la AMPK/Sirt1/PGC1 y a la modulación de genes del tejido adiposo implicados en la termogénesis.

En cuanto al ácido elágico se ha reportado que este compuesto es capaz de disminuir el consumo de alimentos en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y carbohidratos (227). El ácido elágico presenta un efecto antiadipogénico que podría relacionarse con la disminución observada con relación al peso corporal (228). Animales que han consumido extractos enriquecidos en ácido elágico han experimentado una reducción significativa de su peso corporal (229). Además, se ha demostrado que este compuesto atenúa la obesidad y las complicaciones metabólicas mediadas por la obesidad en animales. En ratones KK-Ay, un modelo de diabetes tipo 2, la suplementación con ácido elágico al 0.1% (equivalente a ~100 mg AE/ kg de peso corporal) mejoró la desregulación de los perfiles lipídico en suero de los animales tratados (230). Considerando estos resultados, podría entenderse que los animales tratados con ácido elágico presenten un incremento inferior en el peso corporal hacia el día 14, que se correlaciona con un menor consumo de alimentos. Asimismo, este efecto podría estar mediado por la presencia de urolitinas como resultado del metabolismo del ácido elágico. De hecho, un estudio *in vitro* mostró que la urolitina A, urolitina C y urolitina D, pero no la urolitina B e isourolitina A redujo la adipogénesis (231).

Un resultado no esperado fue el presentado por la combinación, en la que se observó la inhibición del efecto de disminución del peso corporal observado con el ácido gálico y elágico por separado. Estudios subsecuentes deben realizarse con el fin de elucidar el mecanismo por el cual la unión de ambos compuestos tendría un efecto de inhibición del efecto antiadipogénico presentado tanto para ácido gálico como para el elágico en forma aislada.

En cuanto a los hallazgos a nivel del análisis macroscópico de los órganos, la administración de ácido elágico provocó una disminución de la coloración pulmonar, así como un desgarre

pericárdico a 2000 mg/kg, lo que sugirió que el compuesto generaba daño pulmonar y cardíaco (230). La palidez pulmonar se relacionó con un daño gradual de los sacos alveolares, generando una disminución de la cantidad de oxígeno que llega a la corriente sanguínea y cambios la coloración de este órgano, mientras que los hallazgos en corazón se relacionaron con un posible derrame pericárdico inducido por el compuesto, en relación con una acumulación excesiva de líquido en la doble capa que rodea al corazón, probablemente relacionada con un proceso inflamatorio. Por su parte el ácido gálico disminuyó significativamente el peso relativo de los riñones fundamentalmente a los máximos niveles de dosis, indicando que el riñón podría ser un órgano diana de toxicidad para este compuesto. Estos hallazgos fueron corroborados con el análisis hematológico, bioquímico e histopatológico correspondiente.

En términos del análisis bioquímico y hematológico pudo constatarse que tanto el ácido gálico como la combinación mostraron una disminución de TGP en forma dosis dependiente, así como un incremento significativo en el conteo de plaquetas, mientras que el ácido elágico y la combinación provocaron un incremento significativo de la urea y el ácido elágico en forma aislada a la máxima dosis generó un aumento en los niveles de la creatinina. Al revisar la literatura acerca de resultados hematológicos procedentes de estudios toxicológicos con ácido gálico Rajalakshmi y colaboradores (2001) sólo observaron una disminución leve, pero no significativa, en el nivel de hemoglobina en los animales tratados con ácido gálico a una dosis de 1000 mg/kg , pero no constataron ninguna alteración en el conteo de plaquetas (232). Lo mismo se describió en los estudios hematológicos reportados por Niho y colaboradores (2001), donde se evidenció una disminución en la hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos (RBC), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) con aumento significativo de reticulocitos en sangre (233). La diferencia en cuanto a los niveles de dosis utilizados y la periodicidad de la administración podrían explicar las diferencias encontradas con nuestros hallazgos hematológicos.

La disminución de los niveles de transaminasas TGP se ha relacionado con la presencia de afecciones renales, mientras que el incremento en el recuento de plaquetas (trombocitosis) podría deberse a una inflamación crónica subyacente, que provocaría la estimulación de la médula ósea y la producción excesiva de plaquetas, aunque también se ha relacionado con la presencia de alteraciones renales (234). Por otra parte, el incremento significativo en los niveles de urea y creatinina, secundarios a la administración de ácido elágico sugerían que el compuesto

y en menor medida la combinación afectaba el funcionamiento renal. Lo anterior, ligado al análisis macroscópico previo indicaban que los órganos más afectados por la administración a altas dosis del ácido gálico, elálgico y la combinación serían el corazón, los pulmones y el riñón. Dicha presunción pudo ser constatada a partir del análisis histopatológico, que efectivamente corroboró que estos órganos y no otros analizados en el estudio (encéfalo, hígado, timo, páncreas, estómago, bazo, suprarrenal derecha e izquierda) presentaron las alteraciones más significativas secundarias a la administración aguda de estos compuestos, aunque la intensidad del daño varió según el tipo de sustancia empleada.

Como se describió en la sección de resultados, el ácido gálico indujo daño renal en dosis superiores a los 200 mg/kg, caracterizado notablemente por hiperplasia glomerular y necrosis tubular. El riñón es el órgano por excelencia encargado de la eliminación de xenobióticos del organismo, y son frecuentes las lesiones que ocurren por la acción de agentes tóxicos, incluyendo agentes químicos y medicamentos sobre este órgano (235). Nuestros resultados concuerdan con los de Niho y colaboradores en 2001, quienes llevaron a cabo un estudio de toxicidad subcrónica del ácido gálico por administración oral en ratas F344 reportando daño renal en el epitelio tubular proximal relacionado con dicha administración (155). Sin embargo, contrastan con los reportados por Go y colaboradores (2015) quienes realizaron un estudio de nefrotoxicidad del extracto de *Galla Rhois* (GR) enriquecido con galotanino (GEGR) durante 14 días, a 250, 500 y 1000 mg/kg peso corporal/día durante 14 días, donde no se evidenció daños ni a nivel glomerular ni tubular en los grupos experimentales (236).

El ácido gálico es un polifenol perteneciente al grupo de los ácidos fenólicos. Se ha demostrado que los polifenoles tienen una gran capacidad para formar conjugados polifenol-glutatión que muestran propiedades electrofílicas superiores a las del polifenol original. De hecho, aunque la conjugación con el glutatión es un mecanismo propio de las reacciones de detoxificación de fase II del metabolismo de xenobióticos que permite su excreción, en el caso de algunos polifenoles, esta conjugación genera intermediarios biológicamente reactivos con capacidad de inducir toxicidad (237). Se ha postulado que las células con altas cantidades de γ -glutamyl transpeptidasa, como las células epiteliales tubulares proximales renales, tienen la capacidad de acumular estos conjugados polifenol-glutatión, causando daño renal, sobre todo a elevadas concentraciones (3).

A nivel cardíaco, el ácido gálico generó infarto agudo de miocardio, definido como la necrosis o muerte de una porción del músculo cardíaco que se produce cuando se obstruye completamente el flujo sanguíneo (238). Este efecto deletéreo se relacionó con las propiedades pro-oxidativas de los galatos, ya que se ha descrito que dichos compuestos provocan una disminución del glutatión y una cascada de reacciones oxidativas que podrían afectar a macromoléculas como el ADN, proteínas y algunos lípidos de la membrana, produciendo lesiones en el citoesqueleto de la célula, necrosis y muerte celular, asociadas a enfermedades cardiovasculares como consecuencia de la producción de ERO (72).

Al analizar los daños pulmonares inducidos por el ácido gálico, pudo constatarse presencia de una lesión pulmonar aguda caracterizada por la respuesta inflamatoria donde existe una activación de leucocitos en la circulación sistémica que terminan migrando hacia el mesénquima pulmonar, infiltrándose en las paredes alveolares, bronquiolos terminales y vasos sanguíneos pulmonares. El importante daño pulmonar generado por el ácido gálico pudiera explicarse en parte por las elevadas concentraciones que alcanza este compuesto en dicho órgano según lo demostrado por Ma y colaboradores en 2016 (239). Además, este efecto tóxico podría asociarse con la presencia de ERO, producidas por las altas concentraciones de ácido gálico (240). You y Park (2010), en su estudio sobre líneas celulares humanas de adenocarcinoma pulmonar Calu-6 y A549, observaron el efecto del ácido gálico en la muerte de células cancerígenas de pulmón en relación con el agotamiento del glutatión y con los cambios en el nivel de ERO (241).

Actualmente se sabe que los agentes pro-oxidantes, como el ácido gálico y los radicales libres altamente reactivos poseen un papel trascendental en la génesis del proceso inflamatorio que lesiona el espacio intersticial pulmonar, convirtiéndose en un blanco para la toxicidad de ciertos compuestos administrados por vía oral, cuyos efectos están mediados por un aumento de la producción de ERO, las que generan estrés oxidativo que induce a procesos inflamatorios, apoptóticos y necróticos. De hecho, una consecuencia de la reacción inflamatoria inducida por agentes oxidantes es la secreción aumentada de moco (242). La existencia del estrés oxidativo en los interespacios y la sangre inicia una serie de eventos que desembocan en la respuesta inflamatoria del pulmón. Sin embargo, estas lesiones pueden estar ligadas a cualquier afección que provoque una disminución de los niveles de oxígeno en la sangre durante periodos prolongados pudiendo generar cardiopatía pulmonar. Lo anterior dada la interconexión estrecha del pulmón y el corazón durante la circulación sanguínea.

Con relación al ácido elálgico, este compuesto resultó ser aún más nefrotóxico que la combinación y el ácido gálgico. Este ácido fenólico ha sido reconocido por presentar un carácter pro-oxidativo a elevadas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones puede proteger al ADN del daño oxidativo (243). Claramente nuestro estudio, al tratarse de una evaluación toxicológica aguda implica el uso de altas concentraciones de este compuesto, por lo que no sería una sorpresa que en estas condiciones el mismo actuara como pro-oxidante generando daño sobre la estructura renal. El daño oxidativo puede alterar la estructura y función glomerular debido principalmente al efecto de las ERO sobre las células epiteliales, mesangiales y endoteliales. Los glomérulos esclerosados debido a isquemia adoptan un patrón característico de retracción y colapso del penacho. El estrés oxidativo también puede estar involucrado en otras lesiones inflamatorias glomerulares causadas por una serie de mediadores, incluyendo citoquinas y quimiocinas, las cuales provocan la activación de leucocitos, producción de ERO y un incremento del daño glomerular (70).

Además de los efectos como pro-oxidantes, el daño severo a nivel renal inducido por el ácido elálgico pudiera estar mediado por una producción aumentada de prostaglandinas, en particular de PGE₂. Estudios recientes *in vivo* efectuados con ácido elálgico han demostrado que la administración de 6 mg/kg de este compuesto en ratas Wistar puede incrementar en forma significativa la producción plasmática de prostaglandina E₂ (PGE₂) (244). Los niveles de prostaglandinas se elevan significativamente 3 h después de la administración, con un pico a las 6 h. Estos efectos se deben a que este compuesto es capaz de unirse al sitio de actividad peroxidásica de la COX 1 y 2 y generar un aumento de 3.5 veces los valores normales de PGE₂. La producción de prostaglandinas está fuertemente asociada con el estatus inflamatorio, siendo a su vez es un factor determinante para la aparición de trastornos renales (245). Aunque tanto la COX-1 como la COX-2 mantienen la función homeostática renal, la PGE₂ es el producto principal de la COX-2 en la insuficiencia renal. Las lesiones del túbulo proximal se han atribuido a respuestas inflamatorias mediadas por COX2-PGE₂ en un modelo murino (246). Aunque lo anterior pudiera ser una hipótesis, deben realizarse estudios subsecuentes para determinar precisamente los mediadores involucrados en la lesión renal provocada por ácido elálgico.

Del mismo modo, el daño a nivel de corazón inducido por el ácido elálgico fue más significativo que el constatado por el ácido gálgico y la combinación. De hecho, llama la atención el infarto agudo al miocardio y la hiperplasia en pericardio generadas después de la exposición aguda con

este compuesto. El corazón representa al órgano muscular contráctil, cuya función es bombear la sangre que distribuye el oxígeno a través de los vasos sanguíneos del organismo. Técnicamente, el infarto agudo al miocardio es la necrosis o muerte de una porción del músculo cardíaco que se produce cuando se obstruye completamente el flujo sanguíneo (247). Este daño pudiera estar relacionado con las propiedades pro-oxidativas del ácido elágico y sus metabolitos las urolitinas a concentraciones elevadas. Se ha demostrado que la mezcla de urolitinas A, B y B-glucurónido, incrementan la liberación de óxido nítrico (NO) y estimulan la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en células endoteliales aórticas humanas (248). Sin embargo, este incremento exacerbado, así como el aumento excesivo en los niveles de nitrosamina se han asociado a lesión miocárdica, particularmente infarto del miocardio en ratas vía la generación de peroxinitrito (249). El daño cardíaco observado podría también ser secundario al importante daño renal presentado. Resulta conocido que los pacientes con enfermedad renal mueren muy frecuentemente de enfermedades cardiovasculares más que de otra causa de muerte incluyendo el infarto agudo de miocardio (250). Aunque podría ser una hipótesis, otros estudios deben realizarse para comprobar si el daño renal presentado como consecuencia de la administración de ácido elágico podría ser una causa o un efecto de las lesiones observadas a nivel cardíaco.

El ácido elágico en pulmón generó inflamación aguda y crónica, así como daño en alveolos, bronquios y bronquiolos, aunque la toxicidad sobre este órgano fue inferior a la constatada con el ácido gálico. Se ha reportado que las urolitinas, particularmente la urolitina A alcanza a órganos como el pulmón (150,251), aunque sus efectos deletéreos a este nivel no están bien descritos en la literatura científica. Se ha indicado que la administración oral de ácido elágico a 10 mg/kg interfiere con la inflamación y el daño pulmonar inducido por ácidos en modelos *in vivo* (252). Sin embargo, es posible que a concentraciones de 20 a 200 veces superiores, como las empleadas en este estudio, sus efectos sobre el pulmón sean en cambio nocivos. Nuestros resultados contrastan con los publicados por Tasaki y colaboradores en 2008 quienes reportaron para este compuesto una NOAEL en ratas hembra F344 de 3254 mg/kg/día (162).

Llama la atención el comportamiento de la combinación, ya que perceptiblemente atenuó la toxicidad del ácido elágico y gálico sobre todo a nivel de corazón y pulmón, mientras que el daño renal que provocó fue inferior al del ácido elágico, pero mayor que el del ácido gálico. Desafortunadamente no fue posible encontrar otros estudios ni toxicológicos ni farmacodinámicos con la combinación, pero pudiera hipotetizarse que las propiedades pro-

oxidativas de ambos compuestos por separado a elevadas concentraciones se atenúan en la combinación. Se ha reportado que el comportamiento dual antioxidante/prooxidante de este tipo de compuestos parece depender no solo de la concentración sino también estar modulado por factores como el pH, la presencia de metales de transición y de otros productos químicos en el entorno biológico (253). Considerando estos elementos y teniendo en cuenta que la bioactividad de los polifenoles es compleja, modulable y altamente dependiente del entorno químico y biológico, no sería sorprendente que al administrarse ambos compuestos en combinación sus propiedades biológicas varíen. Estudios subsecuentes deben realizarse para comprender los mecanismos por los cuales la combinación de ambos compuestos genera una disminución de la toxicidad sobre órganos diana como los riñones, pulmones y el corazón.

Considerando que el riñón es uno de los órganos que más se afecta bajo la acción de los xenobióticos y conociendo la significativa acción deletérea del ácido elágico, la combinación y el ácido gálico sobre la arquitectura renal en términos histopatológicos se decidió estudiar el impacto de la concentración más elevada de los compuestos estudiados (2000 mg/kg) sobre la actividad de los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria renal. Lo anterior considerando que el deterioro a nivel mitocondrial se ha señalado como un mecanismo de nefrotoxicidad de múltiples xenobióticos (4–6) y que la toxicidad mitocondrial se ha relacionado entre otros parámetros con la inhibición de la actividad de los complejos pertenecientes a la cadena de transporte electrónico (7,8).

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con el ácido elágico disminuyó la actividad de los complejos II y III, aunque también se detectó una disminución de la actividad de ambos complejos con el ácido gálico y su combinación. Lo anterior podría tener conexión con los resultados histopatológicos donde pudo constatare daño renal con ambos ácidos y la combinación, siendo más pronunciado el efecto deletéreo con el ácido elágico. El complejo II es un sistema único que vincula directamente el ciclo del ácido tricarbóxico y la cadena respiratoria para la producción de ATP. En una publicación reciente se encontró que este compuesto, a diferencia de la N-acetilcisteína no restauró la actividad del complejo II en mitocondrias hepáticas aisladas que fueron expuestas a toxicidad por acroleína, un compuesto químico presente en el humo del cigarro. Los autores concluyeron que la acción del ácido elágico a nivel mitocondrial dependía de la concentración utilizada, y del tipo celular analizado (254). En el caso del ácido gálico, sus efectos sobre la cadena de transporte electrónico no son

claros. Se ha postulado que otros galatos como la pentagalactoglucosa, pueden inhibir los complejos II y III en forma dosis-dependiente, dañando la membrana mitocondrial y causando reducción en la síntesis de ATP (255). En contraste, estudios realizados con mitocondrias aisladas de fibroblastos dérmicos no reportan ningún efecto de inhibición del ácido gálico sobre algún complejo de la CTE en este tipo celular (256).

Cabe señalar que la actividad del complejo III fue la más afectada por la acción de los compuestos en estudio y por el DMSO al 0.2%, siendo el ácido elágico quien mostró la tendencia más marcada hacia la inhibición en su actividad. Los efectos nocivos del DMSO al 0.2% sobre el complejo III fueron sorprendentes, ya que, dada la baja polaridad del ácido elágico ha sido un solvente muy utilizado en investigaciones previas con este ácido fenólico en roedores por vía oral (217–220). En consecuencia, se infiere que, derivado de estos resultados, habría que estudiar más exhaustivamente si los efectos deletéreos del ácido elágico sobre corazón, pulmón y riñón serían o no el resultado de su uso conjunto con el DMSO al 0.2%.

Teniendo en cuenta la inhibición presentada en la actividad de los complejos II, III y IV por los compuestos estudiados, decidimos determinar si esta inhibición se relacionaría con el incremento en la producción de ERO, de manera que pudiéramos explicar el importante daño renal constatado a nivel histopatológico. Nuestros resultados sorprendentemente no demostraron un incremento significativo en la producción de ERO comparativamente con el control bajo el efecto de las sustancias estudiadas.

Las ERO pueden generarse en la célula, a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos. Cualquier proteína o sistema enzimático con la capacidad de transferir electrones puede generar ERO como subproductos de la reacción de transferencia electrónica. Este es el caso del citocromo p450 (en el retículo endoplasmático), los peroxisomas, la xantina oxidasa o la NADPH oxidasa. No obstante, se ha postulado que la principal fuente de ERO en células no fagocíticas es la mitocondria (257).

Los complejos I y III generalmente se consideran los contribuyentes más importantes a la producción de ERO mitocondriales en células intactas (258). En el complejo III, mayoritariamente afectado por la acción de los ácidos gálico, elágico y la combinación, la generación de O_2^- se debe a la generación de la ubisemiquinona, un radical libre intermedio formado durante el ciclo de quinonas en el sitio Qo del complejo III (259). La generación de

ERO se acelera por inhibidores del complejo III que actúan sobre puntos diferentes del sitio Q_o, como por ejemplo la antimicina, debido al estancamiento de los electrones en el ciclo de quinonas. Se ha postulado que la mayor parte del O₂⁻ generado en el complejo III se produce hacia la matriz mitocondrial. La localización de la Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD₂) en la matriz mitocondrial y espacio intermembrana, permite la conversión del O₂⁻ a H₂O₂ que sí es capaz de atravesar las membranas biológicas alejándose de su lugar de producción (259).

En cuanto a la inhibición del complejo II, que también se observa con los compuestos estudiados, se ha postulado que sus inhibidores muestran un efecto ambivalente sobre la producción de ERO mitocondriales dependiendo del suministro de sustrato, el potencial de membrana y la actividad metabólica general de la célula, así como la concentración de succinato intracelular (260). Los inhibidores específicos del CII se unen al sitio de unión al succinato (oxalacetato y malato) (261) o bien al sitio Q (tenoiltrifluoroacetona, atpenina) (262). Se plantea que los inhibidores del sitio de unión al succinato suprimen la producción de ERO ya que bloquean el FAD, mientras que los inhibidores del sitio Q estimulan la generación de ERO ya que reducen el FAD al bloquear la transferencia de electrones a la ubiquinona. Los inhibidores del sitio Q de alta afinidad, como la atpenina, no inducen ERO (263). La explicación es que la membrana plasmática es impermeable al succinato, y el succinato se acumula rápidamente cuando se emplean inhibidores del sitio Q de alta afinidad, cancelando la producción de ERO por el FAD (260).

En un estudio previo que utilizó células de la línea celular 293 de riñón embrionario humano (HEK293), se analizaron las consecuencias bioenergéticas de la inhibición crónica durante 24 h de los complejos I y III por rotenona o antimicina A, respectivamente. Los resultados revelaron que estos tratamientos inhibieron el consumo de oxígeno mitocondrial (264). En un estudio ulterior con el mismo modelo experimental se determinó si la inhibición de los complejos I y III aumentaba los niveles de ERO y desencadenaba un estrés oxidativo. Los resultados demostraron que la inhibición de los complejos I y III se asociaba con un aumento de la oxidación de hidroetidina y niveles elevados de H₂O₂ citosólico, pero no mitocondrial. Además, los autores no encontraron evidencia experimental de estrés oxidativo, muerte celular masiva o carbonilación de proteínas. Esto sugirió que la magnitud del aumento inducido en el nivel de ERO no excedió la capacidad de los sistemas antioxidantes de la célula, por lo que no necesariamente la inhibición de los complejos I y III conlleva en todos los casos al incremento

en la producción de ERO a límites que sobrepasen la capacidad de los sistemas antioxidantes celulares (265).

Tanto el ácido gálico como el elágico poseen un efecto antioxidante remarcable. Dada su estructura química el ácido elágico actúa como aceptor de electrones y donante del átomo de hidrógeno, por lo que está dotado de una alta capacidad antioxidante. Este efecto antioxidante, mediado por la transferencia del átomo de hidrógeno, también lo muestran las urolitinas (167), sus metabolitos más importantes. Por su parte, el ácido gálico actúa como antioxidante fundamentalmente a través de la transferencia del átomo de hidrógeno (266). Dadas sus propiedades antioxidantes, es posible que ambas moléculas o sus metabolitos pudieran, a nivel renal, tener un efecto antioxidante contribuyendo a que no se incrementaran los niveles de ERO, a pesar del bloqueo en el flujo de electrones en el complejo III.

Teniendo en cuenta que el riñón es uno de los órganos que más requiere del ATP para eliminar los desechos de la sangre, reabsorber nutrientes, regular el equilibrio de líquidos y electrolitos, mantener la homeostasis ácido/base y regular la presión arterial (205), podría hipotetizarse que el efecto deletéreo de los ácidos gálico y elágico a nivel renal estaría relacionado con una disminución del ATP debido a la inhibición de los complejos II y III y posiblemente a un menor flujo a través del ciclo de Krebs a nivel de la succinato deshidrogenasa. La disfunción mitocondrial conduce a una disminución en la producción de ATP, así como a alteraciones en estructura celular y pérdida de la función renal. La mayor parte del ATP generado por la respiración aeróbica se produce como consecuencia del flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa (205). De hecho, se ha documentado que la disfunción mitocondrial, asociada a la disminución de la actividad de los complejos de la CTE y la disminución de la producción de ATP sería un evento inicial contribuyente a la lesión renal aguda inducida por agentes tóxicos (205,267,268). Además, se ha indicado que la disminución de la actividad de los complejos II y III de la CTE por agentes nefrotóxicos como el tenofovir (269) y el cisplatino (270), genera una disminución en la producción de ATP, con el consiguiente daño en la arquitectura renal. Estudios subsecuentes deben realizarse para determinar el efecto de ambos ácidos fenólicos solos y en combinación sobre la producción de ATP en las mitocondrias renales como consecuencia de su administración oral.

Dado que los resultados presentados en esta investigación corresponden al empleo de altas dosis de los compuestos estudiados, tal y como lo establece la guía 423 de la OCDE, lo cual es característico de este tipo de estudios toxicológicos, investigaciones futuras deben realizarse para determinar los efectos de dosis más bajas en administraciones repetidas mediante el análisis de la toxicidad oral subaguda, subcrónica y crónica de ambos ácidos fenólicos solos y en combinación.

X. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que los ácidos gálico y elágico pertenecen a la categoría 5, representada por sustancias que presentan dosis letales medias en el rango superior a los 2000 mg/kg, tal y como lo indica el anexo 3 de la guía 423 de la OECD. Los compuestos estudiados solos y en combinación a altas dosis (≥ 200 mg/kg) generan daño cardíaco, pulmonar y renal que se presenta en forma dosis-dependiente, aunque la intensidad del efecto deletéreo varía según el tipo de sustancia, siendo mayor el daño cardíaco y renal para el ácido elágico y el pulmonar para el ácido gálico. La actividad de los complejos II, III y IV resultó inhibida con todas las sustancias de estudio, siendo ligeramente más pronunciada la inhibición de los complejos II y III con el ácido elágico y IV con la combinación. Sin embargo, esta inhibición no se tradujo en una modificación de la capacidad antioxidante mitocondrial, por lo que se hipotetiza que probablemente los efectos adversos a nivel renal se deban a una disminución del ATP debido a la inhibición de los complejos II y III.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Soong Y-Y, Barlow PJ. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem.* 1 de agosto de 2006;97(3):524-30.
2. Kreidler M. FDA Warning Letter to Best on Earth Products | Quackwatch [Internet]. 2008. Disponible en: https://quackwatch.org/cases/fdawarning/prod/fda-warning-letters-about-products-2008/best_on_earth/
3. Monks TJ, Lau SS. Biological Reactivity of Polyphenolic–Glutathione Conjugates. *Chem Res Toxicol.* 1 de diciembre de 1997;10(12):1296-313.
4. Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* febrero de 2011;119(2):245-56.
5. Zorov DB. Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity requires protection of renal mitochondria. *Kidney Int.* mayo de 2010;77(10):841-3.
6. Ommati MM, Niknahad H, Farshad O, Azarpira N, Heidari R. In Vitro and In Vivo Evidence on the Role of Mitochondrial Impairment as a Mechanism of Lithium-Induced Nephrotoxicity. *Biol Trace Elem Res.* mayo de 2021;199(5):1908-18.
7. Yao L, Zhang J-W, Chen B, Cai M-M, Feng D, Wang Q-Z, et al. Mechanisms and pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles underlying the low nephrotoxicity and ototoxicity of etimicin. *Acta Pharmacol Sin.* junio de 2020;41(6):866-78.
8. Nadanaciva S, Bernal A, Aggeler R, Capaldi R, Will Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* agosto de 2007;21(5):902-11.
9. Wei PZ, Szeto CC. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 1 de septiembre de 2019;496:108-16.
10. Bhatia D, Capili A, Choi ME. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: potential therapeutic approaches. *Kidney Res Clin Pract.* 30 de septiembre de 2020;39(3):244-58.
11. Schwenk M, Werner M, Younes M. Regulatory toxicology: objectives and tasks defined by the working group of the German society of experimental and clinical pharmacology and toxicology. *Toxicol Lett.* 7 de febrero de 2002;126(3):145-53.
12. Repetto Jiménez M, Reppeto Khun G. *Toxicología fundamental Repetto Jiménez.* 4.^a ed. Díaz de Santos; 2009. 403-466 p.

13. López de Ceraín Salsamendi A, de la Peña de Torres E. *Revista de Toxicología. Forensic Toxicol.* 2003;20(2):106.
14. Klaassen CD, Watkins JB. *Fundamentos de toxicología.* Madrid: McGraw-Hill / Interamerican de España; 2005. 560 p.
15. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW, Carere A, Carpy AJM, Galli CL, et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* marzo de 2002;40(2-3):145-91.
16. Combes R, Balls M. Intelligent testing strategies for chemicals testing - a case of more haste, less speed? *Altern Lab Anim ATLA.* junio de 2005;33(3):289-97.
17. Anderson D, Conning D. *Experimental Toxicology* [Internet]. 1993. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-0-85186-461-7>
18. Tralau T, Oelgeschläger M, Gürtler R, Heinemeyer G, Herzler M, Höfer T, et al. Regulatory toxicology in the twenty-first century: challenges, perspectives and possible solutions. *Arch Toxicol.* junio de 2015;89(6):823-50.
19. Auletta C.S. L. Acute Systemic Toxicity. in *Product Safety: Evaluation Handbook.* *J Appl Toxicol.* 1999;9(1):69-70.
20. Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Rev CENIC Cienc Biológicas.* 2007;38(3):204-8.
21. Chhabra R S, Huff J E, Schwetz B S, Selkirk J. An overview of prechronic and chronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program. *Environ Health Perspect.* 1 de junio de 1990;86:313-21.
22. Test No. 451: Carcinogenicity Studies OECD [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.oecd.org/env/test-no-451-carcinogenicity-studies-9789264071186-en.htm>
23. Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies OECD [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.oecd.org/publications/test-no-453-combined-chronic-toxicity-carcinogenicity-studies-9789264071223-en.htm>
24. Hartung T, Blaauboer B, Leist M. Food for thought on education in alternative methods in toxicology. *Altern Anim Exp.* 1 de noviembre de 2009;26(4):255-63.
25. Vinardell Martínez Hidalgo MP. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. *Acta Bioethica* [Internet]. junio de 2007;13(1). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2007000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en
26. Piersma AH. Alternative methods for developmental toxicity testing. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98(5):427-31.

27. Combes R, Balls M. Intelligent testing strategies for chemicals testing - a case of more haste, less speed? *Altern Lab Anim ATLA*. junio de 2005;33(3):289-97.
28. OCDE-GD34 Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment [Internet]. 2005. Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocus/oecd/oecd-gd34.pdf>
29. Worth AP, Balls M. The principles of validation and the ECVAM validation process. *Altern Lab Anim ATLA*. junio de 2004;32 Suppl 1B:623-9.
30. Hernández M, Ibis R. Métodos alternativos en Toxicología. *Rev CENIC Cienc Biológicas* [Internet]. 2014;45(1). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=181230079003>
31. Test No. 423: Acute oral toxicity - Acute toxic class method [Internet]. 2001. Disponible en: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en
32. Diener W, Mischke U, Schlede E, Kayser D. The biometrical evaluation of the OECD modified version of the acute toxic class method (oral). *Arch Toxicol*. 1 de octubre de 1995;69(10):729-34.
33. Schlede E, Mischke U, Roll R, Kayser D. A national validation study of the acute-toxic-class method—an alternative to the LD50 test. *Arch Toxicol*. 1 de agosto de 1992;66(7):455-70.
34. Al-Naimi MS, Rasheed HA, Hussien NR, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI. Nephrotoxicity: Role and significance of renal biomarkers in the early detection of acute renal injury. *J Adv Pharm Technol Res*. 2019;10(3):95-9.
35. Zhao Y-Y, Lin R-C. Chapter Three - Metabolomics in Nephrotoxicity. En: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2014. p. 69-89. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001417000036>
36. J. M. López Novoa LR-C. Mecanismos básicos de nefrotoxicidad. *Nefrología*. 1 de febrero de 1995;15:44-8.
37. Uber AM, Sutherland SM. Nephrotoxins and nephrotoxic acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 1 de octubre de 2020;35(10):1825-33.
38. George B, You D, Joy MS, Aleksunes LM. Xenobiotic transporters and kidney injury. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de julio de 2017;116:73-91.
39. Lock EA, Reed CJ. Enzimas metabolizadoras xenobióticas del riñón. *Toxicol Pathol*. 1 de enero de 1998;26(1):18-25.

40. Paraíso Cuevas V, Felipe Fernández C, Martín García J. Nefropatías tóxicas: concepto, clasificación, etiopatogenia y fenotipos clínicos | *Medicine. Med Programa Form Médica Contin Acreditado*. junio de 2007;9(81):5192-9.
41. Gobe GC, Endre ZH. Cell death in toxic nephropathies. *Semin Nephrol*. septiembre de 2003;23(5):416-24.
42. Portilla D. Energy metabolism and cytotoxicity. *Semin Nephrol*. septiembre de 2003;23(5):432-8.
43. Bonventre JV. Molecular response to cytotoxic injury: role of inflammation, MAP kinases, and endoplasmic reticulum stress response. *Semin Nephrol*. septiembre de 2003;23(5):439-48.
44. Lee SA, Cozzi M, Bush EL, Rabb H. Distant Organ Dysfunction in Acute Kidney Injury: A Review. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. diciembre de 2018;72(6):846-56.
45. Bagshaw SM, Hoste EA, Braam B, Briguori C, Kellum JA, McCullough PA, et al. Cardiorenal syndrome type 3: pathophysiologic and epidemiologic considerations. *Contrib Nephrol*. 2013;182:137-57.
46. Pereira-Rodríguez JE, Boada-Morales L, Niño-Serrato DR, Caballero-Chavarro M, Rincón-Gonzales G, Jaimes-Martín T, et al. Síndrome cardiorrenal. *Rev Colomb Cardiol*. 1 de noviembre de 2017;24(6):602-13.
47. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 4 de noviembre de 2008;52(19):1527-39.
48. McCullough PA. Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *J Am Coll Cardiol*. 15 de abril de 2008;51(15):1419-28.
49. Jie KE, Verhaar MC, Cramer M-JM, van der Putten K, Gaillard CAJM, Doevendans PA, et al. Erythropoietin and the cardiorenal syndrome: cellular mechanisms on the cardiorenal connectors. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 1 de noviembre de 2006;291(5):F932-44.
50. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med*. 27 de septiembre de 2007;357(13):1316-25.
51. Singh K, Xiao L, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol*. diciembre de 2001;189(3):257-65.
52. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. marzo de 2000;52(1):11-34.
53. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*. 14 de marzo de 2000;101(10):1130-7.

54. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;109(4):e102-107.
55. Tracz MJ, Juncos JP, Croatt AJ, Ackerman AW, Grande JP, Knutson KL, et al. Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia. *Kidney Int*. noviembre de 2007;72(9):1073-80.
56. Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res*. 10 de diciembre de 2004;95(12):1140-53.
57. Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology*. mayo de 2012;116(5):1139-48.
58. Donoso F A, Arriagada S D, Cruces R P. Intercomunicación pulmón-riñón en el paciente crítico. *Rev Chil Pediatr*. octubre de 2015;86(5):209-317.
59. Ko GJ, Rabb H, Hassoun HT. Kidney-lung crosstalk in the critically ill patient. *Blood Purif*. 2009;28(2):75-83.
60. Rabb H, Wang Z, Nemoto T, Hotchkiss J, Yokota N, Soleimani M. Acute renal failure leads to dysregulation of lung salt and water channels. *Kidney Int*. 1 de febrero de 2003;63(2):600-6.
61. Mehta RL, Clark WC, Schetz M. Techniques for assessing and achieving fluid balance in acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*. diciembre de 2002;8(6):535.
62. Hassoun HT, Lie ML, Grigoryev DN, Liu M, Tuder RM, Rabb H. Kidney ischemia-reperfusion injury induces caspase-dependent pulmonary apoptosis. *Am J Physiol - Ren Physiol*. julio de 2009;297(1):F125-37.
63. Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia/reperfusion leads to macrophage-mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int*. 1 de junio de 1999;55(6):2362-7.
64. Floege J, Uhlig S. Kidney calling lung and call back: how organs talk to each other *. *Nephrol Dial Transplant*. 1 de enero de 2010;25(1):32-4.
65. Khimenko PL, Barnard JW, Moore TM, Wilson PS, Ballard ST, Taylor AE. Vascular permeability and epithelial transport effects on lung edema formation in ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*. 1 de septiembre de 1994;77(3):1116-21.
66. Deng J, Hu X, Yuen PST, Star RA. α -Melanocyte-stimulating Hormone Inhibits Lung Injury after Renal Ischemia/Reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2004;169(6):749-56.
67. Y K, H C, Ra S. α -Melanocyte-stimulating hormone and acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1 de julio de 1998;7(4):413-7.

68. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. junio de 2003;14(6):1549-58.
69. Salas A C, Lillo A P, Pacheco V A, Salomón S T, Lillo A F, Goldsack M A, et al. Efectos de la injuria renal isquémica aguda en la disfunción extrarenal: Estudio experimental aleatorizado. *Rev Chil Pediatría*. junio de 2013;84(3):268-75.
70. Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C. Biochemical and ultrastructural lung damage induced by rhabdomyolysis in the rat. *Exp Biol Med Maywood NJ*. septiembre de 2006;231(8):1430-8.
71. Fernandes FHA, Salgado HRN. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Crit Rev Anal Chem*. 3 de mayo de 2016;46(3):257-65.
72. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv*. 2015;5(35):27540-57.
73. Ríos J-L, Giner RM, Marín M, Recio MC. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med*. octubre de 2018;84(15):1068-93.
74. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int*. 1 de junio de 2011;44(5):1150-60.
75. Shakeri A, Zirak MR, Sahebkar A. Ellagic Acid: A Logical Lead for Drug Development? *Curr Pharm Des*. 2018;24(2):106-22.
76. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal*. enero de 2006;40(1):206-10.
77. Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000;80(7):1118-25.
78. Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016;928:473-9.
79. Jourdes M, Pouységu L, Deffieux D, Teissedre P-L, Quideau S. Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. En: Ramawat KG, Mérillon J-M, editores. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013. p. 1975-2010. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_65
80. Losso JN, Bansode RR, Trappey A, Bawadi HA, Truax R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem*. 1 de noviembre de 2004;15(11):672-8.
81. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol*. mayo de 2013;35(3):473-85.

82. Suntar I, Labanca F, Milella L. Gallotannins in Food. En: Xiao J, Sarker SD, Asakawa Y, editores. Handbook of Dietary Phytochemicals [Internet]. Singapore: Springer; 2019. p. 1-28. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1745-3_26-1
83. He Q, Shi B, Yao K. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chem - FOOD CHEM*. 1 de marzo de 2006;95:250-4.
84. Marković Z, Milenković D, Đorović Jovanović J, Dimitrić Marković J, Lucić B, Amić D. A DFT and PM6 study of free radical scavenging activity of ellagic acid. *Monatshefte Für Chem - Chem Mon*. 1 de junio de 2013;144.
85. Tiwari MK, Mishra PC. Modeling the scavenging activity of ellagic acid and its methyl derivatives towards hydroxyl, methoxy, and nitrogen dioxide radicals. *J Mol Model*. diciembre de 2013;19(12):5445-56.
86. Galano A, Francisco Marquez M, Pérez-González A. Ellagic acid: an unusually versatile protector against oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 19 de mayo de 2014;27(5):904-18.
87. Mehrzadi S, Mehrabani M, Malayeri AR, Bakhshayesh M, Kalantari H, Goudarzi M. Ellagic acid as a potential antioxidant, alleviates methotrexate-induced hepatotoxicity in male rats. *Acta Chir Belg*. abril de 2019;119(2):69-77.
88. Iino T, Tashima K, Umeda M, Ogawa Y, Takeeda M, Takata K, et al. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci*. 25 de enero de 2002;70(10):1139-50.
89. García-Niño WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacol Res*. julio de 2015;97:84-103.
90. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Phenolic Antioxidant. *J Agric Food Chem*. 1 de marzo de 2002;50(7):2200-6.
91. Uzar E, Alp H, Cevik MU, Fırat U, Evliyaoglu O, Tufek A, et al. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. junio de 2012;33(3):567-74.
92. Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev*. noviembre de 1997;55(11 Pt 1):396-8.
93. Strlic M, Radovic T, Kolar J, Pihlar B. Anti- and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. *J Agric Food Chem*. 2002;50(22):6313-7.
94. Zhang W, Hashimoto K, Yu G-Y, Sakagami H. Decline of superoxide dismutase activity during antioxidant-induced apoptosis in HL-60 cells. *Anticancer Res*. febrero de 2002;22(1A):219-24.

95. Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 5 de agosto de 2003;539(1):19-28.
96. Wang J, Wang X, He Y, Jia L, Yang CS, Reiter RJ, et al. Antioxidant and pro-oxidant activities of melatonin in the presence of copper and polyphenols in vitro and in vivo. *Cells* [Internet]. 15 de agosto de 2019;8(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721667/>
97. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. agosto de 2000;48(8):3597-604.
98. Babich H, Schuck AG, Weisburg JH, Zuckerbraun HL. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *J Toxicol*. 2011;2011:467305.
99. Stafford HA. Chapter Two - The evolution of phenolics in plants. En: Romeo JT, Ibrahim R, Varin L, De Luca V, editores. *Recent Advances in Phytochemistry* [Internet]. Elsevier; 2000. p. 25-54. (Evolution of Metabolic Pathways; vol. 34). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079992000800039>
100. Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 28 de agosto de 2006;41(5):1523-42.
101. Oliveira BG, Costa HB, Ventura JA, Kondratyuk TP, Barroso MES, Correia RM, et al. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chem*. 1 de agosto de 2016;204:37-45.
102. Kosar M, Bozan B, Temelli F, Baser KHC. Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chem*. 1 de enero de 2007;103(3):952-9.
103. Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J Agric Food Chem*. 27 de agosto de 2003;51(18):5497-503.
104. Masci A, Coccia A, Lendaro E, Mosca L, Paolicelli P, Cesa S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chem*. 1 de julio de 2016;202:59-69.
105. Villalba KJO, Barka FV, Pasos CV, Rodríguez PE. Food Ellagitannins: Structure, Metabolomic Fate, and Biological Properties [Internet]. *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*. IntechOpen; 2019 [citado 13 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/tannins-structural-properties-biological-properties-and-current-knowledge/food-ellagitannins-structure-metabolomic-fate-and-biological-properties>
106. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem*. 5 de junio de 2002;50(12):3495-500.

107. Acosta-Montoya Ó, Vaillant F, Cozzano S, Mertz C, Pérez AM, Castro MV. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chem.* 15 de abril de 2010;119(4):1497-501.
108. Muthukumaran S, Tranchant C, Shi J, Ye X, Xue SJ. Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Qual Saf.* 21 de diciembre de 2017;1(4):227-52.
109. Akbarpour V, Hemmati K, Sharifani M. Physical and Chemical Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit in Maturation Stage. 30 de noviembre de 2008;6.
110. Betés-Saura C, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. Phenolics in White Free Run Juices and Wines from Penedès by High-Performance Liquid Chromatography: Changes during Vinification. *J Agric Food Chem.* 1 de enero de 1996;44(10):3040-6.
111. Boyle JA, Hsu L. Identification and Quantitation of Ellagic Acid in Muscadine Grape Juice. *Am J Enol Vitic.* 1 de enero de 1990;41(1):43-7.
112. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *J Food Compos Anal.* 1 de octubre de 2002;15(5):567-75.
113. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* octubre de 2000;48(10):4581-9.
114. Lin JK, Lin CL, Liang YC, Lin-Shiau SY, Juan IM. Survey of Catechins, Gallic Acid, and Methylxanthines in Green, Oolong, Pu-erh, and Black Teas. *J Agric Food Chem.* septiembre de 1998;46(9):3635-42.
115. Yang X, Tomás-Barberán FA. Tea Is a Significant Dietary Source of Ellagitannins and Ellagic Acid. *J Agric Food Chem.* 15 de mayo de 2019;67(19):5394-404.
116. Jakopic J, Colaric M, Veberic R, Hudina M, Solar A, Stampar F. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? *Food Chem.* 1 de enero de 2007;104(1):100-5.
117. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem.* febrero de 2000;48(2):220-30.
118. Pereira V, Câmara JS, Cacho J, Marques JC. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *J Sep Sci.* mayo de 2010;33(9):1204-15.

119. Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem.* octubre de 1999;47(10):3978-85.
120. Khanavi M, Sabbagh-Bani-Azad M, Abdolghaffari AH, Vazirian M, Isazadeh I, Rezvanfar MA, et al. On the benefit of galls of *Quercus brantii* Lindl. in murine colitis: the role of free gallic acid. *Arch Med Sci AMS.* 22 de diciembre de 2014;10(6):1225-34.
121. Alfei S, Marengo B, Zuccari G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxidants.* agosto de 2020;9(8):707.
122. Saliu JA, Oyeleye SI, Olasehinde TA, Oboh G. Modulatory effects of stonebreaker (*Phyllanthus amarus*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) on enzymes linked with cardiac function in heart tissue of doxorubicin-stressed rats. *Drug Chem Toxicol.* 11 de diciembre de 2019;0(0):1-9.
123. Farag RS, Abdel-Latif MS, Abd El Baky HH, Tawfeek LS. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnol Rep.* 1 de diciembre de 2020;28:e00536.
124. Türkan F, Atalar MN, Aras A, Gülçin İ, Bursal E. ICP-MS and HPLC analyses, enzyme inhibition and antioxidant potential of *Achillea schischkinii* Sosn. *Bioorganic Chem.* 1 de enero de 2020;94:103333.
125. Wang X, Hou Y, Li Q, Li X, Wang W, Ai X, et al. *Rhodiola crenulata* attenuates apoptosis and mitochondrial energy metabolism disorder in rats with hypobaric hypoxia-induced brain injury by regulating the HIF-1 α /microRNA 210/ISCU1/2(COX10) signaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 15 de septiembre de 2019;241:111801.
126. Fidelis M, de Oliveira SM, Sousa Santos J, Bragueto Escher G, Silva Rocha R, Gomes Cruz A, et al. From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in a yogurt model. *J Dairy Sci.* 1 de febrero de 2020;103(2):1131-40.
127. Bajpai M, Pande A, Tewari SK, Prakash D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr.* junio de 2005;56(4):287-91.
128. Booth A, Amen RJ, Scott M, Greenway FL. Oral dose-ranging developmental toxicity study of an herbal supplement (NT) and gallic acid in rats. *Adv Ther.* 1 de abril de 2010;27(4):250-5.
129. Truzzi F, Valerii MC, Tibaldi C, Zhang Y, Abduazizova V, Spisni E, et al. Are Supplements Safe? Effects of Gallic and Ferulic Acids on In Vitro Cell Models. *Nutrients.* junio de 2020;12(6):1591.
130. Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, et al. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract

- attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 1 de septiembre de 2012;66(3):235-42.
131. Kolečkar V, Kubikova K, Rehakova Z, Kuca K, Jun D, Jahodar L, et al. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev Med Chem.* mayo de 2008;8(5):436-47.
132. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res.* septiembre de 2009;53 Suppl 2:S310-329.
133. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br J Pharmacol.* 2017;174(11):1244-62.
134. Kang I, Buckner T, Shay NF, Gu L, Chung S. Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms¹². *Adv Nutr.* 7 de septiembre de 2016;7(5):961-72.
135. Kiss AK, Piwowarski JP. Ellagitannins, Gallotannins and their Metabolites- The Contribution to the Anti-Inflammatory Effect of Food Products and Medicinal Plants. *Curr Med Chem.* 2018;25(37):4946-67.
136. Yang K, Zhang L, Liao P, Xiao Z, Zhang F, Sindaye D, et al. Impact of Gallic Acid on Gut Health: Focus on the Gut Microbiome, Immune Response, and Mechanisms of Action. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.580208/full#B59>
137. Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Mol Basel Switz.* 14 de febrero de 2017;22(2).
138. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* agosto de 2009;26(8):1001-43.
139. Barnes RC, Krenek KA, Meibohm B, Mertens-Talcott SU, Talcott ST. Urinary metabolites from mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) galloyl derivatives and in vitro hydrolysis of gallotannins in physiological conditions. *Mol Nutr Food Res.* marzo de 2016;60(3):542-50.
140. Zhang X, Xia Q, Yang G, Zhu D, Shao Y, Zhang J, et al. The anti-HIV-1 activity of polyphenols from *Phyllanthus urinaria* and the pharmacokinetics and tissue distribution of its marker compound, gallic acid. *J Tradit Chin Med Sci.* 1 de abril de 2017;4(2):158-66.
141. Nuñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T, García-Talavera NV, Gómez-Sánchez MB, Sánchez-Álvarez C, et al. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res.* junio de 2014;58(6):1199-211.

142. Pedro A-Z, Jorge EW-P, Juan JB-F, Juan AA, Juan CC-E, Cristóbal NA. Ellagitannins: Bioavailability, Purification and Biotechnological Degradation. *Mini-Rev Med Chem*. 31 de agosto de 2018;18(15):1244-52.
143. Zhang X, Sandhu A, Edirisinghe I, Burton-Freeman B. An exploratory study of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) (poly)phenols/metabolites in human biological samples. *Food Funct*. 21 de febrero de 2018;9(2):806-18.
144. Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol*. febrero de 2008;78(2):189-99.
145. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evid Based Complement Alternat Med*. 28 de mayo de 2013;2013:e270418.
146. Cerdá B, Espín JC, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán FA. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr*. agosto de 2004;43(4):205-20.
147. Truchado P, Larrosa M, García-Conesa MT, Cerdá B, Vidal-Guevara ML, Tomás-Barberán FA, et al. Strawberry Processing Does Not Affect the Production and Urinary Excretion of Urolithins, Ellagic Acid Metabolites, in Humans. *J Agric Food Chem*. 13 de junio de 2012;60(23):5749-54.
148. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J Nutr*. octubre de 2006;136(10):2481-5.
149. Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. octubre de 2004;348(1-2):63-8.
150. Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem*. 12 de diciembre de 2007;55(25):10476-85.
151. Pfundstein B, Haubner R, Würtele G, Gehres N, Ulrich CM, Owen RW. Pilot Walnut Intervention Study of Urolithin Bioavailability in Human Volunteers. *J Agric Food Chem*. 22 de octubre de 2014;62(42):10264-73.
152. Yan L, Yin P, Ma C, Liu Y. Method Development and Validation for Pharmacokinetic and Tissue Distributions of Ellagic Acid Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Molecules*. 18 de noviembre de 2014;19(11):18923-35.

153. Cortés-Martín A, García-Villalba R, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M, Loria-Kohen V, Ramírez-de-Molina A, et al. The gut microbiota urolithin metabotypes revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food Funct.* 15 de agosto de 2018;9(8):4100-6.
154. Variya BC, Bakrania AK, Madan P, Patel SS. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1 de febrero de 2019;101:71-8.
155. Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, et al. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 1 de noviembre de 2001;39(11):1063-70.
156. Park W, Chang MS, Kim H, Choi HY, Yang WM, Kim DR, et al. Cytotoxic effect of gallic acid on testicular cell lines with increasing H₂O₂ level in GC-1 spg cells. *Toxicol In Vitro.* 1 de febrero de 2008;22(1):159-63.
157. Abarikwu SO, Durojaiye M, Alabi A, Asonye B, Akiri O. Curcumin protects against gallic acid-induced oxidative stress, suppression of glutathione antioxidant defenses, hepatic and renal damage in rats. *Ren Fail.* 2016;38(2):321-9.
158. Rajalakshmi K, Devaraj H, Niranjali Devaraj S. Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* septiembre de 2001;39(9):919-22.
159. Go J, Kim J-E, Koh E-K, Song S-H, Seung J-E, Park C-K, et al. Hepatotoxicity and nephrotoxicity of gallotannin-enriched extract isolated from *Galla Rhois* in ICR mice. *Lab Anim Res.* septiembre de 2015;31(3):101-10.
160. Jadhav R, Puchchakayala G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: Boswellic acid, Ellagic acid, Quercetin, Rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 1 de enero de 2012;4:251-6.
161. Bhandary BSK, Sharmila KP, Kumari NS, Bhat SV. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extracts of *Punica Granatum* (linn). Whole fruit and seeds and synthetic ellagic acid in swiss albino mice. *Asian J Pharm Clin Res.* 1 de septiembre de 2013;192-8.
162. Tasaki M, Umemura T, Maeda M, Ishii Y, Okamura T, Inoue T, et al. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* marzo de 2008;46(3):1119-24.
163. Alfei S, Marengo B, Zuccari G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxid Basel Switz.* 4 de agosto de 2020;9(8):E707.
164. Alfei S, Marengo B, Zuccari G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxidants.* 4 de agosto de 2020;9(8):707.

165. Heilman J, Andreux P, Tran N, Rinsch C, Blanco-Bose W. Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid. *Food Chem Toxicol.* 1 de octubre de 2017;108:289-97.
166. González-Sarrías A, García-Villalba R, Romo-Vaquero M, Alasalvar C, Örem A, Zafrilla P, et al. Clustering according to urolithin metabotype explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomized clinical trial. *Mol Nutr Food Res.* mayo de 2017;61(5).
167. Kallio T, Kallio J, Jaakkola M, Mäki M, Kilpeläinen P, Virtanen V. Urolithins display both antioxidant and pro-oxidant activities depending on assay system and conditions. *J Agric Food Chem.* 13 de noviembre de 2013;61(45):10720-9.
168. Teel RW, Babcock MS, Dixit R, Stoner GD. Ellagic acid toxicity and interaction with benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol in human bronchial epithelial cells. *Cell Biol Toxicol.* 1 de marzo de 1986;2(1):53-62.
169. Saba, Khan S, Parvez S, Chaudhari B, Ahmad F, Anjum S, et al. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 1 de agosto de 2013;58:210-9.
170. McBride HM, Neuspiel M, Wasiaak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol CB.* 25 de julio de 2006;16(14):R551-560.
171. Gray MW. Mitochondria. En: Maloy S, Hughes K, editores. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2013. p. 430-2. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840009578>
172. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells* [Internet]. 5 de julio de 2019;8(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678092/>
173. Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G, Hepple RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol.* 2011;589(18):4413-21.
174. Ahmad M, Wolberg A, Kahwaji CI. Biochemistry, Electron Transport Chain. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526105/>
175. Manoli I, Alesci S, Chrousos GP. Mitochondria. En: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress (Second Edition)* [Internet]. New York: Academic Press; 2007 [citado 17 de mayo de 2021]. p. 754-61. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739476005596>
176. Abundis EM, Rodríguez MAS, Bentlakder MEH. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica.* 2005;30(3):82-9.

177. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. julio de 2016;1857(7):902-14.
178. Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:551-75.
179. Rich PR, Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem*. 2010;47:1-23.
180. Zhao R-Z, Jiang S, Zhang L, Yu Z-B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*. 1 de julio de 2019;44(1):3-15.
181. Hwang M-S, Rohlena J, Dong L-F, Neuzil J, Grimm S. Powerhouse down: Complex II dissociation in the respiratory chain. *Mitochondrion*. noviembre de 2014;19 Pt A:20-8.
182. Grimm S. Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. mayo de 2013;1827(5):565-72.
183. Covian R, Trumpower BL. Regulatory Interactions between Ubiquinol Oxidation and Ubiquinone Reduction Sites in the Dimeric Cytochrome bc1 Complex*. *J Biol Chem*. 13 de octubre de 2006;281(41):30925-32.
184. Xia D, Esser L, Tang W-K, Zhou F, Zhou Y, Yu L, et al. Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function. *Biochim Biophys Acta*. diciembre de 2013;1827(11-12):1278-94.
185. Meunier B, Fisher N, Ransac S, Mazat J-P, Brasseur G. Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1 de noviembre de 2013;1827(11):1346-61.
186. Smith PM, Fox JL, Winge DR. Biogenesis of the cytochrome bc1 complex and role of assembly factors. *Biochim Biophys Acta*. febrero de 2012;1817(2):276-86.
187. Mazat J-P, Devin A, Ransac S. Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cell Mol Life Sci CMLS*. febrero de 2020;77(3):455-65.
188. Trumpower B. Cytochrome bc1 Complex (Respiratory Chain Complex III). En: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2004. p. 528-34.
189. Pagacz J, Broniec A, Wolska M, Osyczka A, Borek A. ROS signaling capacity of cytochrome bc1: Opposing effects of adaptive and pathogenic mitochondrial mutations. *Free Radic Biol Med*. 1 de febrero de 2021;163:243-54.
190. Dröse S, Brandt U. The Mechanism of Mitochondrial Superoxide Production by the Cytochrome bc1 Complex *. *J Biol Chem*. 1 de agosto de 2008;283(31):21649-54.

191. Guillaud F, Dröse S, Kowald A, Brandt U, Klipp E. Superoxide production by cytochrome bc₁ complex: a mathematical model. *Biochim Biophys Acta*. octubre de 2014;1837(10):1643-52.
192. Cape JL, Aidasani D, Kramer DM, Bowman MK. Substrate Redox Potential Controls Superoxide Production Kinetics in the Cytochrome bc Complex. *Biochemistry*. 17 de noviembre de 2009;48(45):10716-23.
193. Zong S, Wu M, Gu J, Liu T, Guo R, Yang M. Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Res*. octubre de 2018;28(10):1026-34.
194. Arnold S. The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion*. enero de 2012;12(1):46-56.
195. Fillingame RH, Steed PR. Half channels mediating H⁺ transport and the mechanism of gating in the Fo sector of Escherichia coli F1Fo ATP synthase. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1 de julio de 2014;1837(7):1063-8.
196. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(2):211-25.
197. Pecina P, Nůsková H, Karbanová V, Kaplanová V, Mráček T, Houštěk J. Role of the mitochondrial ATP synthase central stalk subunits γ and δ in the activity and assembly of the mammalian enzyme. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1 de mayo de 2018;1859(5):374-81.
198. Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol*. mayo de 2016;26(5):367-78.
199. Genova ML, Lenaz G. New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *BioFactors Oxf Engl*. octubre de 2011;37(5):330-54.
200. Musatov A, Robinson NC. Bound cardiolipin is essential for cytochrome c oxidase proton translocation. *Biochimie*. 1 de octubre de 2014;105:159-64.
201. Babbitt SE, Sutherland MC, Francisco BS, Mendez DL, Kranz RG. Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. *Trends Biochem Sci*. 1 de agosto de 2015;40(8):446-55.
202. Bertini I, Cavallaro G, Rosato A. Cytochrome c: Occurrence and Functions. *Chem Rev*. 1 de enero de 2006;106(1):90-115.
203. Aerts L, Morais VA. Chapter 2 - Electron Transport Chain. En: Verstrecken P, editor. *Parkinson's Disease* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2017. p. 41-75. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803783600002X>
204. Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 1 de septiembre de 2013;62:90-101.

205. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* octubre de 2017;13(10):629-46.
206. Guo K, Lu J, Huang Y, Wu M, Zhang L, Yu H, et al. Protective Role of PGC-1 α in Diabetic Nephropathy Is Associated with the Inhibition of ROS through Mitochondrial Dynamic Remodeling. *PLOS ONE.* 8 de abril de 2015;10(4):e0125176.
207. Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 15 de febrero de 2014;306(4):F367-378.
208. Kosuru RY, Roy A, Das SK, Bera S. Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(1):1700699.
209. Dehghani MA, Shakiba Maram N, Moghimipour E, Khorsandi L, Atefi khah M, Mahdavinia M. Protective effect of gallic acid and gallic acid-loaded Eudragit-RS 100 nanoparticles on cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and inflammation in rat kidney. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 de diciembre de 2020;1866(12):165911.
210. Zeng M, Su Y, Li K, Jin D, Li Q, Li Y, et al. Gallic Acid Inhibits Bladder Cancer T24 Cell Progression Through Mitochondrial Dysfunction and PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Suppression. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020;11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.01222/full>
211. Frey C, Pavani M, Cordano G, Muñoz S, Rivera E, Medina J, et al. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* abril de 2007;146(4):520-7.
212. Keshtzar E, Khodayar MJ, Javadipour M, Ghaffari MA, Bolduc DL, Rezaei M. Ellagic acid protects against arsenic toxicity in isolated rat mitochondria possibly through the maintaining of complex II. *Hum Exp Toxicol.* octubre de 2016;35(10):1060-72.
213. Sepand MR, Ghahremani MH, Razavi-Azarkhiavi K, Aghsami M, Rajabi J, Keshavarz-Bahaghighat H, et al. Ellagic acid confers protection against gentamicin-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction and apoptosis-related nephrotoxicity. *J Pharm Pharmacol.* septiembre de 2016;68(9):1222-32.
214. Boehning AL, Essien SA, Underwood EL, Dash PK, Boehning D. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* octubre de 2018;106:411-8.
215. Alfredsson CF, Ding M, Liang Q-L, Sundström BE, Nånberg E. Ellagic acid induces a dose- and time-dependent depolarization of mitochondria and activation of caspase-9 and -3 in human neuroblastoma cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* febrero de 2014;68(1):129-35.

216. Zhang Y, Zhu K, Cui H, Liu Y, Lu Y-F, Pan H-W, et al. Toxicological evaluation of *Oviductus ranae*: Acute, sub-acute and genotoxicity studies in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 5 de mayo de 2017;203:101-9.
217. Aslan A, Gok O, Beyaz S, Ağca CA, Erman O, Zerek A. Ellagic acid prevents kidney injury and oxidative damage via regulation of Nrf-2/NF- κ B signaling in carbon tetrachloride induced rats. *Mol Biol Rep.* octubre de 2020;47(10):7959-70.
218. Cengiz M, Ali JH, Kutlu HM, Vejselova D, Ayhanci A. Potential Recruiting and Hepatoprotective Effects of Ellagic Acid in D-Galactosamine-Induced Liver Damage in Rats. *Pak J Zool.* junio de 2017;49(4):1251-9.
219. Farbood Y, Rashno M, Ghaderi S, Khoshnam SE, Sarkaki A, Rashidi K, et al. Ellagic acid protects against diabetes-associated behavioral deficits in rats: Possible involved mechanisms. *Life Sci.* 15 de mayo de 2019;225:8-19.
220. Liu Q-S, Li S-R, Li K, Li X, Yin X, Pang Z. Ellagic acid improves endogenous neural stem cells proliferation and neurorestoration through Wnt/ β -catenin signaling in vivo and in vitro. *Mol Nutr Food Res.* marzo de 2017;61(3).
221. OECD-423 Guideline for testing of chemicals [Internet]. 2001. Disponible en: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocks/oecd/oecd_gl423.pdf
222. Saavedra-Molina A, Devlin TM. Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids.* 1 de septiembre de 1997;12(3):293-8.
223. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* febrero de 1949;177(2):751-66.
224. Cortés-Rojo C, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Estrada-Villagómez M, Manzo-Avalos S, Mejía-Zepeda R, et al. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J Bioenerg Biomembr.* 18 de febrero de 2009;41(1):15.
225. Ortiz-Avila O, Sámano-García CA, Calderón-Cortés E, Pérez-Hernández IH, Mejía-Zepeda R, Rodríguez-Orozco AR, et al. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* junio de 2013;45(3):271-87.
226. Doan KV, Ko CM, Kinyua AW, Yang DJ, Choi Y-H, Oh IY, et al. Gallic Acid Regulates Body Weight and Glucose Homeostasis Through AMPK Activation. *Endocrinology.* 1 de enero de 2015;156(1):157-68.
227. Panchal SK, Ward L, Brown L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr.* marzo de 2013;52(2):559-68.

228. Okla M, Kang I, Kim DM, Gourineni V, Shay N, Gu L, et al. Ellagic acid modulates lipid accumulation in primary human adipocytes and human hepatoma Huh7 cells via discrete mechanisms. *J Nutr Biochem.* enero de 2015;26(1):82-90.
229. Devipriya N, Sudheer AR, Menon VP. Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fundam Clin Pharmacol.* diciembre de 2007;21(6):621-30.
230. Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 de mayo de 2013;434(3):486-91.
231. Kang I, Kim Y, Tomás-Barberán FA, Espín JC, Chung S. Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(5):1129-38.
232. Rajalakshmi K, Devaraj H, Niranjali Devaraj S. Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. *Food Chem Toxicol.* 1 de septiembre de 2001;39(9):919-22.
233. Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, et al. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 1 de noviembre de 2001;39(11):1063-70.
234. Saldana J, Alvarez JF, Bedoya N. Enfoque clínico de la trombocitosis, una revisión de la literatura. *Salut Sci Spirit [Internet].* 30 de junio de 2018;4(1). Disponible en: <https://revistas.javerianacali.edu.co/index.php/salutemscientiaspiritus/article/view/1862>
235. Naughton CA. Drug-Induced Nephrotoxicity. *Am Fam Physician.* 15 de septiembre de 2008;78(6):743-50.
236. Go J, Kim J-E, Koh E-K, Song S-H, Seung J-E, Park C-K, et al. Hepatotoxicity and nephrotoxicity of gallotannin-enriched extract isolated from *Galla Rhois* in ICR mice. *Lab Anim Res.* 1 de julio de 2015;31(3):101-10.
237. Monks TJ, Lau SS. Glutathione conjugation as a mechanism for the transport of reactive metabolites. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 1994;27:183-210.
238. López-Sendón J, López de Sá E. Nuevos criterios de diagnóstico de infarto de miocardio: orden en el caos. *Rev Esp Cardiol.* 1 de enero de 2001;54(6):669-74.
239. Ma F-W, Deng Q-F, Zhou X, Gong X-J, Zhao Y, Chen H-G, et al. The Tissue Distribution and Urinary Excretion Study of Gallic Acid and Protocatechuic Acid after Oral Administration of *Polygonum Capitatum* Extract in Rats. *Molecules.* abril de 2016;21(4):399.

240. Dorado Lambert AE, Revilla Montero J. Radicales libres de oxígeno y distress respiratorio agudo. *Rev Cuba Pediatría*. septiembre de 2000;72(3):214-9.
241. You BR, Park WH. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol In Vitro*. 1 de agosto de 2010;24(5):1356-62.
242. Ryrfeldt A, Bannenberg G, Moldéus P. Free radicals and lung disease. *Br Med Bull*. julio de 1993;49(3):588-603.
243. Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutat Res*. 5 de agosto de 2003;539(1-2):19-28.
244. Wang HR, Sui HC, Zhu BT. Ellagic acid, a plant phenolic compound, activates cyclooxygenase-mediated prostaglandin production. *Exp Ther Med*. agosto de 2019;18(2):987-96.
245. Li Y, Xia W, Zhao F, Wen Z, Zhang A, Huang S, et al. Prostaglandins in the pathogenesis of kidney diseases. *Oncotarget*. 29 de mayo de 2018;9(41):26586-602.
246. Mohamed R, Jayakumar C, Ranganathan PV, Ganapathy V, Ramesh G. Kidney proximal tubular epithelial-specific overexpression of netrin-1 suppresses inflammation and albuminuria through suppression of COX-2-mediated PGE2 production in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol*. diciembre de 2012;181(6):1991-2002.
247. White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet Lond Engl*. 16 de agosto de 2008;372(9638):570-84.
248. Spigoni V, Mena P, Cito M, Fantuzzi F, Bonadonna RC, Brighenti F, et al. Effects on Nitric Oxide Production of Urolithins, Gut-Derived Ellagitannin Metabolites, in Human Aortic Endothelial Cells. *Mol Basel Switz*. 2 de agosto de 2016;21(8):E1009.
249. Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006;24(2):77-87.
250. Orozco B. R. Enfermedad cardiovascular (ECV) en la enfermedad renal crónica (ERC). *Rev Médica Clínica Las Condes*. 1 de marzo de 2015;26(2):142-55.
251. Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y, Henning SM, Moro A, Lee R-P, et al. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J Agric Food Chem*. 19 de septiembre de 2007;55(19):7732-7.
252. Cornélio Favarin D, Martins Teixeira M, Lemos de Andrade E, de Freitas Alves C, Lazo Chica JE, Artério Sorgi C, et al. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:164202.

253. Castañeda-Arriaga R, Pérez-González A, Reina M, Alvarez-Idaboy JR, Galano A. Comprehensive Investigation of the Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Phenolic Compounds: A Double-Edged Sword in the Context of Oxidative Stress? *J Phys Chem B*. 14 de junio de 2018;122(23):6198-214.
254. Shafie B, Pourahmad J, Rezaei M. N-acetylcysteine is more effective than ellagic acid in preventing acrolein induced dysfunction in mitochondria isolated from rat liver. *J Food Biochem*. 2021;e13775.
255. Adachi H, Konishi K, Horikoshi I. The effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose on rat liver mitochondrial respiration. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. mayo de 1989;37(5):1341-4.
256. Rahimifard M, Baeeri M, Bahadar H, Moini-Nodeh S, Khalid M, Haghi-Aminjan H, et al. Therapeutic Effects of Gallic Acid in Regulating Senescence and Diabetes; an In Vitro Study. *Molecules*. enero de 2020;25(24):5875.
257. Carvajal Carvajal C, Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med Leg Costa Rica*. marzo de 2019;36(1):91-100.
258. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. agosto de 2010;45(7-8):466-72.
259. Chandel NS. Mitochondrial complex III: an essential component of universal oxygen sensing machinery? *Respir Physiol Neurobiol*. 31 de diciembre de 2010;174(3):175-81.
260. Hadrava Vanova K, Kraus M, Neuzil J, Rohlena J. Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. *Redox Rep Commun Free Radic Res*. 25(1):26-32.
261. Iverson TM, Maklashina E, Cecchini G. Structural basis for malfunction in complex II. *J Biol Chem*. 12 de octubre de 2012;287(42):35430-8.
262. Miyadera H, Shiomi K, Ui H, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, et al. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 de enero de 2003;100(2):473-7.
263. Kluckova K, Sticha M, Cerny J, Mracek T, Dong L, Drahota Z, et al. Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *Cell Death Dis*. 7 de mayo de 2015;6:e1749.
264. Forkink M, Manjeri GR, Liemburg-Apers DC, Nibbeling E, Blanchard M, Wojtala A, et al. Mitochondrial hyperpolarization during chronic complex I inhibition is sustained by low activity of complex II, III, IV and V. *Biochim Biophys Acta*. agosto de 2014;1837(8):1247-56.
265. Forkink M, Basit F, Teixeira J, Swarts HG, Koopman WJH, Willems PHGM. Complex I and complex III inhibition specifically increase cytosolic hydrogen peroxide levels without inducing oxidative stress in HEK293 cells. *Redox Biol*. diciembre de 2015;6:607-16.

266. Badhani B, Kakkar R. Influence of intrinsic and extrinsic factors on the antiradical activity of Gallic acid: a theoretical study. *Struct Chem*. 1 de febrero de 2018;29(1):359-73.
267. Funk JA, Schnellmann RG. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1 de abril de 2012;302(7):F853-864.
268. Heidari R. The footprints of mitochondrial impairment and cellular energy crisis in the pathogenesis of xenobiotics-induced nephrotoxicity, serum electrolytes imbalance, and Fanconi's syndrome: A comprehensive review. *Toxicology*. 1 de julio de 2019;423:1-31.
269. Ramamoorthy H, Abraham P, Isaac B. Mitochondrial dysfunction and electron transport chain complex defect in a rat model of tenofovir disoproxil fumarate nephrotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*. junio de 2014;28(6):246-55.
270. Ahmed LA, Shehata NI, Abdelkader NF, Khattab MM. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PloS One*. 2014;9(10):e108889.

XII. ANEXOS