



Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo



Facultad de Químico Farmacobiología

Tesis

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA ORAL DE ÁCIDO
ELÁGICO EN RATAS WISTAR**

Para obtener el título de Química Farmacobióloga

Presenta:

P.QFB MARÍA DE LOS ÁNGELES RANGEL ROSALES

Director:

D.C. Martha Estrella García Pérez

Co-director:

D.C. María Carmen Bartolomé Camacho

Morelia, Michoacán. 2023

INDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN	5
II	MARCO TEÓRICO	6
2.1	DESARROLLO FARMACÉUTICO	6
2.1.1	Etapa de descubrimiento	7
2.1.2	Etapa de investigación preclínica	11
2.1.3	Etapa de investigación clínica	13
2.2	LA TOXICOLOGÍA EN EL DESARROLLO FARMACÉUTICO	15
2.2.1	Conceptos generales de toxicología	16
2.2.2	Tipos de estudios toxicológicos	19
2.2.3	Métodos toxicológicos alternativos	22
2.2.4	Características de los estudios de toxicidad oral aguda por el método de clases de toxicidad	23
2.3	CARACTERÍSTICAS Y BIOACTIVIDAD DEL ÁCIDO ELÁGICO Y ELAGITANINOS	25
2.3.1	Características fisicoquímicas del ácido elágico	25
2.3.2	El ácido elágico y la formación de elagitaninos	26
2.3.3	Carácter antioxidante del ácido elágico	28
2.3.4	Otras actividades farmacológicas del ácido elágico	30
2.3.5	Biotransformación de los elagitaninos y el ácido elágico por vía oral	33
2.3.6	Contenido de ácido elágico en suplementos nutricionales, tés, alimentos y plantas medicinales	37
2.3.7	Estudios toxicológicos reportados con ácido elágico.	39
III	JUSTIFICACIÓN	42
IV	HIPÓTESIS	43
V	OBJETIVOS	44
5.1	Objetivo general	44
5.2	Objetivos específicos	44
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	45
6.1	Materiales	45
6.2	Evaluación de la toxicidad oral aguda en ratas Wistar	45
6.3.1	Especie animal	45
6.3.2	Selección de las dosis	46
6.3.3	Período y vía de exposición	46
6.3.4	Procedimiento experimental	46

6.3.5 Análisis macroscópico	47
6.3.6 Análisis histopatológico	47
6.3.7 Determinaciones hematológicas y bioquímicas	48
VII RESULTADOS	49
7.1 Estudio de toxicidad oral aguda: evaluación de signos y síntomas de toxicidad	49
7.1.1 Peso corporal	49
7.1.2 Consumo de alimentos	50
7.1.3 Análisis macroscópico de los órganos	51
7.1.4 Análisis histopatológico	54
7.1.5 Análisis hematológico y bioquímico	60
VIII DISCUSIÓN	63
IX CONCLUSIONES	68
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas involucradas en el desarrollo farmacéutico. _____	7
Figura 2. Aspectos que se consideran durante la etapa de descubrimiento de un nuevo fármaco _____	7
Figura 3. Modelos empleados durante el desarrollo de un fármaco. _____	9
Figura 4. Sistema de clasificación GHS, prueba con dosis inicial de 5 mg/kg de peso corporal. _____	24
Figura 5. Estructura química del ácido elágico. _____	26
Figura 6. Vía biosintética general de los elagitaninos. _____	28
Figura 7. Actividad antioxidante del ácido elágico por quelación del ión ferroso y capacidad reductora del ion férrico. _____	30
Figura 8. Bioactividad de ácido elágico. _____	31
Figura 9. Vía de transformación de las urolitinas mediante bacterias intestinales. ____	35
Figura 10. Relación del peso corporal de las ratas durante la evaluación toxicológica. _____	50
Figura 11. Relación del consumo de alimento en g de las ratas con los días 0,7 a 14 de exposición del ácido elágico a diferentes dosis. _____	51
Figura 12. Pulmones a los 14 días de la administración a diferentes dosis con ácido elágico. Disminución de color respecto a las dosis. Control (A), 200 mg/Kg (B), 1000 mg/Kg (C), 2000 mg/Kg (D). _____	52
Figura 13. Corazón a los 14 días posterior a la administración de ácido elágico. Derrame en el pericardio de única dosis. _____	53
Figura 14. Histopatología del riñón posterior a la administración del ácido elágico a diferentes dosis. _____	55
Figura 15. Análisis histopatológico del riñón posterior a la administración del ácido elágico. _____	56
Figura 16. Análisis histopatológico del corazón posterior a la exposición de ácido elágico. _____	57
Figura 17. Análisis histopatológico del corazón posterior a la exposición de ácido elágico. _____	58
Figura 18. Análisis histopatológico en pericardio posterior a la exposición con ácido elágico. _____	59
Figura 19. Análisis histopatológico del pulmón posterior a la exposición con ácido elágico. _____	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios y criterios evaluados en la fase de investigación preclínica y sometidos a revisión ante las entidades regulatorias. _____	11
Tabla 2. Métodos alternativos aceptados internacionalmente para medir la toxicidad aguda por vía oral. _____	23
Tabla 3. Comparación de la prueba de toxicidad oral aguda por el método de clases de toxicidad (método ATC) y la prueba DL50 (Enero de 2000- Diciembre 2003). __	25
Tabla 4. Algunos alimentos que contienen ácido elágico. _____	38
Tabla 5. Valores del peso relativo de los órganos correspondientes a ratas Wistar expuestas a ácido elágico. _____	53
Tabla 6. Parámetros hematológicos y bioquímicos obtenidos posterior a la administración de ácido elágico a diferentes dosis con el grupo control. _____	61

Resumen:

El ácido elágico (AE) es un compuesto fenólico que se encuentra en altas concentraciones en el té verde, plantas medicinales, frutas y verduras. Este compuesto es reconocido por sus propiedades biológicas, en particular como antioxidante. En los últimos años se han incrementado las ventas de suplementos dietéticos que contienen esta molécula. Al respecto, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha manifestado sus preocupaciones sobre los peligros del consumo descontrolado de suplementos de AE basándose en supuestos beneficios para la salud. La presente investigación tuvo como objetivo analizar la toxicidad oral aguda del AE en ratas Wistar siguiendo el método de clases de toxicidad descrito en la guía 423 de la OCDE. El AE fue administrado por vía oral en dosis única (200, 1.000 y 2.000 mg/kg). Se determinó el peso corporal, el consumo de alimento, el peso relativo de los órganos y se realizaron análisis bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. La administración de AE generó una disminución de la coloración de los pulmones y desgarre pericárdico, así como un incremento significativo de la urea y la creatinina sérica. A nivel histopatológico se confirmó la presencia de daño renal, cardíaco y pulmonar dosis-dependiente relacionado con la administración aguda de esta sustancia. Estos resultados demuestran que este compuesto posee un potencial tóxico inherente que no debe ser subestimado, por lo que no debería utilizarse indiscriminadamente por el riesgo subyacente de producir reacciones adversas y posibles intoxicaciones.

Palabras clave: ácido elágico, toxicidad, riñón, corazón, pulmón

Abstract:

Ellagic acid (EA) is a phenolic compound found in high concentrations in green tea, medicinal plants, fruits, and vegetables. This compound is recognized for its biological properties, in particular as an antioxidant. In recent years, sales of dietary supplements containing this molecule have increased. In this regard, the Food and Drug Administration (FDA) has expressed its concerns about the dangers of uncontrolled consumption of EA supplements based on supposed health benefits. The present research aimed to analyze the acute oral toxicity of EA in Wistar rats following the method described in guideline 423 of the OECD. Ellagic acid was administered orally in a single dose (200, 1.000 and 2.000 mg/kg). Body weight, food consumption, and relative organ weight were determined, as well as biochemical, hematological, and histopathological parameters. The administration of EA caused a decrease in lung coloration and pericardial rupture, as well as a significant increase in serum urea and creatinine. At histopathological level, the presence of dose-dependent renal, cardiac, and pulmonary injury related to the acute administration of this substance was confirmed. These results show that ellagic acid has an inherent toxic potential that should not be underestimated, so it should not be used indiscriminately due to the underlying risk of producing adverse reactions and intoxications.

Key words: ellagic acid, toxicity, kidney, heart, lung

I INTRODUCCIÓN

El ácido elágico (AE) es un compuesto fenólico que se encuentra en altas concentraciones en el té verde, frutas, verduras y plantas medicinales (1). Es un compuesto con múltiples acciones biológicas, siendo la acción antioxidante una de las más reconocidas. En los últimos años se han incrementado las ventas de suplementos dietéticos que contienen AE, lo que ha causado preocupación por las agencias regulatorias con respecto a los peligros del consumo descontrolado de suplementos derivados de este compuesto, basándose en supuestos beneficios para la salud (2).

Se ha estimado que la ingesta diaria promedio humana de AE en hombres y mujeres que consumen niveles apropiados de frutas y verduras es de 17.9 y 27.6 mg por día, respectivamente (3). Los datos de ingesta dietética son difíciles de analizar debido a la falta de información sobre la ingesta de AE considerando, además de las fuentes alimenticias, el consumo de suplementos dietéticos y plantas medicinales, especialmente en individuos que usan frecuentemente todos estos productos combinados. Este escenario es aún más desconcertante en el caso de las personas que beben infusiones de té con regularidad, ya que se sabe que el té es una fuente importante de AE. La ingesta de AE tras beber una taza de té *Camellia sinensis* (L.) Kuntze elaborada con 4 g de té oscila entre 0.59-17.89 mg (4). El uso indiscriminado de suplementos dietéticos, ligado al consumo de frutas, verduras, infusiones y plantas medicinales, podría provocar un aumento de la ingesta total de AE, contribuyendo así a la aparición de efectos secundarios.

Desafortunadamente, las evaluaciones toxicológicas realizadas con AE muestran resultados contradictorios. Teniendo en cuenta esta realidad, en el presente trabajo, el objetivo fue evaluar en ratas Wistar la toxicidad oral aguda del ácido elágico en aras de comprender mejor su toxicidad potencial individual con para en un futuro anticipar acciones ante eventos adversos e intoxicaciones que pudieran resultar de la administración oral de este compuesto.

II MARCO TEÓRICO

2.1 DESARROLLO FARMACÉUTICO

Durante el siglo XIX, en Europa se lograron grandes avances y descubrimientos en el campo de la química orgánica, los cuales permitieron la elaboración de medicamentos pasando de la extracción tradicional de principios activos de plantas a la síntesis y aislamiento de moléculas con efectos terapéuticos. El obtener moléculas con elevada pureza fue de gran ayuda para estudiar sus efectos terapéuticos en el organismo, así como su uso para la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades. En México, la investigación farmacéutica tendría sus primeras actividades a mitad del siglo XIX, específicamente en el periodo del Porfiriato (1876-1911), donde el Estado permitió el continuo contacto con científicos europeos (5).

Actualmente el descubrimiento de un nuevo fármaco es un proceso complejo, que requiere llevarse a cabo mediante fases reguladas, siendo el desarrollo farmacéutico un conjunto ordenado de etapas que conllevan al desarrollo de un nuevo medicamento (6). De hecho, se trata de un proceso que incluye fases bien establecidas con el objetivo de identificar una molécula que puede ser obtenida por síntesis química, a partir de productos naturales o bien una biomolécula obtenida por vía biotecnológica para evaluarla exhaustivamente como posible candidato a fármaco. Para ello resulta necesario tener suficientes pruebas de actividad biológica sobre un blanco terapéutico relevante para una enfermedad, así como suficiente seguridad y propiedades parecidas a las de un fármaco (7). La Figura 1 representa las diferentes etapas involucradas en el desarrollo farmacéutico. Globalmente, supone un compromiso de tiempo y recursos generalmente con una duración aproximada de 10-15 años, y un coste medio de aproximadamente de \$1.8 millones de dólares. Para aumentar la eficacia del proceso es fundamental comprender por completo el valor final del proyecto desde las primeras etapas del desarrollo y poder aprovechar esta información en el diseño de la estrategia clínica individual correspondiente al fármaco a ser desarrollado (8). Una descripción detallada de cada una de las etapas involucradas en

el desarrollo farmacéutico se describe a continuación.

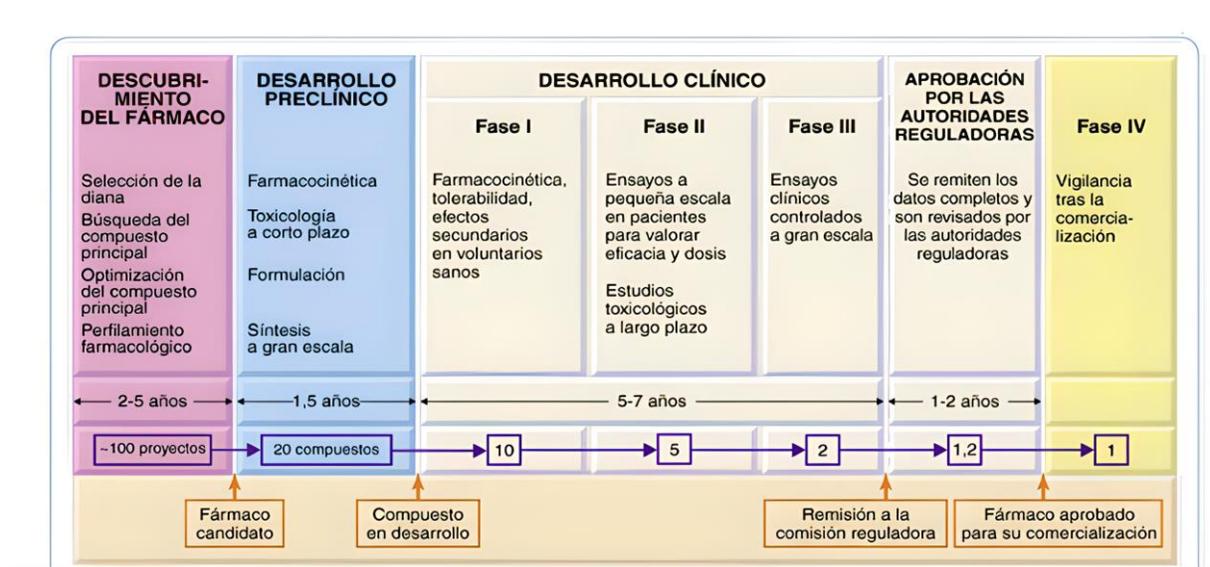


Figura 1. Etapas involucradas en el desarrollo farmacéutico. Tomada de (9).

2.1.1 Etapa de descubrimiento

La Figura 2 muestra las estrategias generales que se emplean durante la etapa de descubrimiento de un nuevo fármaco. El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo que suele iniciar enfocándose en una enfermedad que necesite una nueva o mejorada intervención terapéutica, por lo que primero se necesita una comprensión de la enfermedad.

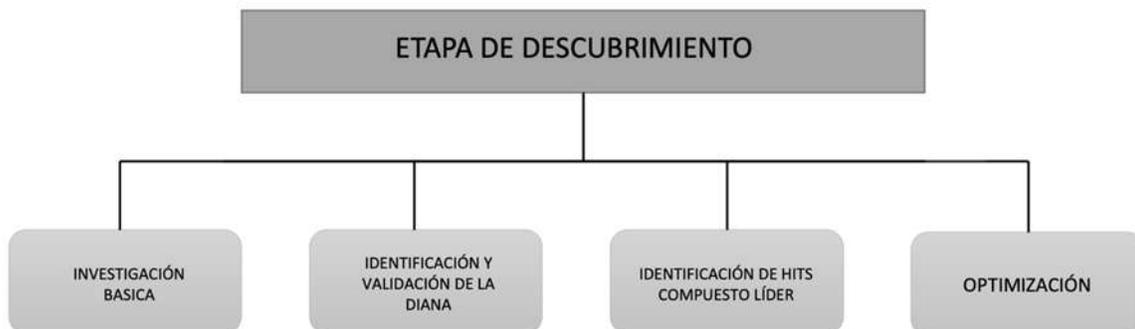


Figura 2. Aspectos que se consideran durante la etapa de descubrimiento de un nuevo fármaco

Para ello, se formulan hipótesis de los mecanismos que intervienen en la patología, por ejemplo, pueden estudiarse las mutaciones genéticas, los cambios a las proteínas codificadoras, cómo estas proteínas interactúan entre sí con las células vivas, enfocándose a su vez en los cambios sobre el tejido específico y de qué manera estos procesos se combinan para afectar al paciente.

Se pueden usar modelos *in vitro*, tejidos y células, así como modelos *in vivo*, especialmente animales de experimentación (Figura 3). También se pueden generar datos ómicos (ADN, ARN, proteínas, metabolitos) que informan de diferentes funciones de la célula o del organismo, los que eventualmente podrían obtenerse de repositorios públicos: Gene Expression Omnibus (GEO), Proteomics IDentifications (PRIDE) o bien ArrayExpress. Una vez que se han comprendido bien las causas y etiología de la enfermedad, se selecciona una diana biológica o blanco terapéutico para un posible nuevo medicamento. Una diana biológica puede ser una biomolécula (ej.: un gen, receptores, enzimas o proteínas transportadoras) implicada en la enfermedad específica y que se pueda regular por un fármaco. Por ejemplo, enfermedades autoinmunes, como el VIH/SIDA, se basan en descubrir proteínas que alteren al sistema inmunitario humano (10).

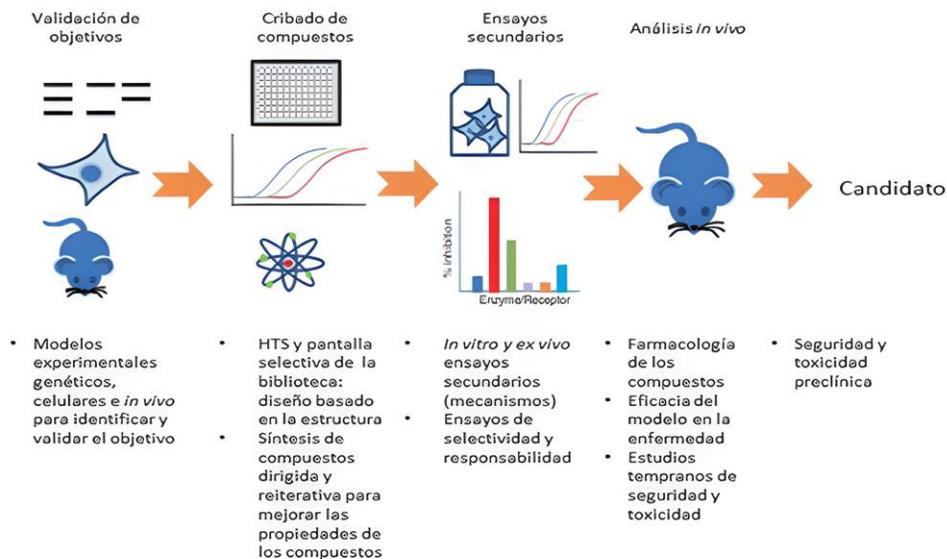


Figura 3. Modelos empleados durante el desarrollo de un fármaco. Tomado de (11).

En el proceso de identificación de la diana, se pueden emplear diversas tecnologías, entre ellas, experimentos con chips o secuencias de ADN, electroforesis de proteínas, espectrometría de masas y técnicas de imanes por ordenador. Igualmente pueden emplearse la genómica y la proteómica. Se realizan experimentos en células vivas, al igual que pruebas en animales de experimentación para comprobar que un objetivo específico es importante para la enfermedad en cuestión (12–14). Asimismo, los métodos de cribados funcionales que se utilizan, generalmente se dividen en modelos de ganancia de función y pérdida de función. Se evalúan el enriquecimiento o agotamiento de las dianas terapéuticas y su impacto en el desarrollo de la enfermedad (15).

Para que una molécula biológica pueda ser considerada como diana terapéutica, su funcionamiento debe tener un papel crucial en los eventos subyacentes que conducen a la enfermedad. Por lo que es importante que durante la fase de descubrimiento se establezca una relación causa-efecto, ya que se establece la necesidad de una relación causal entre la entidad potencial de la diana, y los acontecimientos biológicos

o patógenos que conducen a la enfermedad. Si bien la validación de un blanco terapéutico podría considerarse un proceso largo y complejo, si se lleva a cabo con éxito, autentifica el descubrimiento de fármacos y potencializa las posibilidades de éxito durante los ensayos clínicos. La validación de la diana también sirve para minimizar la toxicidad, ya que el posible candidato a fármaco tendrá un efecto específico sin afectar las células normales (16).

Dentro de la fase del descubrimiento se utilizan diferentes ensayos biológicos para identificar moléculas que tengan actividad en la diana biológica (Figura 3). Posteriormente, se usan estos ensayos para examinar bibliotecas de compuestos para identificar aquellos compuestos que pueden interactuar de forma eficaz con la diana. Estos compuestos, también conocidos como “hits” se definen como aquellas moléculas que presentan la actividad requerida mediante un cribado, posterior confirmación con otras pruebas. Para la identificación de tales moléculas, existe una amplia variedad de cribados. El cribado de alto rendimiento (HTS) implica una biblioteca de compuestos contra la diana biológica, o también un ensayo basado en células. La actividad depende de la diana y se requieren ensayos adicionales para confirmar la acción del compuesto. Se utiliza el cribado focalizado o basado en conocimiento, el cribado de fragmento, así como el cribado fisiológico que tiene un enfoque especializado (13).

Los compuestos encontrados en la fase de descubrimiento constituyen la base del siguiente proceso, la optimización del compuesto principal habitualmente tiene como objetivo aumentar la potencia del compuesto sobre la diana y optimizar características, como la selectividad y las propiedades farmacocinéticas. Se aplican pruebas con una diversidad de ensayos, incluyendo estudios que van desde medir la actividad hasta la evolución temporal del compuesto *in vivo* que se llevan a cabo en modelos animales simulando las condiciones clínicas posibles. Una clave para la optimización de compuestos es la determinación de alto rendimiento de las estructuras tridimensionales de proteínas. Es fundamental en esta fase que la diana sea cuidadosamente considerada. El objetivo es identificar uno o más “hits” que son los fármacos que serán considerados como candidatos para su desarrollo (9,17).

2.1.2 Etapa de investigación preclínica

El desarrollo preclínico representa a todo el conjunto de estudios que se llevan a cabo en sistemas biológicos complejos antes de la experimentación en seres humanos e involucra fundamentalmente la determinación de aspectos farmacocinéticos, farmacodinámicos y de seguridad de los candidatos terapéuticos (Tabla 1). En esta etapa se caracteriza fundamentalmente la eficacia y la seguridad del candidato a fármaco en sistemas celulares “*in vitro*”, así como en modelos animales “*in vivo*”. Comprende un proceso inicial de selección de nuevas moléculas candidatas, las que provienen de la fase de descubrimiento, para posteriormente investigarlas con relación a su actividad farmacológica, y por último se evalúa la seguridad. Para que las moléculas candidatas tengan éxito y puedan proseguir a etapas subsecuentes del desarrollo farmacéutico, deben poseer ciertas propiedades que las favorecen: notablemente, una adecuada solubilidad y actividad biológica, ser capaz de atravesar barreras, poseer estabilidad metabólica y mostrar un buen perfil de seguridad para administrarse en seres humanos (18).

Tabla 1. Estudios y criterios evaluados en la fase de investigación preclínica y sometidos a revisión ante las entidades regulatorias. Tomado de (19).

ESTUDIOS	CRITERIOS INVOLUCRADOS
Farmacodinámicos	Mecanismo de acción
Farmacocinéticos	Absorción, distribución, vida media, concentración máxima, excreción
Toxicológicos	Efectos en la reproducción, genotoxicidad, mutagenicidad y teratogenicidad

Cada fármaco debe tener su propio desarrollo preclínico. También se debe de tener

en cuenta el ámbito regulatorio y las guías particulares aplicables en cada país, por ejemplo, en México la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios), en EE UU la administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés FDA) y en países de la Unión Europea la Agencia Europea de Medicamentos (por sus siglas en inglés EMA) (20). La determinación de los parámetros farmacocinéticos implica comprender el impacto del metabolismo sobre los fármacos. Esto involucra el estudio de la liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos (LADME). En la fase preclínica son aspectos muy importantes, ya que la vía de entrada, la subsiguiente biodisponibilidad, así como la biotransformación metabólica influyen en la capacidad del fármaco para llegar al paciente en la forma biológica deseada.

La determinación de las propiedades LADME se encarga de identificar moléculas líderes potencialmente dañinas y así poder excluirlas de las primeras fases del desarrollo de fármacos. Por la complejidad estructural de las nuevas moléculas, es fundamental predecir el comportamiento completo LADME, así como las vías implicadas para su futuro desarrollo. En la etapa preclínica, las pruebas de biotransformación se llevan a cabo *in vivo* e *in vitro*. Los estudios *in vivo* se realizan en animales y se recopilan datos precisos de histopatología y la toxicología. La biotransformación de los fármacos es clave para determinar la eliminación y toxicidad en los seres humanos. El metabolismo es variable tanto en los órganos como en las patologías. Las alteraciones químicas, entre otras, incluyen la hidroxilación, reducción e hidrólisis, las reacciones son mediadas por proteínas expresadas en organismos específicos. La evaluación del metabolismo del fármaco en la fase preclínica es para resolver la estabilidad metabólica, la identificación y cuantificación de metabolitos primarios, determinar rutas metabólicas y medir la posible interacción entre fármacos (21,22).

En el desarrollo de nuevos fármacos es indispensable la experimentación en animales al igual que la modificación de la forma farmacéutica a lo largo de los estudios preclínicos. La traducción de la dosis equivalente animal (por sus siglas en inglés, AED) a humanos se calcula en función de la superficie corporal. Las propiedades de la farmacocinética humana se predicen considerando los datos que se obtienen en la

fase preclínica en animales. Se utiliza la exposición sistémica del fármaco (por sus siglas en inglés AUC) para la conversión del animal al humano. Del mismo modo, el aclaramiento en humanos (por sus siglas en inglés Cl_H) es predecible a partir de datos de aclaramiento de animales utilizando un escalado alométrico. La modelización de farmacocinética (por sus siglas en inglés PK)-farmacodinamia (por sus siglas en inglés PD) utilizando datos de animales es un enfoque que usa las matemáticas para simular una dosis-exposición en humanos. Las dosis humanas son estimadas en cuatro pasos, se establece una relación dosis-efecto para encontrar biomarcadores calculando parámetros farmacodinámicos como la dosis efectiva media (DE₅₀). Además, durante la investigación preclínica pueden identificarse variaciones en perfiles de concentración-respuesta para los efectos anticipados y adversos. Incluye también cambios en la distribución tisular, unión a proteínas tisulares y plasmáticas, así como unión a células sanguíneas y receptores diana.

Los parámetros farmacocinéticos en el ser humano se predicen durante este tipo de investigaciones considerando el aclaramiento, biodisponibilidad, así como los perfiles de concentración plasmática en función del tiempo. Una de las etapas más retadoras en este proceso es justamente integrar los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos en humanos para estimar relaciones dosis-respuesta, donde se simulan los perfiles dosis-exposición-respuesta-tiempo (23). También se pueden utilizar enfoques innovadores como microdosis y los estudios de dosis bajas farmacológicamente activas para la caracterización temprana de la farmacocinética y la farmacodinamia (24). Otro aspecto que se analiza muy detalladamente durante la investigación preclínica es la toxicología del candidato terapéutico. Detalles de la evaluación toxicológica se precisan en el punto 2.2.

2.1.3 Etapa de investigación clínica

Cuando el candidato terapéutico cumple con las pruebas farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas que se llevan a cabo en la fase preclínica, el patrocinador del estudio presenta en las agencias reguladoras, un expediente concerniente a los resultados de esta investigación que describa completa y

detalladamente los resultados obtenidos de los estudios preclínicos. Con el propósito de obtener la aprobación para llevar a cabo los ensayos clínicos del nuevo fármaco (25). Estos estudios permitirán por vez primera que el candidato terapéutico sea ensayado en seres humanos. De modo general, la investigación clínica implica varias fases conocidas como Fases I, II, III y IV.

Aunque no siempre se emplean existen también los estudios de fase 0, también conocidos como estudios exploratorios. Se consideran como parte de la fase clínica cuando la exposición humana es limitada y se llevan a cabo sin una intención terapéutica. Participan 10 pacientes a los cuales se les aplica una dosis subterapéutica, y duran aproximadamente una semana o menos. Se realizan para estudiar la farmacodinamia y farmacocinética y no sustituyen a la fase I. Su objetivo es perfilar aspectos de la fase I (26).

Los estudios de **fase I** son ensayos exploratorios en humanos, con el objetivo de evaluar tolerancia y seguridad de los nuevos fármacos en un pequeño grupo de personas, generalmente son voluntarios sanos, sin embargo, en áreas terapéuticas como el cáncer suelen ser pacientes. También se determina la dosis máxima tolerada (DMT). El nuevo fármaco es administrado en pequeñas dosis y posteriormente una dosis mayor, esto permite obtener datos preliminares de la farmacocinética como la concentración del fármaco, su absorción y metabolismo, así como conocer los efectos del fármaco en el cuerpo. Los ensayos en fase I determinan la dosis y frecuencia seguras, así como necesarias para obtener un efecto farmacológico deseado (27).

La **fase II** se lleva a cabo en pacientes con la enfermedad que se definió desde la investigación preclínica inicial. En esta fase el criterio de selección es muy estricto para los pacientes, ya que generalmente se excluyen sujetos con formas graves y atípicas de la enfermedad, también con enfermedades concomitantes o anormales. Tiene ventajas y desventajas, ya que el fármaco es probado en mejores condiciones demostrando un efecto farmacodinámico y una relación dosis-respuesta, sin embargo, los pacientes con la enfermedad anormal, grave o atípica suelen ser resistentes a la terapia. Por lo que en la fase II se determina el verdadero valor terapéutico del fármaco, por lo que en algunas ocasiones se les conoce como ensayos de prueba de concepto.

La fase II se centra en: a) demostrar que la actividad del fármaco es relevante a nivel farmacodinámico, b) elegir la frecuencia y dosis que se administra en la fase III, c) obtener los datos de seguridad y tolerabilidad. En ocasiones la fase II puede subdividirse en fase IIa y la fase IIb (28). Los ensayos de fase IIa y fase IIb suelen seguir siendo para identificar el rango de dosis eficaz, así como la evaluación de seguridad y eficacia. Son ensayos aleatorios, controlados con placebo, con estudios de terapia que complementa y pacientes con enfermedad de 2 años o más.

En la **fase III** se sigue determinando la eficacia del candidato, comparándolo con el placebo o con un tratamiento estándar. Se llevan a cabo ensayos aleatorios y controlados, para el diseño y análisis de ensayo se consideran estrategias adaptativas, así como bayesianas. Se vuelve a reclutar pacientes con 2 o más años de enfermedad, se debe detectar los efectos del tratamiento en base al tamaño de la muestra que se acumula en adultos y en pediatría. En cada grupo de edad se pre-especifica el tamaño de muestra para que se puedan garantizar conclusiones fiables (29).

2.2 LA TOXICOLOGÍA EN EL DESARROLLO FARMACÉUTICO

En el descubrimiento y optimización de fármacos se lleva a cabo pruebas de toxicología, ya que contribuyen a seleccionar un candidato a fármaco adecuado en términos toxicológicos, y así, proteger a los futuros voluntarios humanos (30). La toxicología constituye una piedra angular en el desarrollo farmacéutico preclínico para garantizar que los posibles efectos adversos de los candidatos en estudio sean mínimos y que sea mayor el beneficio que reciba el paciente. Consiste en una serie de bioensayos encaminados a poder identificar los eventos adversos con cierta seguridad antes de que sean un riesgo para la vida humana. El programa de desarrollo pre clínico toxicológico es muy amplio, ya que se puede llevar a cabo una evaluación multisistémica que incluya aspectos patológicos y fisiológicos en el animal, así como se puede centrar en identificar un potencial riesgo específico, un ejemplo pueden ser los estudios especializados de seguridad cardiovascular, renal, pulmonar (31).

Es importante conocer a profundidad las propiedades toxicológicas de los candidatos a fármacos en las pruebas no clínicas antes del uso en seres humanos, a través de estudios *in vivo*, *in vitro* e *in silico* que proporcionan una imagen amplia de los peligros y riesgos para que se pueda apoyar su administración segura. Los componentes críticos para evaluar el riesgo son: a) la identificación de un supuesto hallazgo adverso/toxicológico, b) la evaluación dosis-respuesta, severidad/incidencia, reversibilidad del hallazgo y su relación con la exposición al fármaco, c) la evaluación del riesgo relacionado con los hallazgos toxicológicos para la seguridad y, d) una última evaluación de relevancia de los hallazgos toxicológicos para la seguridad del ser humano.

Los modelos animales tienen beneficios para evaluar toxicidad, normalmente en especies de roedores y no roedores, ya que permiten identificar toxicidades únicas en órganos diana permitiendo el desarrollo de nuevas moléculas sin riesgo para los seres humanos. De estos estudios se obtienen las dosis iniciales seguras, rangos de dosis, así como exposición aceptable. Para ello, se desarrolla una estrategia específica y segura para los efectos adversos que son observados en animales, criterios de inclusión y exclusión para voluntarios sanos y pacientes. Los ensayos toxicológicos duran hasta la evaluación en humanos, ya que la toxicidad suele depender de la dosis y/o del tiempo (32).

2.2.1 Conceptos generales de toxicología

La toxicología es la ciencia encargada de estudiar las sustancias químicas, biológicas, así como las sustancias físicas capaces de producir alguna alteración patológica en seres vivos, estudiando los mecanismos de producción de estas alteraciones, así como los medios para contrarrestarlos, los procedimientos para detectar, identificar y determinar los agentes, para valorar y prevenir el riesgo que este representa (33).

Un tóxico es toda radiación física y agente biológico y químico, que tenga la capacidad de entrar en contacto, penetrar o ser absorbido en organismos vivos, en dosis suficiente para producir un efecto adverso directo o indirecto. Teniendo en cuenta lo anterior, cualquier sustancia puede ser un tóxico, tanto los productos exógenos como

los constituyentes del organismo producidos en exceso, los que, dependiendo de la dosis, pueden producir un trastorno tóxico. A dichos compuestos también se les denominan xenobióticos (33). 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 se modelarán posteriormente en los humanos.

En general, cuando un efecto tóxico no aparece en ninguna de dos especies animales, 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 (33). 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 (34).

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. Por ello, al aumentar la dosis se pueden incrementar los efectos observados. Parece ser que las diferencias inter-especie se deben fundamentalmente a variaciones toxicocinéticas y de biotransformación de los tóxicos. Sin embargo, cuando se administran grandes dosis, los mecanismos cinéticos se saturan y las diferencias tóxicas entre especies se acortan(34).

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 manifiestan también el hombre, y a la inversa. En general, las diferencias son más de tipo cuantitativo que cualitativo. Existe una correlación entre las dosis letales calculadas en animales y en el ser humano. 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 (34).

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 (34).

5º 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 (34,35).

En síntesis, los objetivos de la toxicología son, la investigación para el conocimiento de las propiedades tóxicas de sustancias químicas, así como la evaluación de riesgos que pueden llegar a causar los compuestos químicos a los seres vivos especialmente

al humano ante determinada exposición. De tales evaluaciones pueden emanar programas de educación para aconsejar a la población acerca de las sustancias tóxicas para que se puedan tomar las medidas necesarias y prevenir intoxicaciones. Es necesario aclarar que la toxicología es una ciencia multidisciplinaria por lo que integra diversas disciplinas como: bioquímica, química orgánica, biología celular, fisiología, patología, química analítica, inmunología o genética, entre otras (36).

2.2.2 Tipos de estudios toxicológicos

Estudios de dosis única

Se les conoce como estudios de toxicidad aguda donde se evalúa la toxicidad provocada por la administración en altas dosis de un fármaco sujeto a estudio. La idea es brindar información acerca de la toxicidad intrínseca del fármaco, así como del riesgo que conlleva su exposición aguda. En los estudios de toxicidad aguda era antiguamente necesario determinar la concentración letal media (CL_{50}). Sin embargo, debido a la importancia de utilizar métodos que aseguren el bienestar animal, no es ya un requisito en este tipo de investigaciones. De hecho, se considera que, si una sustancia no presenta toxicidad a una dosis de 2.000 mg/Kg, es poco tóxica y no vale la pena seguir utilizando más animales para evaluar una dosis superior. A partir de la información derivada de los estudios de dosis única se determinan los niveles de dosis que se emplearán en los estudios de toxicidad subagudos, subcrónicos y crónicos, además de que permite definir la curva dosis-efecto propia de la sustancia en estudio (37).

Estudios de dosis repetidas

Se llevan a cabo diseños establecidos y organizados donde la sustancia se administra repetidamente y cuya información se obtuvo de los estudios a dosis única, particularmente en lo referente al refinamiento de las observaciones, la selección de dosis, así como las determinaciones sobre el órgano diana. Dentro de los estudios de dosis repetida se incluyen diseños subagudos, subcrónicos y crónicos (36).

Estudios subagudos

En estos estudios se determinan los efectos tóxicos manifestados después de la

administración repetida de una sustancia durante un corto tiempo, normalmente de 14 a 30 días. Se tiene como objetivo obtener información para seleccionar los niveles de dosis para emplearse en estudios posteriores de mayor duración (36)

Estudios sub-crónicos

Se estudian los efectos adversos por toxicidad acumulada por la sustancia o por sus metabolitos, ya que el candidato a fármaco se administra durante un periodo que representa, aproximadamente, el 10% de la vida del animal. Se detectan los efectos adversos de la sustancia, y se obtiene la máxima dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con la droga (NOAEL), y la dosis máxima tolerada (DMT). Igualmente, se proporciona información sobre los órganos diana y constituye una base para seleccionar los niveles de dosis evaluados en los estudios crónicos (36).

Estudios crónicos

Se llevan a cabo para determinar el potencial toxicológico de una sustancia después de una prolongada y repetida administración. El tiempo que se administra varía entre especies. Ya que en roedores es entre 6 y 12 meses, mientras en no roedores de 9 y 12 meses, se considera un periodo suficiente para que se manifieste el efecto tóxico de una sustancia por su uso crónico. Se determina la relación dosis respuesta y NOAEL (36).

Estudios de toxicidad especial

Estudios de citotoxicidad en líneas celulares

Se trata de ensayos *in vitro* que detectan alteraciones de las funciones celulares, debido a que se expone a un compuesto que daña la célula. Los ensayos utilizan como modelos experimentales células, órganos aislados, cultivos primarios, líneas celulares y microorganismos (36).

Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la citotoxicidad tiene ciertas características principales: seguridad, simplicidad, economía, reproducibilidad, rapidez, eficiencia. Existen diferentes métodos para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad *in vitro*. El uso de colorantes como cristal violeta y sulforrodamina B, colorean componentes específicos de las células. Así también, los detectores de liberación de componentes

constitutivos celulares miden la actividad enzimática. Los métodos que miden la función metabólica usando sales de tetrazolio, siendo el más empleado la reducción metabólica de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Además, los métodos de resazurina (38).

Estudios genotoxicológicos

Se definen como pruebas *in vitro* e *in vivo* designadas a detectar compuestos que provocan daños genéticos, si los compuestos dan positivos en las pruebas tienen el potencial de ser carcinógenos y/o mutágenos en humanos. Es recomendable realizar una serie de pruebas estándar, ya que una prueba por sí sola no tiene la capacidad de detectar todos los mecanismos genotóxicos relevantes en la tumorigénesis. Una prueba de mutación genética en bacterias, siendo el ensayo de incorporación en placa con *Salmonella typhimurium* el más usado para el tamizaje de nuevas sustancias. Una prueba citogenética que se usa para daños cromosómicos en células de mamíferos es la prueba de aberración cromosómica en metafase *in vitro* o también una prueba de micronúcleos (MNT) *in vitro*. Una prueba *in vivo* de genotoxicidad, es la que se realiza para detectar el daño cromosómico en células hematopoyéticas de roedores, para micronúcleos y aberraciones cromosómicas en metafase. El ensayo de electroforesis alcalina en células Individuales tiene un alto potencial de detectar daños al ADN, ya que muestra las rupturas de cadena, así como los sitios frágiles al álcali en el ADN y su cuantificación al emigrar (37,39).

Toxicología de la fertilidad y la reproducción

En los estudios de reproducción a grandes rasgos, se evalúan tres fases. Se analizan los efectos sobre la fertilidad, así como las primeras fases de implantación de la embriogénesis. Estudios de teratogenicidad en los cuales se evalúan el efecto sobre el desarrollo de los órganos del feto. Estudios perinatales que analizan el efecto sobre el final de la gestación, el parto y la lactancia, así también se evalúa el comportamiento y el neurodesarrollo de la descendencia. Los estudios de fertilidad masculinos se realizan para todos los fármacos, mientras que los estudios de desarrollo y toxicidad reproductiva femenina se llevan a cabo para los fármacos que se utilizaran en mujeres fértiles (40).

Estudios de carcinogénesis

Se realizan para identificar un potencial de causar tumores en animales y así poder evaluar el riesgo relevante en humanos. Son necesarios para los productos farmacéuticos que su uso clínico previsto sea continuo por lo menos 6 meses o se utilicen frecuentemente de forma intermitente en el tratamiento de enfermedades crónicas o periódicas. Asimismo, se exigen para los productos con una causa significativa de riesgo carcinogénico. Es recomendable que en la elección de las especies para los estudios se considere la farmacología, la toxicocinética, el metabolismo, toxicología de dosis repetida, así como la vía de administración utilizada por el candidato terapéutico (40).

2.2.3 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. Surgieron como resultado de aplicar el principio de las tres “R” a la experimentación toxicológica animal. Estas tres “R” se relacionan con el reemplazo, refinamiento y reducción de los animales durante la experimentación. El reemplazo significa sustituir, siempre que sea posible los animales de experimentación por sistemas que no requieran seres vivos o bien emplear 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. El refinamiento por su parte incluye el uso de técnicas y procedimientos para disminuir el sufrimiento animal. 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 (41).

Existen varios organismos encargados de la validación de métodos alternativos. Entre ellos se destacan el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (por

sus siglas en inglés ECVAM), Comité Coordinador Interagencial de Validación de Métodos Alternativos (por sus siglas en inglés ICCVAM), Sociedad Japonesa de Alternativas a los Experimentos con Animales (por sus siglas en inglés JSAAE) y más recientemente, Centro Coreano para la Validación de Métodos Alternativos (por sus siglas en inglés KoCVAM) y el Centro Brasileño de Validación de Métodos Alternativos (por sus siglas en inglés 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 (42).

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. La tabla 2 muestra los métodos alternativos internacionalmente aceptados para medir la toxicidad aguda por vía oral.

Tabla 2. Métodos alternativos aceptados internacionalmente para medir la toxicidad aguda por vía oral. Tomado de (43).

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)

2.2.4 Características de los estudios de toxicidad oral aguda por el método de clases de toxicidad

Los estudios de toxicidad oral aguda por el método de clases de toxicidad se describen en la directriz 423 de la OCDE. Constituyen una segunda alternativa a la prueba de DL₅₀ oral, considerándose una prueba de toxicología alternativa ya que reduce significativamente el número de animales de experimentación.

Durante esta prueba, no se administran sustancias de ensayo con dosis que se saben

causa dolor y angustia por su acción corrosiva. Se utilizan dosis predeterminadas y con los resultados se clasifica una sustancia según el Sistema de Clasificación Globalmente Armonizado (por sus siglas en inglés GHS) de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (Figura 4). El método mejora la posibilidad de que los reportes toxicológicos tengan coherencia y repetitividad. Se determina un valor de DL₅₀ cuando por lo menos dos dosis provocan una mortalidad que supera al 0% e inferior al 100% (44).

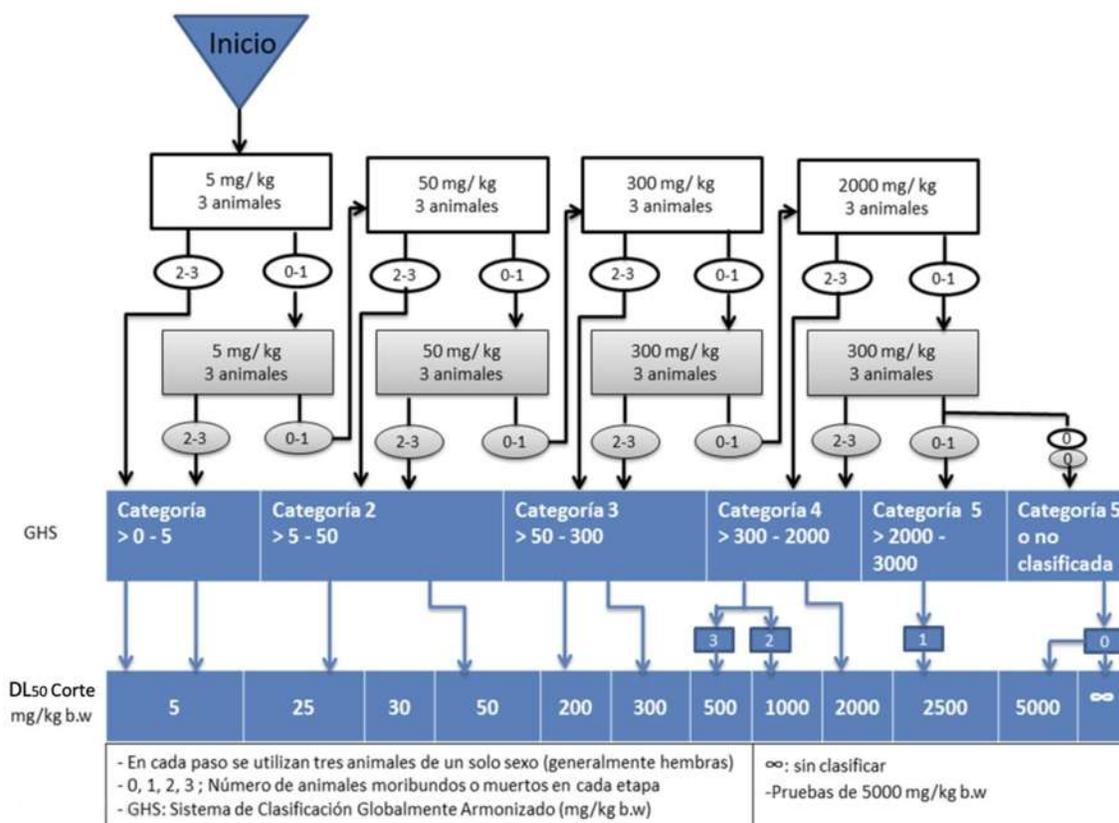


Figura 4. Sistema de clasificación GHS, prueba con dosis inicial de 5 mg/kg de peso corporal. Tomado de (40).

El método de clases de toxicidad establece un procedimiento secuencial (Tabla 3). La sustancia se administra por vía oral con una dosis establecida, se utilizan en cada paso tres animales del mismo sexo normalmente son hembras y la especie de roedor utilizada más frecuentemente es la rata. Como dosis inicial se selecciona uno de los cuatro niveles fijos 5, 50, 300 y 2.000 mg/kg de peso corporal. La dosis inicial debe

tener más probabilidad de producir mortalidad en los animales dosificados. El resultado de ausencia o presencia de mortalidad determinara el siguiente paso, que se enmarca en las siguientes posibilidades: a) no se necesita realizar otra prueba; b) se requiere dosificar tres animales adicionales, con la misma dosis; c) se necesita dosificar tres animales adicionales ya sea con el siguiente nivel de dosis más alto o bajo. En esta prueba la relación dosis-respuesta sigue una distribución normal. El método fue adoptado en 1996, así como validado *in vitro* comparando datos de DL₅₀ que se obtuvieron de la literatura a nivel nacional e internacional (44,45).

Tabla 3. Comparación de la prueba de toxicidad oral aguda por el método de clases de toxicidad (método ATC) y la prueba DL₅₀ (Enero de 2000- Diciembre 2003). Modificado de (45).

PRUEBA	NÚMERO DE ANIMALES POR PRUEBA	NÚMERO DE ANIMALES MUERTOS/ MORIBUNDOS POR PRUEBA
Prueba límite		
ATC	6	0.04
DL ₅₀	11.5	0.29
Prueba completa (ATC)	10.5	2.40
DL ₅₀	35.8	15.50

2.3 CARACTERÍSTICAS Y BIOACTIVIDAD DEL ÁCIDO ELÁGICO Y ELAGITANINOS

El ácido elágico (AE) es un compuesto polifenólico natural, perteneciente al grupo de los ácidos fenólicos que puede encontrarse libremente en la naturaleza o bien formando parte de taninos hidrolizables llamados elagitaninos (ETs), los que son abundantes en frutas, frutos secos y semillas como en frambuesas, fresas, uvas, mango, guayaba, nueces, almendras y té verde (46). A continuación, se detallan las características fisicoquímicas y la reactividad de este ácido y de los elagitaninos.

2.3.1 Características fisicoquímicas del ácido elágico

El AE (2, 3, 7, 8-tetrahydroxy [1]-benzopyranol [5, 4,3-cde] benzopirano-5,10-diona)

fue descubierto en 1831 por Braconnot. La molécula es altamente termoestable con un punto de fusión de 350 °C y un peso molecular de 302.2 g/mol. Es soluble en hidróxido de potasio (KOH), ligeramente soluble en agua (9.5 kg/ml), moderadamente en alcohol y a altas concentraciones en etanol (80%). Dada su naturaleza ácida es más soluble en disolventes básicos. La estructura presenta cuatro anillos representando el dominio lipofílico, cuatro grupos fenólicos y dos lactonas, formando enlaces de hidrógeno laterales que actúan como aceptores de electrones respectivamente, representando el dominio hidrofílico (Figura 5) (46,47). En la naturaleza es frecuente encontrar al AE formando parte de los elagitaninos.

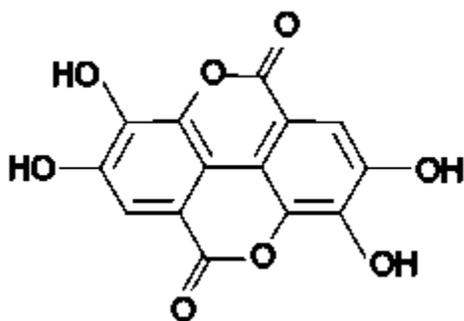


Figura 5. Estructura química del AE.

2.3.2 El ácido elágico y la formación de elagitaninos

El término elagitaninos (ETs) proviene de las observaciones relacionadas con el hecho de que su hidrólisis habitualmente origina al AE. Se trata de ésteres del ácido elágico y pertenecen al grupo de los llamados taninos hidrolizables. Tienen en su estructura una molécula de azúcar, normalmente glucosa, a la que se unen varias moléculas de AE. Estructuralmente están caracterizados por una o más unidades de ácido hexahidroxidifenico conocido por las siglas HHDP, estas unidades se encuentran esterificadas a un azúcar, principalmente glucosa y existen diferentes posibilidades para este acoplamiento, lo cual genera una gran variabilidad estructural en los ETs (48).

Existe una serie de ETs monoméricos, donde los grupos HHDP se metabolizan en los otros grupos aromáticos por modificaciones estructurales ya sea por oxidación, reducción, la escisión del anillo y el acoplamiento oxidativo C-O (49). La biosíntesis de los ETs comienza cuando una glucosa forma un complejo con el ácido gálico para formar la β -Glucogalina, siendo el galato de glucosilo más simple que sirve principalmente para donar unidades de galloilo en la biosíntesis de β -D-glucopirano totalmente galloilado (3, β -PGG), considerada el punto de ramificación más representativo que conduce a la formación de los elagitaninos (Figura 6) (50).

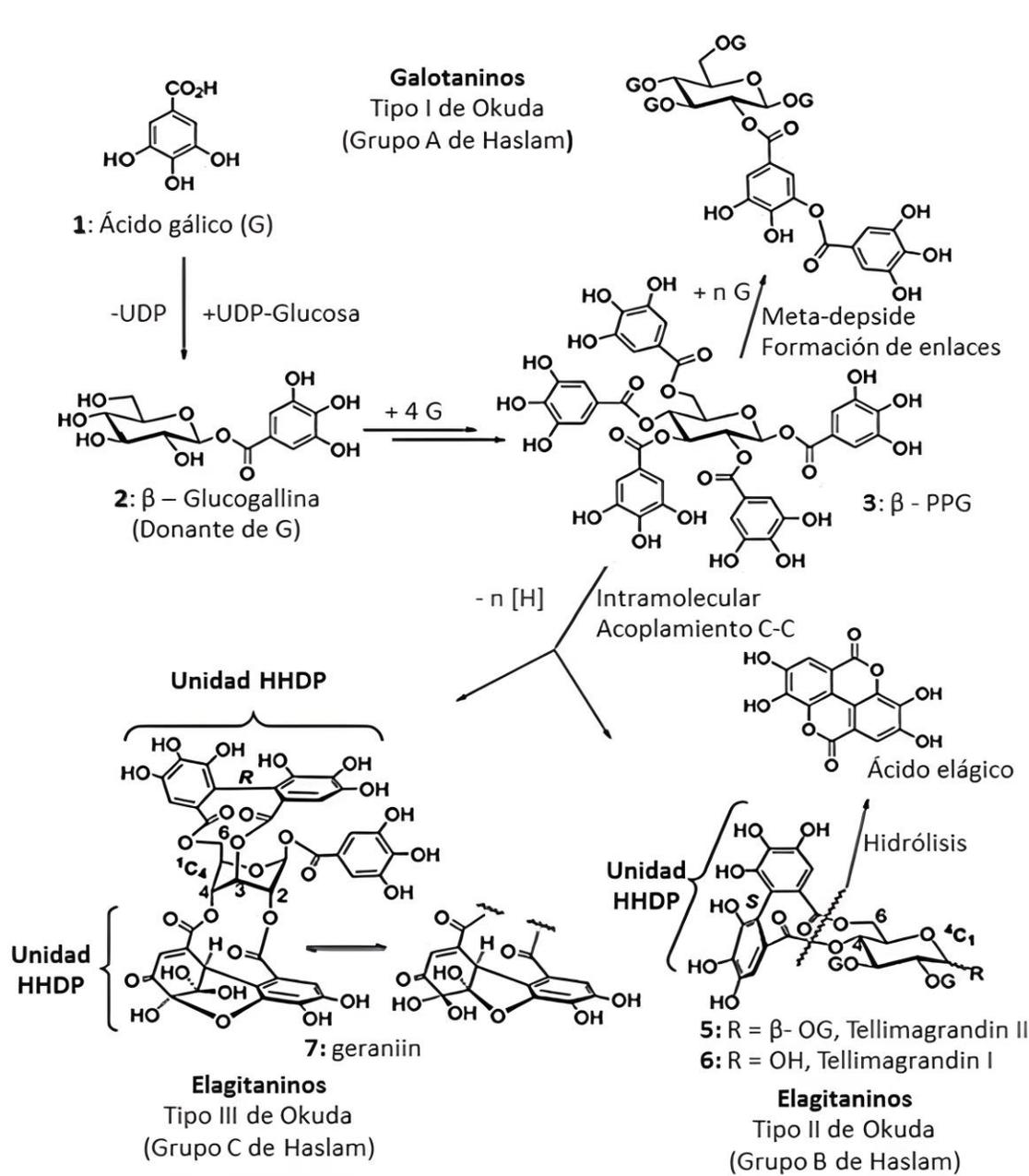


Figura 6. Vía biosintética general de los elagitaninos. Tomado de (50)

2.3.3 Carácter antioxidante del ácido elágico

Tanto el AE como los ETs son reconocidos por sus propiedades antioxidantes. El mecanismo antioxidante y antienvjecimiento se basa principalmente en la capacidad de contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), subproductos del metabolismo aeróbico fisiológico. Estas especies normalmente se

mantienen estables dado a que el organismo está equipado de defensas antioxidantes celulares. Además, a concentraciones fisiológicas, participan en los sistemas de reparación, producción de energía, señalización intracelular, y defensa inmunitaria. Cuando se produce un exceso y así una acumulación de las especies reactivas, los sistemas de mantenimiento de las células fallan, y se genera estrés oxidativo e inflamación, provocando daños irreversibles en proteínas, lípidos y ADN, por lo que aparecen trastornos degenerativos y aceleración del envejecimiento (51).

Los ETs y el AE son antioxidantes debido en gran parte por su estructura química. Ya que presenta varias funciones hidroxilo en posición orto por lo que pueden donar un átomo de hidrógeno para completar la capa electrónica del electrón no apareado característico de los radicales. Igualmente, deben su eficacia antioxidante a su grado de hidroxilación que, en presencia de una fracción de azúcar disminuye (52).

A pH fisiológico el AE en solución acuosa puede inactivar radicales hidroxilo (HO⁻), radicales peroxilo (ROO⁻), dióxido de nitrógeno (NO₂⁻), así como el peroxinitrilo (ONOO⁻). Estudios *in vitro* han demostrado que el AE tiene más capacidad de captar especies reactivas de oxígeno que de nitrógeno. El AE tiene además la capacidad de quelar metales iónicos como el hierro, cobre, níquel y cadmio que son una fuente potencial de estrés oxidativo. En un estudio con ratas Wistar hembras que consumieron AE (500 μmol/kg de peso corporal), se demostró que este ácido fenólico las protegió del estrés oxidativo provocado por cadmio en hígado y riñón, así como también se demostró la capacidad del AE de unirse al hierro comprobando la presencia del grupo catecol como responsable de la quelación del hierro (Figura 7) (53,54).

En piel, la radiación UV, sobre todo la UV-B, provocan fotoenvejecimiento debido a la exposición continua a la radiación lo que resulta en fotooxidación, alterando el estado antioxidante de las células cutáneas, aumentando los niveles de ROS que implica la producción de metaloproteínas de la matriz (MMP) capaces de degradar la matriz extracelular provocando daños en la piel. El AE elimina la formación de ROS, del melondialdehído, el daño al ADN y la apoptosis, potenciando la expresión de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y hemo-oxigenasa-1. Además, este compuesto inhibe las cascadas de inflamación provocadas por la radiación UV-B reduciendo la

producción de mediadores proinflamatorios como la interleucina (IL)- 1 β , IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral α , potenciando la generación de IL-10 que funciona como un antiinflamatorio en queratinocitos. De acuerdo con estudios realizados en células de fibroblastos dérmicos expuestos a radiación UV-B, el AE suprime los ROS, la secreción y producción de pro-MMP-2 a niveles intracelulares, favoreciendo los niveles del glutatión total (GSH) y la actividad de SOD. Igualmente, esta molécula tiene actividad reguladora de Nrf2 que se reduce por la UV-B (55).

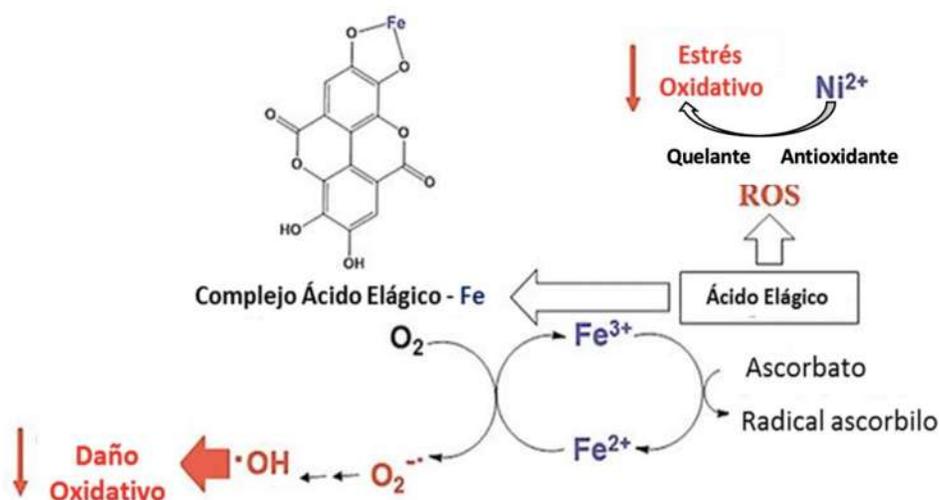


Figura 7. Actividad antioxidante del AE por quelación del ión ferroso y capacidad reductora del ión férrico. Tomado de (56).

2.3.4 Otras actividades farmacológicas del ácido elágico

La literatura señala que además de las propiedades antioxidantes, el ácido elágico presenta efectos antiangiogénicos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antiobesidad, antioxidante, antitrombóticos, antineurodegenerativos (57), antimicrobianos y antivirales (47). Tanto el AE como los elagitaninos demuestran *in vitro* que podrían prevenir enfermedades crónicas como la diabetes o el cáncer, enfermedades cardiovasculares, así como enfermedades neurodegenerativas. No obstante, el AE considera como el fragmento bioactivo contenido en los ETs (46). Al parecer los efectos positivos se deben a una acción pleiotrópica. Numerosas son las acciones

farmacológicas del AE, algunas de las cuales se enumeran a continuación (Figura 8).

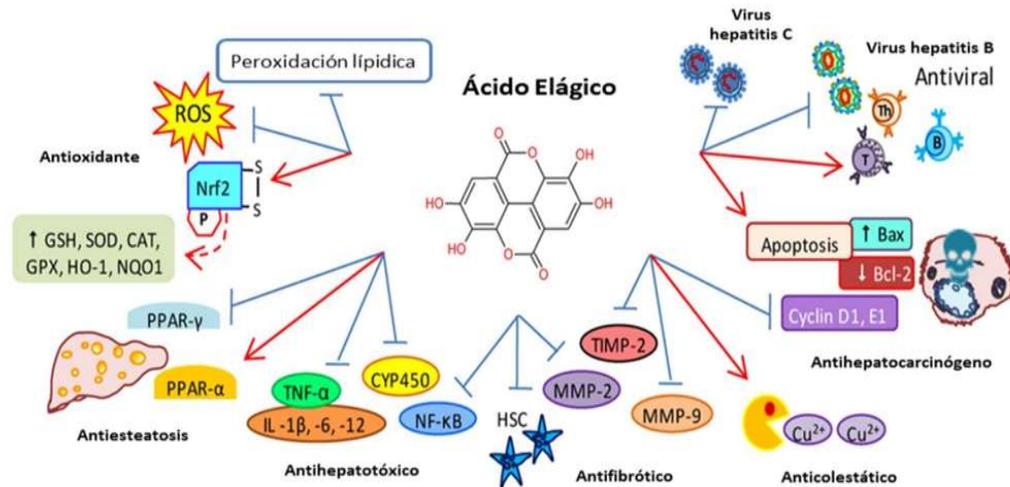


Figura 8. Bioactividad de AE. Tomado de (46).

Propiedades antiinflamatorias

Se sabe del desempeño importante que tienen tanto el AE y los ETs como potenciales agentes antiinflamatorios, ya que tienen capacidad para modular los mediadores inflamatorios en la inflamación crónica, aspecto que podría ser interesante para el tratamiento de enfermedades que cursan con este tipo de inflamación, como la alergia, el asma etc. Las evidencias proceden casi todas de estudios preclínicos. El uso terapéutico de AE en ratones BALB/c (10 mg/kg) frente a la respuesta inflamatoria alérgica de las vías respiratorias demostró que los niveles totales de leucocitos y eosinófilos redujeron en el líquido de lavado broncoalveolar, lo que provocó una rápida reducción de la inflamación de las vías respiratorias. El mecanismo implica la reducción de actividad de la peroxidasa de eosinófilos, niveles de IL-5, así como la expresión de la P-selectina. Mientras en otros estudios *in vivo* se demostró que la suplementación con AE (10, 50, y 100 mg/kg) inhibe la liberación de histidina, TNF- α e IL-6 en mastocitos de rata macho Sprague-Dawley dependiendo de la concentración. Asimismo, los autores asocian la reducción de la secreción de marcadores inflamatorios con menor actividad de NF- κ B y el incremento del contenido de calcio en mastocitos (58).

Propiedades antiobesogénicas

El extracto de granada es reconocido por su alto contenido de AE. Este extracto tiene un efecto sobre el balance energético semejante al orlistat como fármaco estándar para la obesidad, mediado por el AE que disminuyó la hiperlipidemia inhibiendo la actividad de la lipasa pancreática *in vitro*, así como el incremento de la excreción fecal de grasa. Otros estudios realizados en preadipocitos 3T3-L1 demostraron que el AE suprime la diferenciación terminal y acumulación de lípidos en los adipocitos 3T3-L1, probablemente mediante la reducción en la expresión de la proteína cíclica A, así como la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y el bloqueo de transición de fase G1 a S en el ciclo celular. Asimismo, se demostró que el AE inhibe la adipogénesis a través de modificación de la remodelación de la cromatina en células madre adipogénicas humanas (hASCs). Del mismo modo, se demostró la inhibición considerable de la histona deacetilasa (HDAC) y el efecto inhibitorio sobre la actividad de la arginina metiltransferasa 1 (CARM) durante la adipogénesis (47) promovido por el EA.

Propiedades anticancerígenas

Se han realizado diversos estudios que demuestran el efecto anticancerígeno del AE en líneas celulares de cáncer humano, siendo algunas las de cáncer de piel, esófago y colon, la mayoría se atribuyen a sus propiedades antiproliferativas, así como a su capacidad de provocar la detención del ciclo celular. El AE induce la apoptosis mediante una vía mitocondrial en un modelo celular *in vitro* del cáncer de colon, sin afectar las células normales del colon. También se demostró que podía inducir la apoptosis en el carcinoma de colon inducida por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (59).

Efectos cardiovasculares

Estudios han demostrado que el tratamiento con AE provoca la disminución de la presión arterial, mejora la relajación vascular, y posee efectos antiproliferativos en células musculares lisas, y en arterias de ratas hipertensas donde se observa una reducción de la calcificación vascular. Un adiconado con AE en dosis (10 y 30 mg/kg/día) disminuye la elevación que mantiene la presión arterial. Asimismo, el AE es capaz de reducir la taquicardia, considerada un factor común en la hipertensión. El estrés oxidativo se encuentra relacionado con la hipertensión ya que desempeña un papel en su patogénesis. Se ha postulado que el AE posee una alta capacidad

antioxidante, ya que aumenta la biodisponibilidad del NO, disminuyendo la hipertensión, ya que aumenta la relación nitrito/nitrato en la sangre (60).

Actividad antimicrobiana

Una de las actividades más estudiadas del AE es justamente la acción antimicrobiana. Se ha reportado que esta molécula posee actividad inhibitoria frente a *Aeromonas*, *Alcaligenesis*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Photobacterium* y *Chromobacterium*, así como diversas cepas de *Escherichia coli*. Probablemente su actividad antimicrobiana se debe con su capacidad de inactivar enzimas, proteínas de transporte, adhesiones microbianas, así como complejos con polisacáridos (61).

2.3.5 Biotransformación de los elagitaninos y el ácido elágico por vía oral

Los ETs carecen de biodisponibilidad como tal, ya que no ha sido posible detectarlos en plasma humano tras la ingesta normal de alimentos ricos en ETs. Su comportamiento farmacocinético probablemente se debe al tamaño de las moléculas, a su polaridad relativamente elevada y la presencia de enlaces C–C. Durante su ingesta, los ETs pueden unirse a proteínas en la saliva causando astringencia y evitando su metabolismo. Además, algunos ETs resisten a la hidrólisis ácida y básica en el tracto gastrointestinal pudiendo llegar prácticamente intactos al intestino grueso. No obstante, existen ETs sensibles a la hidrólisis ácida y básica, que liberan AE en el estómago y duodeno con poca biodisponibilidad (62). Las concentraciones bajas de AE en plasma se deben probablemente a su baja solubilidad en agua, a la capacidad de formar complejos con iones de calcio y magnesio, afectando la absorción transcelular. Además, el AE se une de forma irreversible al ADN y proteínas celulares. Sin embargo, algunos autores detectaron AE entre 0.5 y 3h en plasma luego de la administración oral con dosis que contenía 24 mg de AE y 318 mg de ETs, sin que se detectaran ETs intactos (63,64). Por consiguiente, la presencia de AE libre en plasma humano puede deberse a su liberación a partir de la hidrólisis de ETs, favorecida por la microbiota intestinal, así como el pH fisiológico (52). Se cree que los sitios de absorción del AE libre en la circulación son el estómago o el intestino delgado. Una pequeña parte de AE libre procedente de la dieta es absorbida en el estómago, mientras que los ETs son resistentes a la degradación en el estómago. Los metabolitos

más importantes del AE son las urolitinas (Figura 9) procedentes del metabolismo bacteriano del AE y los ETs no absorbidos, la reducción de dos grupos lactona, descarboxilación y deshidroxilación secundaria implicando una reducción.

En estudios experimentales se han constatado cantidades considerables de urolitina D (tetrahidroxi), urolitina C (trihidro) y urolinas A (dihidroxi e isourolitina A) en el yeyuno. Consecuentemente, la formación de urolitinas parece tener lugar en el intestino delgado donde las bacterias son capaces de metabolizar los ETs en una variedad de metabolitos. Debido a que la urolitina B no es detectada en el intestino delgado, se sugiere que el metabolismo bacteriano continúa en el colon y finaliza formando urolitina B (monohidroxi dibenzopiranosona) como producto final (65–68). El proceso de absorción del AE es mediante la difusión pasiva a través de un gradiente de concentración. Sin embargo, aunque no se han identificado los transportadores específicos para la absorción de AE a lo largo del epitelio intestinal (68).

Tanto los metabolitos urinarios del AE como las urolitinas surgen de la biotransformación del AE. Tras la absorción, en el hígado los metabolitos experimentan otras transformaciones conjugadas con glucurónidos y/o sulfatos, que generan combinaciones complejas de metabolitos secretados en la bilis, que se encuentran en el plasma y se excretan en la orina (69,70). Las urolitinas tienen una tasa de absorción más alta que la del AE, probablemente debido al aumento de su lipofilia. Por lo tanto, las urolitinas están en la circulación en concentraciones elevadas y durante más tiempo por la circulación enterohepática (70–72). Un aspecto interesante de estos metabolitos es que pueden ejercer efectos sistémicos ya que su excreción persiste en orina durante varios días de 24-48 horas. Estudios realizados con cerdos ibéricos, indicaron que los metabolitos principales detectados en plasma y orina son los glucurónidos de urolitina A y B, demostrando así que sólo los que se metabolizan lo suficiente se excretan en la orina. En cambio, los metabolitos urolitina D (tetrahidroxi) y urolitina C (trihidroxi) se absorben antes en el intestino, sufren circulación enterohepática por lo que no entran al plasma periférico ni a la orina hasta que el metabolismo reduzca el número de hidroxilos fenólicos. Por su parte, el metabolismo de la urolitina B es el último producto de degradación en el metabolismo del AE por la flora intestinal, ya que ocurre en las células intestinales justo después de la absorción,

explicando la falta de urolitina B en la bilis, ya que esta molécula sólo se conjuga una vez. Mientras que la urolitina A puede producir más conjugaciones, siendo el principal metabolito de los ETs detectado en heces (73).

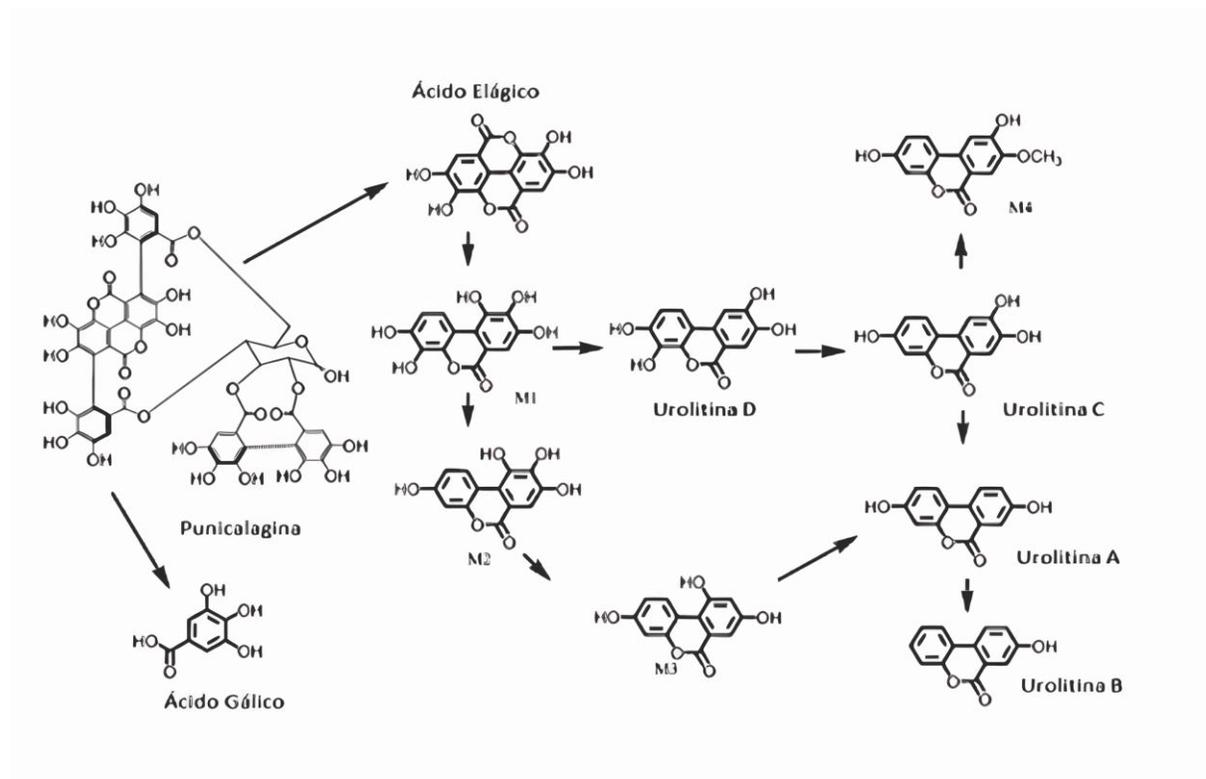


Figura 9. Vía de transformación de las urolitinas mediante bacterias intestinales. Tomado de (65).

Las urolitinas se encuentran presentes a concentraciones elevadas en la vesícula biliar así como en la vejiga y el intestino grueso. No obstante, los metabolitos no se encuentran en cantidades relevantes en tejido muscular, corazón, adiposo, riñón o hígado. Se reportó la disponibilidad de urolitinas como agliconas en el colon, y como derivados conjugado con sulfatos y ácido glucurónico, en plasma, bilis y orina. Sin embargo, las concentraciones de los metabolitos se mantienen bajas mientras están siendo transportadas al plasma (74).

Estudios farmacocinéticos y de distribución tisular del AE en ratas Sprague-Dawle por administración oral (50 mg/kg), reportaron una concentración máxima (C_{max}) en plasma

de 93.6 ng/mL (0.31 μ M). Su absorción fue 45.2 ng/mL x h, por consiguiente la absorción de AE fue muy deficiente. Mientras que los valores de t_{max} , $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ fueron 0.5 h, 2.5 h y 6.86 h, respectivamente, indicando que el AE entró en circulación general de forma rápida, distribuyéndose posteriormente desde la circulación general velozmente a los compartimentos periféricos, para finalizar eliminándose o metabolizándose de manera moderadamente lenta (75).

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, desde el punto de vista farmacocinético, se ha descrito un sistema bicompartimental con una escasa absorción, rápida eliminación, que se atribuye a la baja solubilidad del AE. Considerando que la primera absorción ocurre en el estómago, así como en el intestino delgado, con un t_{max} corto, que conduce a su rápida eliminación, por el metabolismo de primer paso, así como una recirculación enterohepática débil (68). En un estudio cruzado realizado en humanos que consumieron 130 mg de punicalagina y 524 mg de AE libre o 279 mg de punicalagina más 25 mg de AE libre; se demostró que la aparición, así como el aclaramiento de AE en plasma resulta en gran parte de la disposición del AE libre, sin embargo, una dosis muy elevada no asegura una mejor biodisponibilidad, ya que parece ser un proceso saturable, asimismo se mencionó que la saturación de la absorción ocurre en el intestino delgado (76).

Media hora después de la administración oral de AE, las concentraciones alcanzan su punto máximo en el hígado siendo tres veces mayor la concentración máxima en plasma. Mientras que en el riñón las concentraciones son moderadas y en tejidos del corazón, pulmón y cerebro son bajos. Después de 4 h de la administración oral, se observa una concentración comparativamente alta de AE en el hígado y riñón, por otra parte, en el corazón, pulmón y cerebro las concentraciones siguieron bajas (75). La capacidad de los individuos para metabolizar el AE en urolitinas depende principalmente de la edad ya que la edad conlleva a una disminución progresiva de urolitina A, con un incremento de isourolitina A y/o urolitina B hasta los 30-40 años, a partir de lo cual la distribución de las urolitinas permanece relativamente constante (77).

2.3.6 Contenido de ácido elágico en suplementos nutricionales, tés, alimentos y plantas medicinales

Contenido en suplementos nutricionales

En los últimos años el ácido elágico se ha comercializado como suplemento con supuestas propiedades contra el cáncer, así como enfermedades cardíacas. Por esta razón, se han recibido advertencias por parte de las autoridades correspondientes en materia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA) (78). Asimismo las investigaciones respecto a la seguridad y eficacia de los suplementos herbolarios que están adicionados con AE, son escasas (79). De acuerdo con estudios realizados se sugirió que la suplementación dietética de AE (10 mg/kg/día) aporta en un efecto beneficioso en un modelo de colitis experimental contemplándose para una estrategia terapéutica, mejorando la enfermedad inflamatoria intestinal (80).

Contenido en tés

El té, se elabora a base de hojas la *Camellia sinensis* L., la estricnina presente en el té consiste en un HHDP una glucosa y un residuo de galloilado. Se detectó ETs en las hojas de *C. sinensis*, y en algunos productos de té, como té negro, verde, oolong, blanco y pu-erh (75).

Contenido en alimentos

El ácido elágico es abundante en el reino de las plantas, ya sea libre o como parte de la estructura molecular de los elagitaninos. Los ETs están distribuidos en frutas, verduras, en las especies *Quercus*, así como también en bebidas como el té verde o el vino (81). El AE es abundante en los hollejos de uva muscadine (82), así como también en las granadas (fruto, jugo y mermelada) donde hay una presencia significativa de ácido elágico y punicalagina (83). En la tabla 4 se pueden observar algunos alimentos que contienen AE.

Tabla 4. Algunos alimentos que contienen AE.

Alimentos	Contenidos de ácido elágico	Referencia
Frambuesa (<i>Rubus idaeus</i> L, <i>Rosaceae</i>)	Frambuesas amarillas 900 mg/100 g (PF) Frambuesas silvestres 270 mg/100 g (PF)	(53)
Fresa (<i>Fregaria vesca</i> L.)	68.6 mg/100 g (PF) Mermelada de fresa 23,8 mg/100 g (PF)	(84)
Granada (<i>Punica granatum</i> L)	Cáscara 50 mg/100 g (PF) Jugo 38 mg/100 ml	(85)
Zarzamoras (<i>Rubus ursinus</i> Cham & Schldl)	1500 ±100 mg/100 g	(86)
Arándanos (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	120 ± 4 mg/100 g	(86)
Uva (<i>Vitis rotundifolia</i> Michx.)	Piel 16.5 mg/100 g (PF) Hojas 67.7 mg/100 g (PF)	(82)
Mango (<i>Mangifera indica</i> L. cv. Keitt)	120 mg/100 g	(87)
Zarza ártica (<i>Rubus arcticum</i> L.)	390 mg/100 g	(88)
Nuez		
Nuez de pecán (<i>Carya illinoensis</i> ; (<i>Wangenh.</i>) K.Koch.)	330 ± 0.3 mg/100 g	(86)
Nuez negra (<i>Juglans nigra</i> L.)	590 ± 1 mg/100 g	(86)
Bebidas		
Té verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Hojas del té verde (<i>Camellia sinensis</i>) 75 mg/100 g (PF)	(89)
Whisky	1.2 mg/L	(90)
Vino rojo	1.5 mg/100 mL	(91)
Vino tinto envejecido en roble	9,4 mg/mL	(90)
Coñac	31-55 mg/ L	(52)

PF:Peso Fresco

Contenido en plantas medicinales

El ácido elágico, así como elagitaninos suelen ser metabolitos secundarios en muchas plantas medicinales, sin embargo, su forma libre está presente en concentraciones relativamente bajas. El EA se presenta generalmente en forma de glucósidos, conjugadas con una unidad de sacarosa, arabinosa, ramnosa, también como

derivados complejos de los elagitaninos (51).

2.3.7 Estudios toxicológicos reportados con ácido elágico.

Los estudios toxicológicos realizados con AE muestran generalmente resultados contradictorios. En un estudio se analizó la toxicidad oral aguda de cuatro flavonoides (ácido boswélico, ácido elágico, quercetina y rutina) en ratas Wistar albinas (170-200 g). Los animales que recibieron AE, así como los otros flavonoides no presentaron cambio alguno en los patrones de comportamiento. Asimismo, no se observó una diferencia significativa en los pesos corporales y el consumo de alimentos comparado con el grupo tratado con vehículo, así como tampoco se encontró evidencia de cambios patológicos. Por lo que se llegó a la conclusión que los flavonoides analizados (ácido boswélico, ácido elágico, quercetina y rutina) no generaron toxicidad a la dosis de 2000 mg/Kg (92).

En el siguiente estudio se analizó el perfil de toxicidad aguda y subaguda de los extractos etanólicos de *Punica granatum* (LINN), la fruta entera, semillas y ácido elágico sintético. Para ello se utilizaron ratas albinas suizas a las cuales se les administró por vía oral una dosis de 2000 mg/Kg. La DL₅₀ resultó ser superior a 2000 mg/Kg y no se observaron alteraciones de comportamiento, ni mortalidad en los grupos estudiados. Tampoco se verificaron alteraciones significativas ($P > 0.05$) en ganancia del peso corporal, la ingesta de alimentos y agua en los animales tratados. Del mismo modo, no se comprobaron alteraciones significativas ($P > 0.05$) en los parámetros hematológicos y bioquímicos comparando el grupo tratado con el control. En el análisis histopatológico del hígado y el riñón no se observó ningún daño celular, tanto en la evaluación de la toxicidad aguda como la subaguda (93). Este estudio coincide con el realizado por Tasaki M et al, (2008) los que evaluaron la toxicidad subcrónica del ácido elágico en ratas F344 estimando que el nivel de efecto no observado (NOEL) para machos fue de 3011 mg/Kg, mientras que para las hembras este valor correspondió a 3254 mg/Kg respectivamente (94). Sin embargo, niveles de dosis mucho más bajos por vía oral de AE (6 mg/kg) generan un marcado aumento en el nivel plasmático de prostaglandina E₂ en ratas Sprague-Dawley al activar a la ciclooxigenasas, lo que

implica que el AE podría funcionar como un agente proinflamatorio (95).

En los últimos años los investigadores han supuesto que son las urolitinas y no el ácido elálgico, las moléculas bioactivas responsables de los beneficios y la toxicidad provenientes de los elagitaninos y alimentos ricos en ácido elálgico. La hipótesis surge con los hallazgos *in vitro* los cuales demostraron actividad tanto el AE como las urolitinas. Además, en los estudios *in vivo* solamente las urolitinas son las moléculas predominantes en los fluidos biológicos, células y tejidos por lo tanto se les atribuyen los mayores efectos relacionados al AE. Sin embargo, las urolitinas son moléculas que poseen un doble efecto, pueden ser beneficiosas, pero su actividad depende significativamente de su estructura, condición ambiental, edad y estado de salud de los individuos (51). Tanto la cantidad como la tipología de las urolitinas están ampliamente relacionadas con la actividad metabólica de la microbiota, caracterizada por su gran heterogeneidad interindividual. La variabilidad entre sujetos, la absorción, concentración sanguínea y tisular, son variables impredecibles, conduciendo a múltiples respuestas biológicas que, paradójicamente, podrían provocar efectos adversos (51). En 2017 se realizaron estudios de la urolitina A, evaluándose por primera vez la genotoxicidad, toxicocinética y la seguridad de su dosis repetidas. Durante el estudio de 28 días se administró 0, 0.175, 2.5 y 5.0% de urolitina A mezclada en la dieta. No se observaron en los resultados obtenidos alteraciones en los parámetros clínicos, química sanguínea, citometría hemática, ni tampoco ningún órgano diana mostró un mecanismo tóxico específico. La NOAEL fue la dosis más alta probada, 5% en machos 3451 mg/Kg y en hembras 3826 mg/Kg, esto considerando una administración repetida oral de 90 días (96).

En estudios realizados con individuos obesos, pudo constatarse la producción de isourolitina A y/o urolitina B más la urolitina A. Estos pacientes se encontraban en riesgo de complicaciones cardiovasculares en comparación con los que solo producían urolitina A o lo que no generaban urolitinas. También se pudo demostrar que los efectos positivos de las urolitinas pueden quedar ensombrecidos debido a los efectos secundarios negativos de la iso-urolitina A y la urolitina B generando como consecuencia del metabolismo en ciertos individuos (97). Estos resultados sugieren la presencia de un efecto personalizado de los alimentos que contienen elagitaninos y

ácido elálgico lo que podría explicar sus controvertidas acciones hacia la salud.

Tanto la urolitina A como la B son potentes antioxidantes en el ensayo ORAC, mientras que en ensayos basados en células se comportan como fuertes pro-oxidantes, lo que explicaría sus efectos tóxicos asociados al consumo por vía oral (98). De acuerdo con un estudio realizado en células epiteliales se comprobó que el AE a 5 µg/mL son suficientes para incrementar la toxicidad de compuestos como el benzopireno en células bronquiales (99).

Los resultados toxicológicos contradictorios utilizando al AE en modelos animales y humanos abren una oportunidad para el análisis detallado de la toxicidad por vía oral de este compuesto. Lo anterior considerando su importante presencia en suplementos nutricionales, tés, alimentos y plantas medicinales.

III JUSTIFICACIÓN

El AE es un ácido fenólico presente en frutas, verduras, tés y plantas medicinales por lo que es consumido por parte de la población a partir de numerosas fuentes alimentarias. En los últimos años, el mercado de suplementos nutricionales ha incrementado las ventas de este compuesto bajo atribuciones de supuestos efectos beneficiosos para la salud, siendo esto motivo de preocupación por agencias regulatorias en materia de medicamentos y alimentos como la FDA. El consumo de suplementos nutricionales de AE, ligado con frutas, verduras, plantas medicinales y té verde podrían generar un aumento de la ingesta total de este compuesto, poniendo en riesgo a los consumidores.

Los suplementos dietéticos pueden ser recomendados por médicos, pero más a menudo, son "auto-recetados" y están disponibles en supermercados, farmacias o a través de empresas de comercialización de suplementos dietéticos. En consecuencia, los consumidores suelen creer que pueden consumir tanto como quieran sin ninguna repercusión en su salud (100). En este contexto, es crucial comprender el potencial tóxico inherente de los ingredientes activos contenidos en los suplementos dietéticos y establecer los límites de seguridad a través de evaluaciones toxicológicas agudas para anticipar acciones contra intoxicaciones o eventos indeseables y establecer dosis seguras para esquemas de administración continua.

Aunque existen investigaciones acerca de la toxicidad aguda del ácido elágico en roedores, los resultados son contradictorios. En consecuencia, el presente trabajo se propone el estudio de la toxicidad oral aguda del ácido elágico en ratas Wistar siguiendo el protocolo estandarizado de la OCDE en su guía 423.

IV HIPÓTESIS

El AE induce toxicidad cuando es administrado por vía oral a dosis superiores a 200 mg/Kg correspondientes a su exposición aguda.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la toxicidad oral aguda del AE en ratas Wistar según el método de clases de toxicidad.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar el impacto de la exposición aguda al AE en los síntomas y signos de toxicidad, así como en el peso corporal y consumo de alimentos de ratas Wistar administradas por vía oral con este compuesto.
- 2) Identificar los órganos diana de toxicidad a través del análisis macroscópico e histológico correspondiente.
- 3) Determinar la influencia de esta sustancia sobre parámetros hematológicos y bioquímicos.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Animales

En este estudio se utilizaron ratas Wistar hembras, de 7 a 12 semanas de edad. Alimentados con: Nutricubos® hecho en: Agribands 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.

Productos químicos y equipos

Los productos químicos y equipos utilizados en este experimento fueron los siguientes: AE (LTK Laboratories, Inc. Minnesota EUA. CAS No: 476-66-4). Dimetilsulfoxido (DMSO) Merck® [CAS: 67-68-5]. Pentobarbital (Pisabental® No. De Registro: Q-7833-215). Formaldehido Mayer® [CAS: 50-00-0]. Xilol Mayer® [CAS: 1330-20-7]. Parafina Paraplast Leica®. Hematoxilina y eosina. Micrótopo de rotación RM2125 RTS Leica Biosystems.

6.2 Evaluación de la toxicidad oral aguda en ratas Wistar

6.3.1 Especie animal

En la presente investigación se utilizó como especie animal ratas Wistar hembras que iban de 7 a 12 semanas de edad, las que fueron alimentadas con una dieta para roedores Nutricubos® (elaborado en: Agribands 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). Se conservaron en un ambiente controlado: temperatura de 22°C ± 3°C, humedad al 70%, con luz artificial en periodos 12 h de luz y 12 h de oscuridad, así como alimento y agua *ad libitum*. La estrategia experimental se llevó a cabo en el bioterio del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) que se encuentra en la Facultad de Química Farmacobiología perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los animales de estudio se manipularon de acuerdo con la Norma Mexicana encargada del uso y cuidado de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, México). Esta investigación fue aprobada por la Coordinación de Investigación

Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.3.2 Selección de las dosis

Se realizó el estudio de toxicidad oral aguda del AE en base al método de clases de toxicidad planteada en la guía 423 por la OECD (44). De forma aleatoria se establecieron tres ratas para grupo control (C1), así como tres ratas a cada uno de los grupos de estudio (GAE1, GAE2, GAE3), a las cuales se les administró el AE (LTK Laboratories, Inc. Minnesota EUA. CAS No: 476-66-4) a concentraciones de 200, 1.000 y 2.000 mg/Kg, en dosis única y utilizando una cánula intragástrica, para el grupo control se administró Dimetilsulfoxido (DMSO) Merck® [CAS: 67-68-5] al 0.2%. Durante todas las administraciones se tuvo cuidado de no exceder 2 ml/100 g de peso del animal, de acuerdo con la guía 423 de la OCDE. La elección del DMSO al 0.2% en agua destilada se realizó considerando que el AE presenta una polaridad baja, así como la realización de estudios previos donde el ácido elágico fue empleado por vía oral en roedores solubilizado en este solvente (101-104).

6.3.3 Período y vía de exposición

Después del séptimo día de adaptación de los animales, se les retiró el alimento durante 12 h. Posteriormente, mediante una cánula intragástrica se les administró una dosis única de solución acuosa ya determinada (grupo control), mientras que a los grupos experimentales se les mantuvo en observación por los primeros 30 min, durante las primeras 4 horas y durante 13 días una vez al día para determinar muerte, así como evaluar signos y síntomas de toxicidad. Los signos de toxicidad examinados fueron los establecidos por la guía 423: comportamiento (actividad/inactividad, agresividad, exploración, sedación), aspecto físico (posiciones extrañas, posición de la cola, piloerección, lagrimeo, excretas). Del mismo modo, también se evaluó los temblores musculares, alteración de los reflejos, tamaño de pupilas, opacidad corneal, lesiones en piel, convulsiones y parálisis.

6.3.4 Procedimiento experimental

Los animales se pesaron a los 0, 7 y 14 días posteriores a la administración con aras a llevar un registro del peso corporal y alimento consumido. En el día 14, los animales

se mantuvieron en ayuno por 12 h posteriormente se les administró Pentobarbital de uso veterinario (Pisabental® No. De Registro: Q-7833-215) a una dosis de 80 mg/kg, y después se procedió a sacrificarlos. Las muestras obtenidas de sangre por punción cardíaca se utilizaron para los análisis bioquímicos y hematológicos correspondientes. Asimismo, los órganos que se obtuvieron se utilizaron en los análisis macroscópicos como en los histopatológicos.

6.3.5 Análisis macroscópico

Los órganos obtenidos y pesados fueron: encéfalo, riñones, brazo, pulmones y corazón. Para su conservación se depositaron en una solución fijadora de formaldehído Mayer® al 10% y pH de 7.0. Se calculó el peso relativo del órgano mediante la siguiente ecuación:

Peso relativo del órgano (%) = peso del órgano/ peso corporal en el sacrificio x 100 (105).

6.3.6 Análisis histopatológico

Las muestras tomadas de los diferentes órganos fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcoholes, y enjuagadas con líquido diafanizador (xilol) Mayer® [CAS: 1330-20-7], que les dio un aspecto traslúcido, así como solubilidad, lo que ayudó a la inclusión en parafina Paraplast Leica®. Posteriormente, se hicieron cortes histopatológicos en un micrótopo de rotación RM2125 RTS Leica Biosystems de 3 y 5 µm, para luego montarlos en portaobjetos y realizar una tinción de hematoxilina-eosina. Los cortes se realizaron en el Instituto de Investigación sobre los Recurso Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.3.7 Determinaciones hematológicas y bioquímicas

Con las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca, se llevaron a cabo las siguientes pruebas hematológicas: Recuento de glóbulos blancos (cayados, segmentados, linfocitos, monocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos), recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, índices hemáticos (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, amplitud de distribución de glóbulos rojos), conteo de plaquetas y volumen corpuscular medio de plaquetas. Así como también se midieron varias sustancias en sangre, como: bilirrubina total, creatinina, glucosa, urea, fosfatasa alcalina, alanina amino-trasferasa, aspartato amino-trasferasa y gamma glutaril trasferasa. Estos análisis fueron realizados por laboratorios EDULAB, localizados en Morelia. Michoacán.

VII RESULTADOS

7.1 Estudio de toxicidad oral aguda: evaluación de signos y síntomas de toxicidad

Tras la administración oral del AE, no se observaron signos o síntomas toxicológicos particularmente en ojos, piel, pelaje ni mucosas. Del mismo modo, no se registró la aparición en el animal de lagrimeo, piloerección, incremento/disminución pupital o patrón discontinuo respiratorio. Tampoco se observó alteración alguna en la postura y la marcha. Ningún signo de movimientos tónico-clónicos, conductas estereotípicas como aseo excesivo o círculos repetitivos fue observado, ni comportamientos extraños como automutilación o caminar hacia atrás. Por lo demás, no hubo ningún animal muerto en el estudio por la administración de diferentes dosis de AE.

7.1.1 Peso corporal

Un parámetro muy importante en la evaluación toxicológica es sin duda el peso corporal, así como la ingesta de alimentos en los animales tratados respecto al control, ya que se puede detectar la presencia de toxicidad de manera temprana (106). Se observó que el grupo control aumentó de peso corporal en función del tiempo en los días 0,7 y 14, así como también los animales que se les administró la dosis de 200 mg/kg. No obstante, los animales que se les aplicó la dosis de 1.000 mg/kg mostraron lentitud en el ritmo de crecimiento del día 7 al 14. En tanto a la dosis de 2.000 mg/kg el peso se mantuvo constante, del día 7 al 14, como se muestra en la Figura 10.

Ácido Elágico

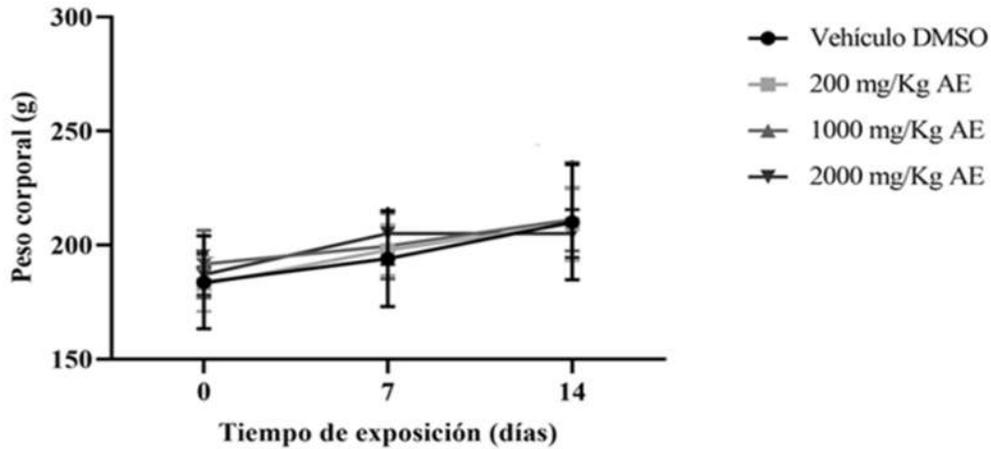


Figura 10. Relación del peso corporal de las ratas durante la evaluación toxicológica.

Se muestra la media \pm error estándar de 6 ratas por grupo. Las diferencias estadísticas significativas se representan con (*). ANOVA One-way con prueba de Tukey post hoc, $p < 0.05$.

7.1.2 Consumo de alimentos

Respecto al consumo de alimentos, se reportaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los animales que consumieron las dosis 1000 y 2000 mg/Kg de ácido elágico. En la figura 11 se observa una marcada disminución del consumo de alimento en relación con el control.

Ácido Eláxico

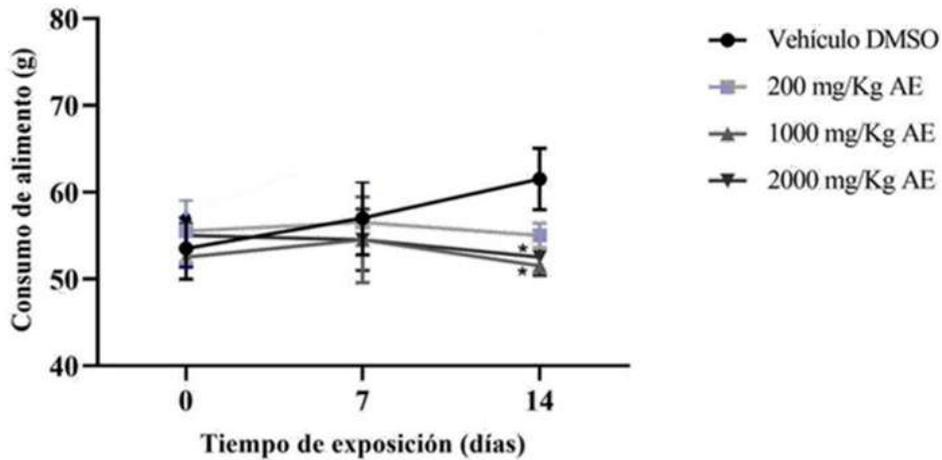


Figura 11. Relación del consumo de alimento en g de las ratas con los días 0,7 a 14 de exposición del ácido eláxico a diferentes dosis.

Se muestra la media \pm error estándar de 6 ratas por grupo. Las diferencias estadísticas significativas se representan con (*). ANOVA One-way con prueba de Tukey post hoc, $p < 0.05$.

7.1.3 Análisis macroscópico de los órganos

El análisis macroscópico mostró algunas alteraciones significativas a nivel pulmonar y cardíaco comparativamente con el control. En los pulmones se observó un cambio en la coloración, ya que disminuyó en los grupos que fueron administrados con AE, como se muestra en la Figura 12.

Por otra parte, en el corazón de dos ratas a las que se les administró la dosis de 2.000 mg/kg se observó desgarre en el pericardio (capa más externa del corazón), como se muestra en la Figura 13. Sin embargo, no se observaron otras alteraciones macroscópicas relacionadas con la coloración o la posición del hígado, encéfalo, timo, bazo, estómago, riñón, páncreas y suprarrenal derecha e izquierda.

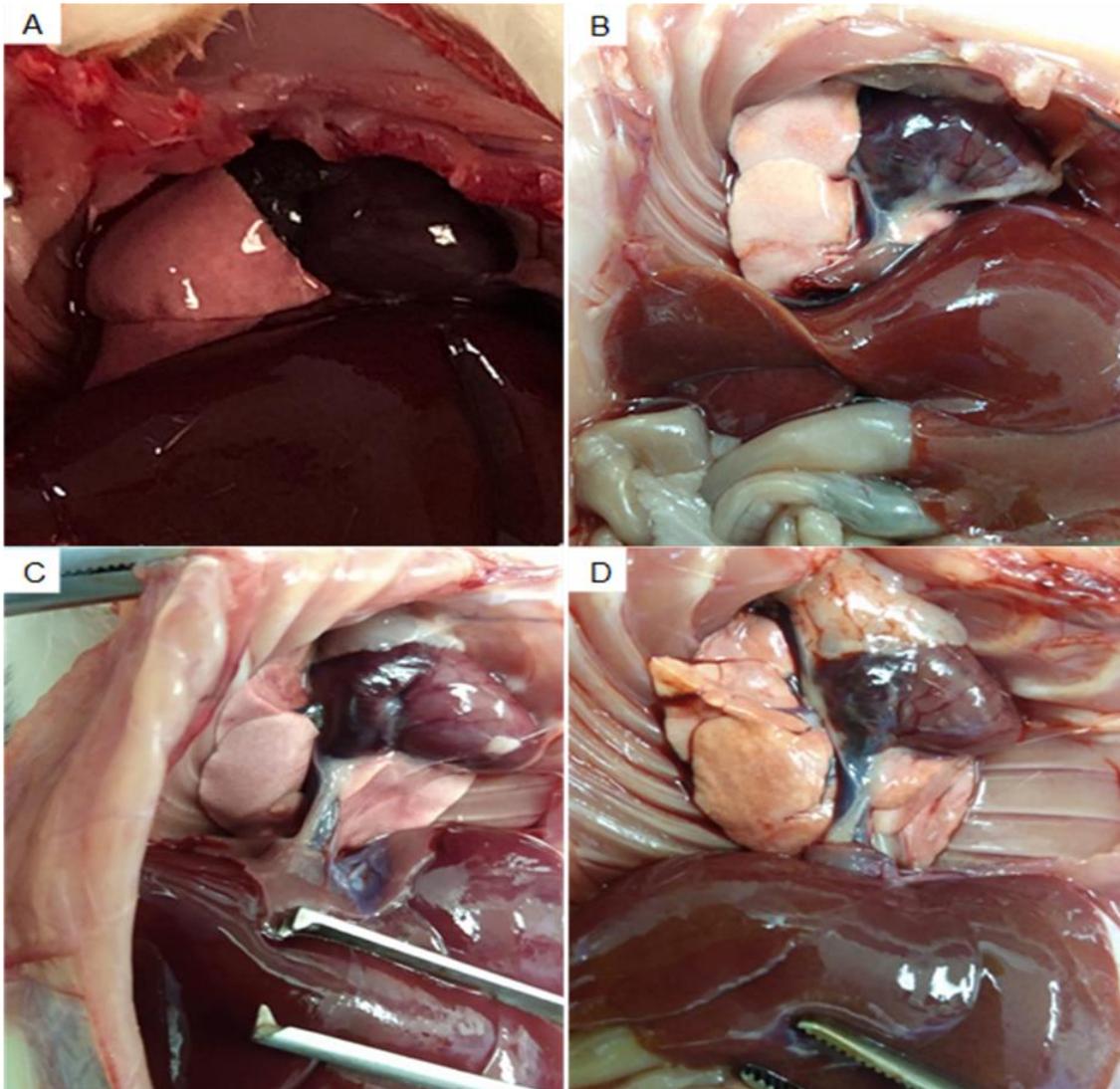


Figura 12. Pulmones a los 14 días de la administración a diferentes dosis con AE. Disminución de color respecto a las dosis. Control (A), 200 mg/Kg (B), 1.000 mg/Kg (C), 2.000 mg/Kg (D).

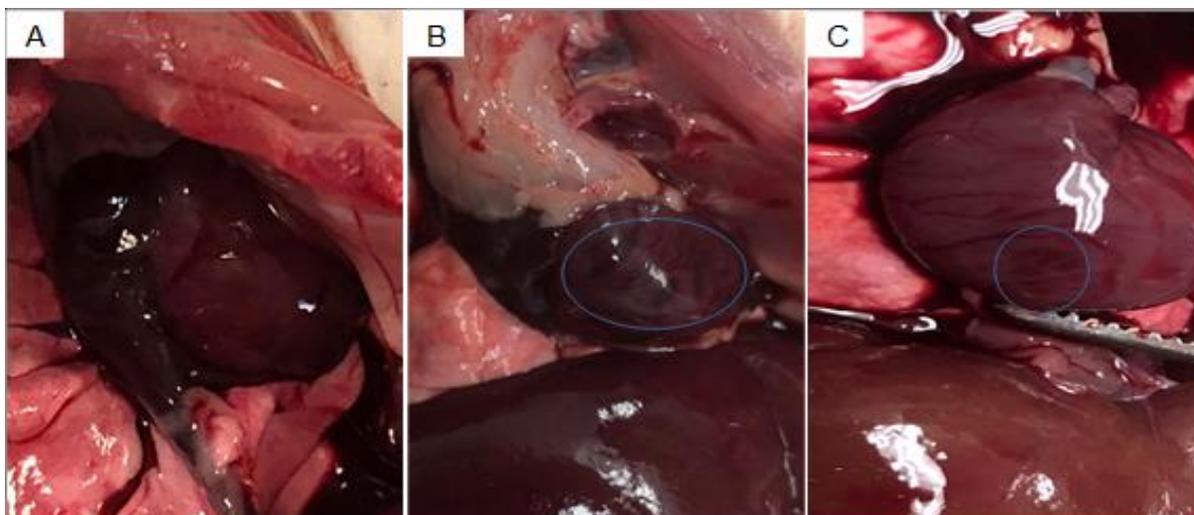


Figura 13. Corazón a los 14 días posterior a la administración de AE. Derrame en el pericardio de única dosis.

Control (A), Rata 1 (B) 2.000 mg/Kg, Rata 2 (C) 2.000 mg/Kg.

Peso relativo de los órganos

La Tabla 5 muestra los valores del peso relativo de los órganos. Es posible observar que posterior al tratamiento con AE no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con relación al peso relativo de los órganos comparado con el control, como se demuestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores del peso relativo de los órganos correspondientes a ratas Wistar expuestas a AE.

Órganos	Vehículo DMSO	200 mg/Kg	1000 mg/Kg	2000 mg/Kg
Hígado	4.19±0.15 ^a	3.19±0.21 ^a	4.17±0.36 ^a	3.91±0.29 ^a
Encéfalo	0.88±0.09 ^a	0.87±0.04 ^a	0.89±0.04 ^a	0.89±0.07 ^a
Corazón	0.42±0.02 ^a	0.43±0.04 ^a	0.42±0.03 ^a	0.42±0.04 ^a
Bazo	0.39±0.04 ^a	0.42±0.05 ^a	0.41±0.05 ^a	0.38±0.05 ^a
Estómago	0.77±0.06 ^a	0.73±0.06 ^a	0.78±0.09 ^a	0.79±0.04 ^a
Timo	0.17±0.03 ^a	0.19±0.03 ^a	0.19±0.03 ^a	0.17±0.02 ^a
Páncreas	0.25±0.05 ^a	0.30±0.09 ^a	0.24±0.04 ^a	0.26±0.07 ^a
Riñón derecho	0.42±0.02 ^a	0.40±0.03 ^a	0.39±0.03 ^a	0.38±0.05 ^a
Riñón izquierdo	0.39±0.01 ^a	0.39±0.02 ^a	0.39±0.02 ^a	0.37±0.04 ^a
Suprarrenal derecha	0.016±0.001 ^a	0.017±0.004 ^a	0.018±0.04 ^a	0.017±0.05 ^a
Suprarrenal izquierda	0.017±0.003 ^a	0.016±0.002 ^a	0.017±0.004 ^a	0.016±0.004 ^a
Pulmón derecho	0.35±0.04 ^a	0.37±0.04 ^a	0.34±0.08 ^a	0.35±0.02 ^a
Pulmón izquierdo	0.21±0.03 ^a	0.17±0.08 ^a	0.22±0.06 ^a	0.19±0.03 ^a

Los valores están expresados como media ±DE. Las diferencias estadísticamente significativas se

representan con letras diferentes. ANOVA con prueba de Tukey post hoc, $p < 0.05$.

7.1.4 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico reveló cambios significativos microscópicos en el corazón, riñón y pulmón. Empero, no se encontró evidencia alguna de alteraciones en el encéfalo, hígado, brazo, timo, estómago, páncreas, brazo, suprarrenal derecha e izquierda. Los órganos dañados se describen a continuación.

Riñón

En las ratas control se observó corpúsculo renal; cápsula glomerular (Bowman) completa al igual que glomérulos con ovillo capilar normocelular. Del mismo modo, pudo constatarse el aparato yuxtglomerular bien definido, mácula densa y el túbulo contorneado proximal que forma parte del sistema tubular en buen estado.

El tratamiento del AE provocó hiperplasia del ovillo glomerular en forma de dosis-dependiente. En las ratas que se les administró la dosis de 200 mg/kg se observó 20% de glomérulos con hiperplasia. En tanto las ratas que recibieron dosis de 1.000 y 2.000 mg/kg presentaron un 70% de hiperplasia glomerular. Además, provocó daño en los glomérulos dosis-dependiente, se observó por corte de 4 a 9 glomérulos colapsados y al igual que glomérulos con una completa pérdida de ovillo glomerular propio de la necrosis. Mientras en el sistema tubular se observa necrosis tubular, con amiloidosis en túbulos contorneados y extravasación de eritrocitos en el mesénquima renal, en las ratas a las que se les administró la dosis de 1.000 y 2.000 mg/kg (Figuras 14 y 15).

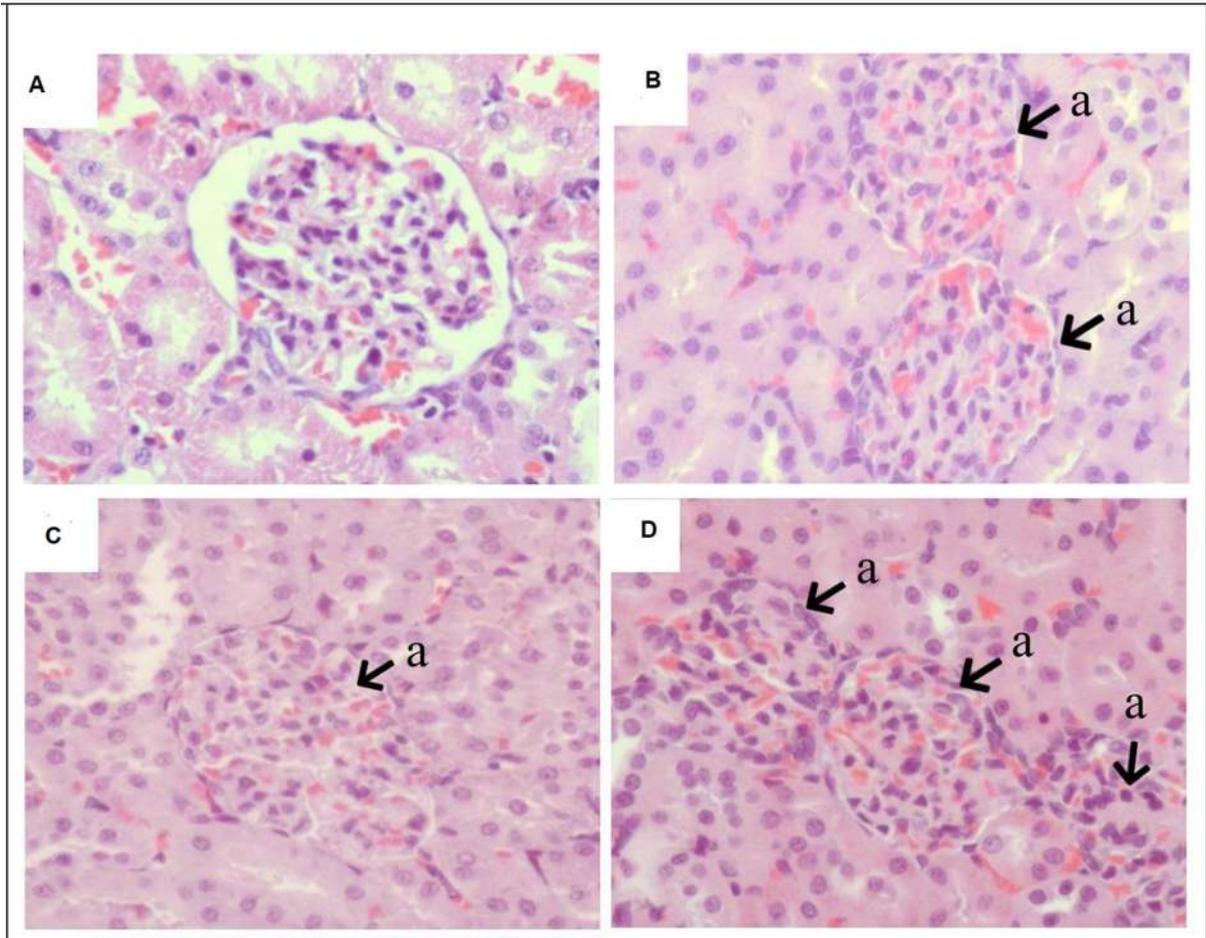


Figura 14. Histopatología del riñón posterior a la administración del AE a diferentes dosis.

Grupo control DMSO (A). Se identificó hiperplasia glomerular (aumento del número de células, a) dosis-dependiente a las dosis de 200 mg/ kg (B), 1.000 mg/kg (C) y 2.000 mg/kg (D). Las flechas representan la presencia de: a) hiperplasia glomerular.

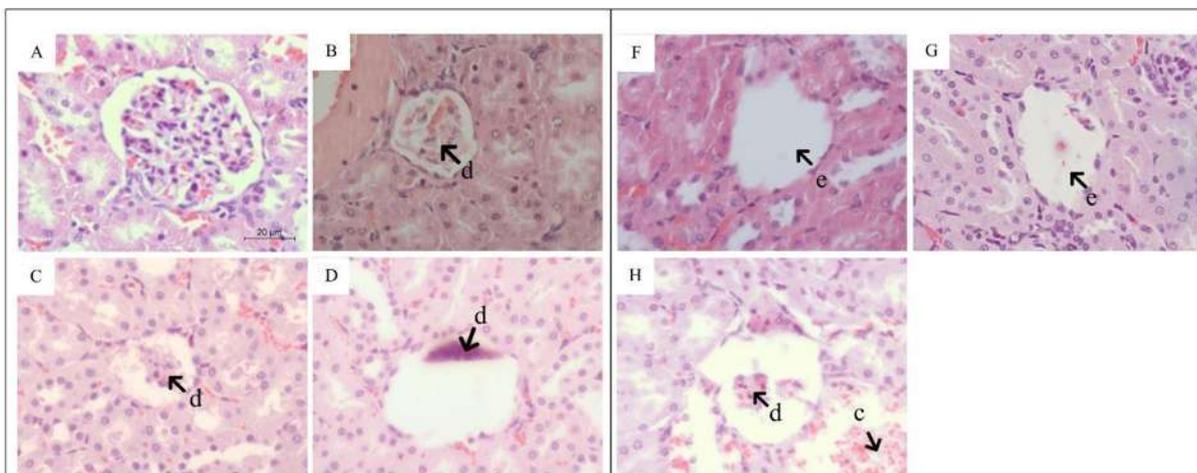


Figura 15. Análisis histopatológico del riñón posterior a la administración del AE.

Grupo control DMSO (A). Grupos experimentales: AE 200 mg/Kg (B y F), AE 1.000 mg/Kg (C y G), AE 2.000 mg/Kg (D y H). Las flechas representan la presencia de: sangrado (c), retracción del penacho glomerular (d), pérdida del penacho glomerular (e).

Corazón

En las ratas control se observaron miofibrillas alargadas normales, citoplasmas uniformes y núcleos vesiculosos céntricos sin evidencia de sangrado, edema o inflamación. Mientras en las ratas que se les administró AE se observó edema en el tejido intersticial así como, una escasa inflamación causada por la presencia de infiltrado inflamatorio de leucocitos polimorfonucleares y extravasación de eritrocitos. En los miocitos se observa hipertrofia, citoplasmas eosinófilos y núcleos picnóticos propio de la autólisis en evolución a necrosis coagulativa. Así también, se observa necrosis por licuefacción, los miocitos muestran pérdida de la arquitectura, cariólisis y una masa uniforme. Por otro lado, se observa una gran cantidad de fibras hipercontraídas con bandas de contracción, ya que el ácido eláxico causó infarto al miocardio. También se presentó una significativa hiperplasia de pericardio, inflamación por células mesoteliales, con infiltrado inflamatorio por células mononucleares y derrame pericárdico (Figuras 16, 17 y 18).

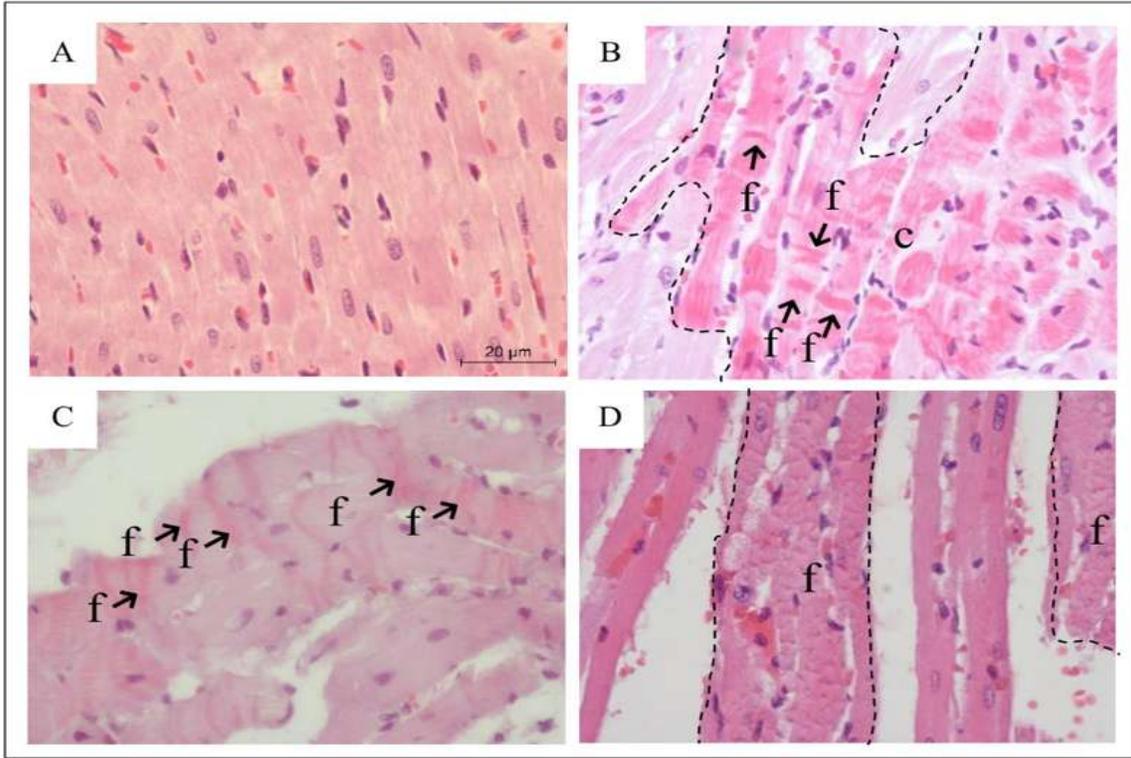


Figura 16. Análisis histopatológico del corazón posterior a la exposición de AE.

Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/ kg (B), dosis 1000 mg/kg (C), dosis 2000 mg/kg (D). Las flechas representan la presencia de: c) necrosis coagulativa (líneas discontinuas); f) bandas de contracción.

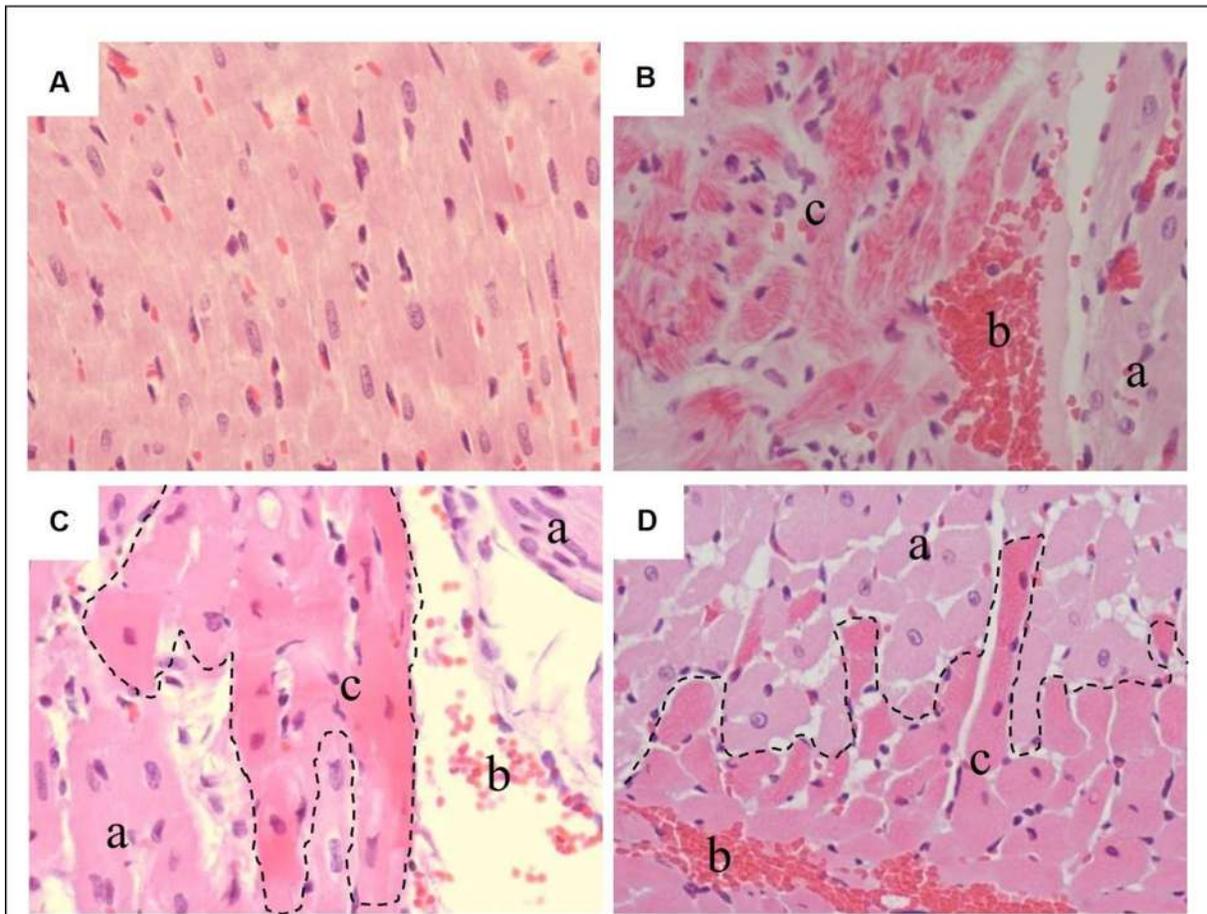


Figura 17. Análisis histopatológico del corazón posterior a la exposición de AE.

Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/ kg (B), dosis 1.000 mg/kg (C) y dosis 2.000 mg/kg (D). Los aspectos histopatológicos más remarcables se muestran con letras: a) hipertrofia de miocardio, b) hemorragia, c) necrosis coagulativa (líneas discontinuas).

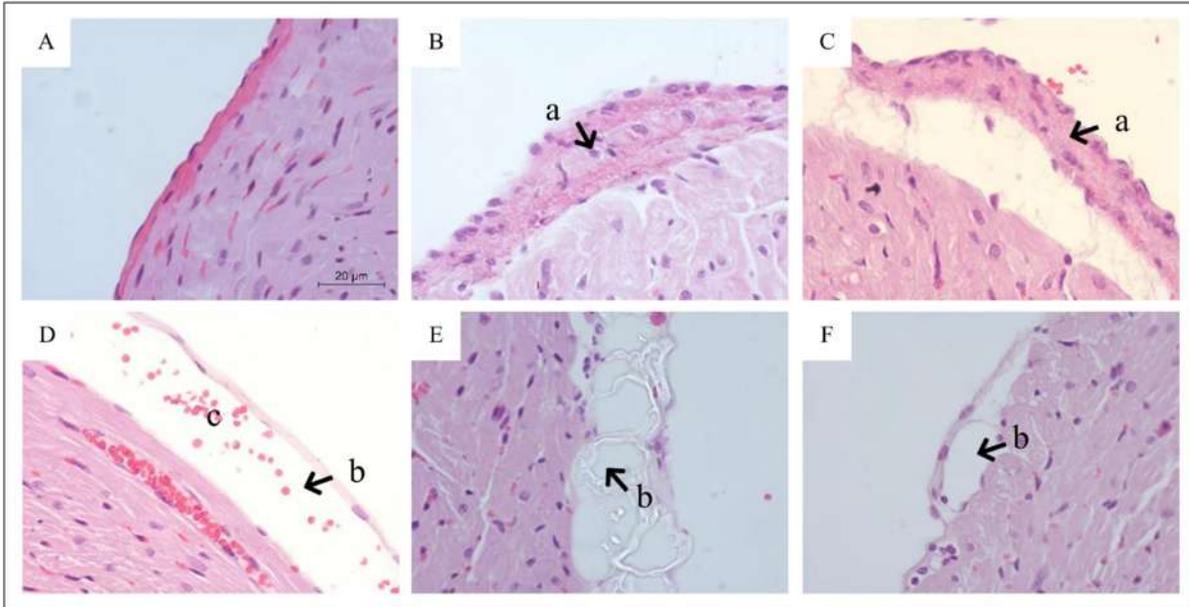


Figura 18. Análisis histopatológico en pericardio posterior a la exposición con AE.

Grupo control DMSO (A), dosis 1.000 mg/ kg (B y E) y dosis 2.000 mg/kg (C y F), 200 mg/kg (D). Las flechas representan la presencia de: a) hiperplasia de pericardio; b) edema pericárdico, c) hemorragia.

Pulmón

En las ratas control se observaron bronquios y bronquiolos con epitelio pseudoestratificado cilíndrico con células ciliadas en condiciones normales, sin inflamación. Así como también se presentaron paredes delgadas en los alveolos formados por los neumocitos de tipo I y II donde ya ocurre el intercambio gaseoso, se observa los delgados tabiques alveolares y capilares sanguíneos normales. El ácido eláxico provocó una respuesta inmune inadecuada ya que se observaron macrófagos y cambios inflamatorios. En las ratas que se les administró las dosis de 200, 1.000 y 2.000 se observó hemorragia, así como los bronquiolos con distorsión e inflamación del lumen. A nivel alveolar se observa colapso con tabiques alveolares ensanchados debido al infiltrado inflamatorio de los leucocitos polimorfonucleares. La presencia de células como macrófagos y leucocitos sugiere inflamación tanto aguda como crónica (Figura 19).

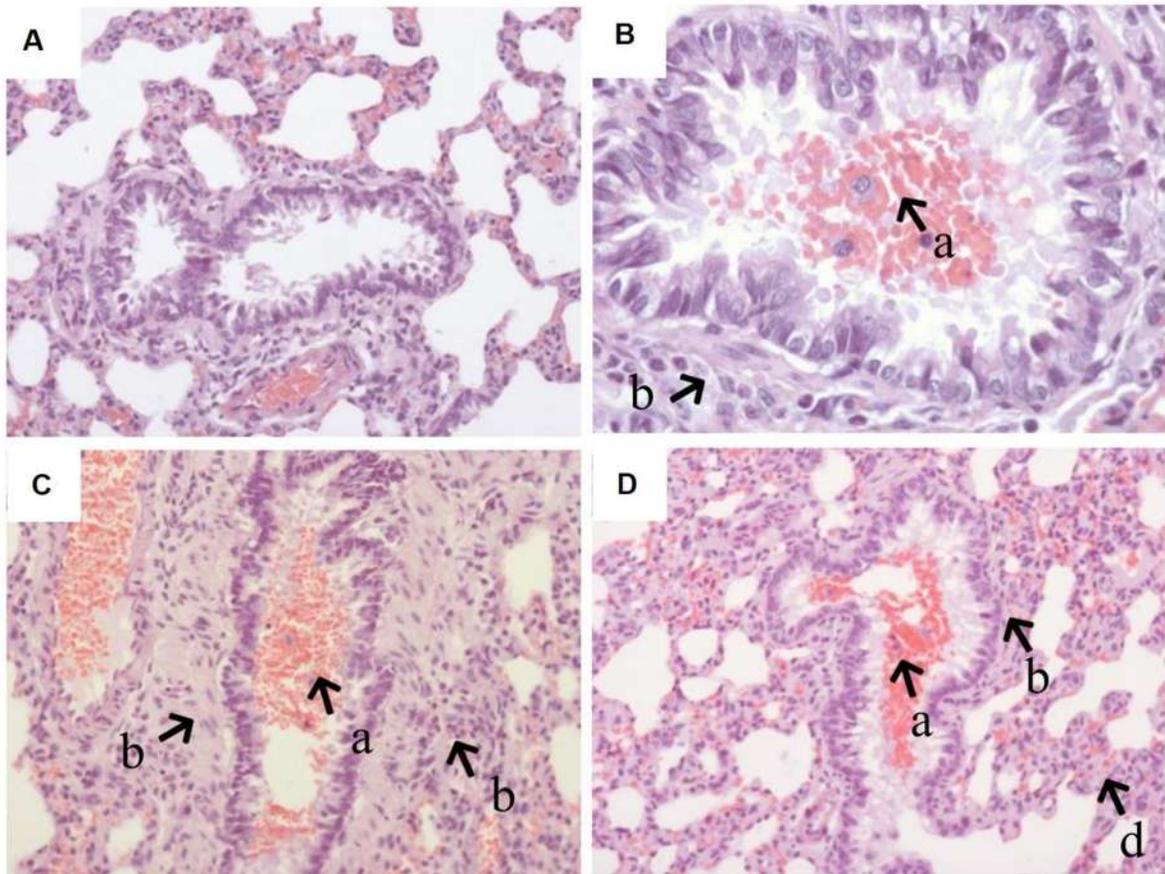


Figura 19. Análisis histopatológico del pulmón posterior a la exposición con AE.

Grupo control DMSO (A), dosis 200 mg/kg (B), dosis 1.000 mg/kg (C) y dosis 2.000 mg/kg (D). Se distingue la presencia de: a) hemorragias, b) infiltrado inflamatorio y d) engrosamiento del tabique interalveolar.

7.1.5 Análisis hematológico y bioquímico

Los resultados hematológicos y bioquímicos se presentan en la tabla 6. Puede observarse que las dosis 1.000 y 2.000 mg/kg presentan un aumento significativo de la urea respecto al control, así como en la creatinina se muestra un incremento en la dosis 2.000 mg/kg respecto al control.

Tabla 6. Parámetros hematológicos y bioquímicos obtenidos posterior a la administración de AE a diferentes dosis con el grupo control.

Parámetro	Valor de referencia	Control DMSO	200 mg/Kg	1000 mg/Kg	2000 mg/Kg
Glucosa (mg/dL)	76.0 - 175.0	161.67±5.92 ^a	154.35±6.81 ^a	160.71±4.80 ^a	155.71±8.51 ^a
Urea (mg/dL)	38.33 - 87.9	44.05±3.20 ^b	49.77±5.71 ^{ab}	52.22±4.52 ^a	56.71±3.13 ^a
Creatinina (mg/dL)	0.2 - 0.6	0.33±0.082 ^b	0.37±0.052 ^b	0.43±0.521 ^{ab}	0.53±0.15 ^a
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.005-0.18	0.017±0.04 ^a	0.00±0.00 ^a	0.033±0.05 ^a	0.017±0.04 ^a
Bilirrubina Directa (mg/dL)	0.03-0.06	0.017±0.04 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.033±0.05 ^a
Bilirrubina Indirecta (mg/dL)	0.03-0-5	0.033±0.05 ^a	0.00±0.00 ^a	0.033±0.05 ^a	0.05±0.03 ^a
TGO (u/L)	65.0 - 203.0	156.45±31.86 ^a	139.78±31.96 ^a	133.47±20.45 ^a	140.20±35.60 ^a
TGP (u/L)	32.7 - 84.1	66.05±9.79 ^a	52.48±6.17 ^{ab}	51.42±8.90 ^{ab}	56.25±11.38 ^{ab}
Fosfatasa alcalina (u/L)	82.8 - 297.3	141.08±33.53 ^a	104.87±24.04 ^a	131.52±17.66 ^a	102.52±46.26 ^a
GGT (u/L)	0 - 1.43	0.10±0.16 ^b	0.06±0.12 ^b	0.60±0.36 ^{ab}	1.08±0.15 ^a
Eritrocitos (X10 ⁶ /uL)	6.5 - 7.9	6.19±0.29 ^a	6.23±0.59 ^a	6.69±0.49 ^a	6.89±0.45 ^a
Hemoglobina (g/dL)	13.7 - 16.8	14.53±0.52 ^a	14.91±1.12 ^a	15.37±0.77 ^a	15.20±0.50 ^a
Hematocrito (%)	37.9 - 49.9	39.70±2.40 ^{ab}	41.46±3.92 ^a	42.43±3.43 ^a	43.61±2.78 ^a
VGM (fL)	49.9 - 65.3	64.10±2.54 ^{ab}	66.70±4.06 ^a	63.73±4.57 ^{ab}	63.45±4.17 ^{ab}
HCM (pg)	17.8 - 24.9	19.45±9.55 ^a	23.98±1.83 ^a	23.12±0.83 ^a	22.11±1.22 ^a
CMHG (g/dL)	33.2 - 37.9	36.05±1.64 ^{ab}	36.05±2.83 ^{ab}	36.43±2.75 ^{ab}	34.93±2.45 ^b
RDW (%)	10.5 - 14.9	12.03±1.02 ^a	12.42±1.31 ^a	11.71±0.88 ^a	12.73±0.85 ^a

Leucocitos totales (u/L)	1,100 - 7,500	3450.00±824.01 ^a	3650±1011.43 ^a	4650.00±314.64 ^a	4183±1205.68 ^a
Neutrófilos (%)	7 - 33	7.83±3.60 ^a	7.67±2.94 ^a	17.33±10.32 ^a	8.33±1.63 ^a
Linfocitos (%)	62 - 90	85.50±5.43 ^a	88.50±5.32 ^a	78.83±9.81 ^a	88.33±1.96 ^a
Monocitos (%)	1.0-5.0	4.00±2.91 ^a	3.83±3.65 ^a	3.83±1.60 ^a	3.33±1.86 ^a
Plaquetas (u/L)	680 - 1200000	572667±224636 ^b	658833±57217 ^b	670333±47429 ^b	656500±216556 ^b

Recuento de glóbulos rojos (RBC), volumen globular medio (VGM), hemoglobina corpuscular medio (HCM), concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC), ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW). Los valores están expresados como media ±DE. Las diferencias estadísticamente significativas se representan con letras diferentes. ANOVA prueba de Tukey post hoc, p<0.05.

VIII DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó la toxicidad oral aguda del AE en ratas Wistar de acuerdo con el método toxicológico alternativo descrito en la Guía 423 de la OCDE. No se presentaron signos o síntomas de toxicidad después de la administración del ácido elágico a las dosis contempladas en el estudio, así como tampoco muertes por lo que fue imposible obtener la DL₅₀, que es superior a la dosis más alta administrada de 2.000 mg/kg. Los resultados obtenidos coinciden con los descritos por Jadhav y colaboradores (2012), así como también por Bhandary y colaboradores (2013) los reportaron una DL₅₀ para este compuesto superior a 2.000 mg/kg (92,93).

El peso corporal y la ingesta de alimentos constituyen factores determinantes para el análisis toxicológico, ya que permiten detectar la presencia de toxicidad de manera temprana. Posterior a la administración de ácido elágico, se observó una disminución en el consumo de alimento para el día 14, siendo significativa en las dosis altas.

Se ha descrito que el AE tiene la capacidad de reducir el consumo de alimento en ratas con una alimentación alta en grasas y carbohidratos (107). Asimismo, estudios demuestran que los animales alimentados con extractos ricos en ácido elágico muestran una disminución en su peso corporal (108). Este compuesto al 0,1% (equivalente a ~100 mg AE/kg de peso corporal) posee la capacidad de disminuir la obesidad y las complicaciones metabólicas que conlleva en ratones obesos KK-Ay (109). Por consiguiente, es probable que sus efectos antiadipogénicos sean responsables de que a los máximos niveles de dosis las ratas no mostraran un incremento en su peso corporal comparativamente al control. Del mismo modo, este efecto podría estar mediado por la presencia de metabolitos del AE, particularmente las urolitinas. Lo anterior debido a que en estudios realizados *in vivo* se observó que las urolitina A, urolitina C y urolitina D reducen la adipogénesis, pero no la urolitina B e isourolitina A (73).

El análisis macroscópico de los órganos demostró que la exposición al AE ocasionó una decoloración de los pulmones, que se atribuyó a un daño progresivo de los sacos alveolares, provocado por una disminución del oxígeno que llega a la corriente sanguínea, impactando en la coloración de este órgano. Asimismo, el desgarre

pericárdico a dosis de 2.000 mg/kg, podría deberse a una acumulación excesiva de líquido en la doble membrana que rodea al corazón, probablemente por la existencia de un proceso inflamatorio subyacente. Estos hallazgos indicaron la existencia de daño pulmonar y cardíaco inducido por el AE que fue corroborado ulteriormente por el análisis hematológico e histopatológico.

En el análisis hematológico y bioquímico el AE causó aumento en los niveles tanto de urea como de creatinina en la dosis más concentrada. El incremento significativo indica daño en el funcionamiento renal, que se puede relacionar con el análisis macroscópico que muestra que los órganos más dañados por la exposición a AE son el riñón, corazón y pulmones. Otros órganos como el encéfalo, páncreas, hígado, timo, estómago, bazo, suprarrenal derecha e izquierda no presentaron ningún daño a nivel histopatológico.

Los resultados obtenidos muestran que el AE es una sustancia nefrotóxica a altas concentraciones. Varias podrían ser las causas de esta toxicidad. Una de ellas estaría relacionada con el potencial pro-oxidativo del AE. El estrés oxidativo puede afectar tanto la estructura como la función glomerular, afectándose además las células epiteliales, mesangiales y endoteliales. Asimismo, el estrés oxidativo puede ser responsable de lesiones inflamatorias glomerulares producidas mediante una serie de mediadores, como citoquinas y quimiocinas, que causan producción de ERO, activación de leucocitos e incremento del daño glomerular (110).

Por otro lado, el daño a nivel renal que provocó el AE podría deberse a un aumento en la producción de prostaglandina, especialmente prostaglandina E₂ (PGE₂). Investigaciones recientes *in vivo* realizadas en ratas Wistar que fueron administradas con 6 mg/kg de AE, demostraron un incremento significativo en los valores plasmáticos de PGE₂ (111). Siendo esto un factor relacionado con la inflamación crónica que causa trastornos renales (112). El daño en el túbulo proximal puede estar relacionado a una respuesta inflamatoria intermediada por la PGE₂ (113). No obstante, estudios subsecuentes son necesarios para una mayor comprensión de los mediadores implicados en la lesión renal causada por el AE.

El AE también induce daños a nivel cardíaco incluyendo infarto agudo al miocardio, así como la hiperplasia en pericardio. El corazón es un órgano muscular contráctil,

cuyas funciones incluyen el bombeo de la sangre oxigenada mediante vasos sanguíneos por todo el organismo. El infarto agudo al miocardio o bien necrosis o muerte de una fracción del músculo cardíaco, se genera por la obstrucción del flujo sanguíneo (114). El daño al corazón puede relacionarse tanto a la actividad pro-oxidativa del compuesto, como a sus metabolitos las urolitinas a concentraciones elevadas. Las urolitinas A, B y B-glucurónido, aumentan la liberación de óxido nítrico (NO) e incrementa la actividad de la enzima óxido nítrico en las células endoteliales aórticas humanas (115). Estas alteraciones y el incremento excesivo en niveles de nitrosamina se relacionan con el daño al miocardio, especialmente el infarto al miocardio en ratas vía generación de peroxinitritos (116). El daño cardíaco también podría ser una consecuencia del daño renal, ya que se sabe que pacientes con enfermedades renales mueren por problemas cardiovasculares como infarto agudo de miocardio, más que por otras enfermedades (117). De hecho, la lesión renal aguda desencadena trastornos cardíacos a través de la activación de varios mecanismos fisiopatológicos, que involucran sobrecarga de volumen, desequilibrios electrolíticos, acumulación de toxinas urémicas, aumento de la respuesta inmune, así como la activación del sistema nervioso simpático y del sistema angiotensina-aldosterona (118). Estas hipótesis deben aún respaldarse por estudios subsecuentes que permitan comprobar si el daño renal podría generar daño a nivel cardíaco como consecuencia de la exposición aguda al AE.

A nivel pulmonar el AE causó inflamación aguda y crónica, daño en alveolos, bronquios y bronquiolos. Estos efectos nocivos para los pulmones podrían atribuirse a la lesión renal aguda inducida por AE. Se ha postulado que la lesión renal aguda conduce a disfunción pulmonar por comunicación aberrante de órgano a órgano (118). Las alteraciones del equilibrio inmunitario normal, la generación de mediadores inflamatorios, el daño endotelial, la apoptosis celular y el estrés oxidativo son importantes en la lesión pulmonar inducida por daño renal (118) .

En resumen, esta investigación indica que el AE posee un potencial tóxico no despreciable que podría resultar en efectos secundarios, especialmente en personas que consumen suplementos dietéticos, combinados con frutas, verduras, té verde y plantas medicinales. Desafortunadamente, se pudieron encontrar investigaciones

sobre la exposición potencial a esta molécula considerando varias fuentes combinadas en una población específica. En un intento de estimar la exposición potencial de estas diferentes fuentes considerando los datos disponibles en la literatura, pudo construirse un escenario hipotético. El uso humano de hasta 850 mg de AE se ha reportado en personas que emplean suplementos dietéticos disponibles comercialmente (119), mientras que la ingesta media de AE en hombres y mujeres estadounidenses que consumen niveles recomendados de frutas y verduras es de 17.9 y 27.6 mg por día (3). Además, algunos individuos pueden beber hasta 5 tazas de té verde al día (120), imponiendo una fuente adicional de AE. Una taza de té *Camellia sinensis L.*, preparada con 4 g contiene hasta 17.89 mg de AE (4). El uso concomitante de plantas medicinales como *Terminalia arjuna* (Roxb. Ex DC.) Wight & Arn. (10.3 mg AE/g corteza), elegida para esta estimación hipotética por ser una fuente reconocida de esta molécula(121), también podría contribuir a aumentar su ingesta por vía oral. El polvo de corteza de *T. arjuna* se ha utilizado en dosis de 500 mg tres veces al día para tratar la cardiopatía coronaria (122). Como el peso individual promedio es de 70 kg, la exposición potencial bajo estas condiciones hipotéticas al ácido elágico proveniente de estas fuentes sería aproximadamente ~14,03 mg/kg p.c. Aunque las dosis más altas utilizadas en este estudio (1.000 y 2.000 mg/kg p.c.) son significativamente mayores que las correspondientes a la exposición potencial, se pueden obtener algunos datos interesantes analizando la dosis tóxica más baja probada (200 mg/kg p.c.). Utilizando un factor de escala de 6,2 para la conversión de rata a humano(123), la dosis humana equivalente de 200 mg/kg de peso corporal en ratas sería de 32,25 mg/kg de peso corporal. Esta dosis anticipada en humanos es significativamente más alta que la exposición potencial a AE. Aunque es poco probable que en un escenario real la exposición potencial sea exactamente como aquí se estima, ya que la ingesta de alimentos y el uso de suplementos dietéticos dependen de las características económicas, sociales y culturales de la población, el uso indiscriminado de suplementos nutricionales de este compuesto junto con tés, frutas y plantas medicinales podría constituir un riesgo para los individuos. Se deben realizar más estudios toxicológicos que consideren la suplementación crónica en dosis bajas representativas de la exposición potencial humana antes de recomendar el uso del

ácido elágico en humanos.

IX CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que el AE pertenece a la categoría 5, representada por sustancias que presentan dosis letales medias en el rango superior a los 2.000 mg/kg, tal y como lo indica el anexo 3 de la guía 423 de la OECD. Este compuesto a dosis iguales o superiores a 200 mg/kg genera daño cardíaco, pulmonar y renal que se presenta en forma dosis-dependiente.

El potencial tóxico de esta sustancia no es despreciable, por lo que el consumo descontrolado de complementos alimenticios junto con frutas, verduras, infusiones y plantas medicinales podría dar lugar a la aparición de efectos adversos e intoxicaciones. Aunque es poco probable que la población los use en cantidades tan altas como las que se usaron en esta investigación toxicológica aguda, la información derivada de este estudio ayuda a comprender la toxicidad inherente a esta molécula y sienta las bases para diseñar estudios toxicológicos subagudos, subcrónicos y crónicos empleando niveles de dosis más representativas de la exposición potencial a este compuesto por parte de la población.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* el 15 de mayo de 2000;80(7):1024–32.
2. Kreidler M. FDA Warning Letter to Vitapurity Nutraceuticals | Quackwatch [Internet]. 2010 [citado el 27 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://quackwatch.org/cases/fdawarning/prod/fda-warning-letters-about-products-2008/vitapurity/>
3. Murphy, M.M., Barraj, L.M., Herman, D., Bi, X., Cheatham, R., Randolph, R.K., 2012. Phytonutrient Intake by Adults in the United States in Relation to Fruit and Vegetable Consumption. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 112, 222–229.
4. Yang X, Tomás-Barberán FA. Tea Is a Significant Dietary Source of Ellagitannins and Ellagic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* el 15 de mayo de 2019;67(19):5394–404.
5. Godínez Reséndiz R, Aceves Pastrana P. El surgimiento de la industria farmacéutica en México (1917-1940). *Rev Mex Cienc Farm.* Junio de 2014;45(2):55–68.
6. Yu LX. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. *Pharm Res.* abril de 2008;25(4):781–91.
7. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimers Dement Transl Res Clin Interv.* el 1 de noviembre de 2017;3(4):651–7.
8. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* marzo de 2010;9(3):203–14.
9. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang y Dale. *Farmacología + StudentConsult.* Elsevier España; 2016. 778 p.
10. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci.* el 6 de junio de 2019;20(11):2783.
11. Hughes J, Rees S, Kalindjian S, Philpott K. Principles of early drug discovery: Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* marzo de 2011;162(6):1239–49.

12. Fotis C, Antoranz A, Hatzivramidis D, Sakellaropoulos T, Alexopoulos LG. Network-based technologies for early drug discovery. *Drug Discov Today*. marzo de 2018;23(3):626–35.
13. Petrova E. Innovation in the Pharmaceutical Industry: The Process of Drug Discovery and Development. En: Ding M, Eliashberg J, Stremersch S, editores. *Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [citado el 4 de agosto de 2022]. p. 19–81. (International Series in Quantitative Marketing; vol. 20). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-7801-0_2
14. Campillo NE, Alonso M del CF. *Cómo se fabrica un medicamento*. Los Libros De La Catarata; 2018. 99 p.
15. Lucere KM, O'Malley MMR, Diermeier SD. Functional Screening Techniques to Identify Long Non-Coding RNAs as Therapeutic Targets in Cancer. *Cancers*. el 9 de diciembre de 2020;12(12):3695.
16. Turkson J. Cancer Drug Discovery and Anticancer Drug Development. En: Coleman WB, Tsonalis GJ, editores. *The Molecular Basis of Human Cancer* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [citado el 5 de agosto de 2022]. p. 695–707. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-458-2_36
17. Debouck C. Integrating genomics across drug discovery and development. *Toxicol Lett*. abril de 2009;186(1):9–12.
18. *Biotecnología de la Salud. Nuevos productos y servicios*. [Internet]. Euroespes Health. [citado el 7 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://euroespes.com/biotecnologia-de-la-salud-id/>
19. Díaz N. *Estudios preclínicos en investigación, desarrollo e innovación biotecnológica* [Internet]. Guadalajara, Jalisco México: CIATEJ; 2016. Disponible en: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5cd0aa9319d46.pdf#page=43
20. García Carvajal ZY, Espinosa-Andrews H. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. *Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencia Nanotecnología*. el 3 de enero de 2017;9(17):117.
21. Issa NT, Wathieu H, Ojo A, Byers SW, Dakshanamurthy S. Drug Metabolism in Preclinical Drug Development: A Survey of the Discovery Process, Toxicology, and Computational Tools. *Curr Drug Metab* [Internet]. el 21 de julio de 2017 [citado el 8 de agosto de 2022];18(6). Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/150909/article>
22. Kumar B, Prakash A, Ruhela RK, Medhi B. Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. *Pharmacol Rep*. diciembre de 2014;66(6):956–63.

23. Nair A, Morsy MA, Jacob S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development. *Drug Dev Res.* diciembre de 2018;79(8):373–82.
24. Penner N, Xu L, Prakash C. Radiolabeled Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Studies in Drug Development: Why, When, and How? *Chem Res Toxicol.* el 19 de marzo de 2012;25(3):513–31.
25. Guerrero GAM. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM.* diciembre de 2009;53(6):5.
26. Mahan VL. Clinical Trial Phases. *Int J Clin Med.* el 4 de diciembre de 2014;05(21):1374.
27. Wright B. Clinical Trial Phases. En: *A Comprehensive and Practical Guide to Clinical Trials* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado el 12 de agosto de 2022]. p. 11–5. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012804729300002X>
28. The Drug Development Process and the Phases of Clinical Research. En: *Fundamentals of Clinical Research* [Internet]. Milano: Springer Milan; 2007 [citado el 12 de agosto de 2022]. p. 304–28. (Gail M, Krickeberg K, Samet J, Tsatis A, Wong W. *Statistics for Biology and Health*). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-88-470-0492-4_12
29. Wadsworth I, Jaki T, Sills GJ, Appleton R, Cross JH, Marson AG, et al. Clinical Drug Development in Epilepsy Revisited: A Proposal for a New Paradigm Streamlined Using Extrapolation. *CNS Drugs.* el 1 de noviembre de 2016;30(11):1011–7.
30. Custer L, Sweder K. The Role of Genetic Toxicology in Drug Discovery and Optimization. *Curr Drug Metab.* el 1 de noviembre de 2008;9(9):978–85.
31. Westhouse RA, Car BD. Concepts in Pharmacology and Toxicology. En: *Cancer Immunotherapy* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado el 11 de agosto de 2022]. p. 149–66. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123725516500730>
32. Mangipudy R, Burkhardt J, Kadambi VJ. Use of animals for toxicology testing is necessary to ensure patient safety in pharmaceutical development. *Regul Toxicol Pharmacol.* noviembre de 2014;70(2):439–41.
33. Jiménez MR, Repetto M, Kuhn GR. *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos; 2009. 619 p.
34. Klaassen CD, Watkins JB. *Fundamentos de toxicología*. Madrid: McGraw-Hill / Interamerican de España; 2005. 560 p.
35. Repetto Jiménez M, Reppeto Khun G. *Toxicología fundamental* Repetto Jiménez. 4a ed. Díaz de Santos; 2009. 403–466 p.

36. Salsamendi AL de C, Oscoz AA, Royo AGG, Armental AV. Toxicología. Ecoe Ediciones; 2022. 272 p.
37. Gámez R, Mas R, s. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos mas empleados. Rev CENIC Ciencias Bioacutegicas. el 1 de septiembre de 2007;38(3):204–9.
38. Escobar M L, Rivera A, Aristizábal G FA. Estudio comparativo de los métodos de resazurin y mtt en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Vitae Medellín. 2010;67–74.
39. Baldrick P. Genotoxicity test battery – An assessment of its utility in early drug development. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen. agosto de 2021;868–869:503388.
40. Singh G. Preclinical Drug Development. En: Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research [Internet]. Elsevier; 2018 [citado el 22 de agosto de 2022]. p. 47–63. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128021033000043>
41. Martínez-Hidalgo V, Pilar M. ALTERNATIVAS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN TOXICOLOGÍA: SITUACIÓN ACTUAL. Acta Bioethica. junio de 2007;13(1):41–52.
42. Piersma AH. Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing: DEVELOPMENTAL TOXICITY ALTERNATIVE TESTS. Basic Clin Pharmacol Toxicol. el 19 de abril de 2006;98(5):427–31.
43. Hernández M, Ibis R. Métodos Alternativos en Toxicología. Rev CENIC Cienc Biológicas. 2014;45(1):12.
44. OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method [Internet]. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2002 [citado el 24 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en
45. Schlede E, Genschow E, Spielmann H, Stropp G, Kayser D. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD50 test. Regul Toxicol Pharmacol. junio de 2005;42(1):15–23.
46. García-Niño WR, Zazueta Cecilia. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. Pharmacol Res. 2015;97:84–103.

47. Shakeri A, Zirak MR, Sahebkar A. Ellagic Acid: A Logical Lead for Drug Development? *Curr Pharm Des.* el 5 de abril de 2018;24(2):106–22.
48. Tanaka T, Kouno I, Nonaka GI. Biomimetic Synthesis and Related Reactions of Ellagitannins. En: Poupon E, Nay B, editores. *Biomimetic Organic Synthesis* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011 [citado el 26 de agosto de 2022]. p. 637–75. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527634606.ch17>
49. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Ellagitannins as Active Constituents of Medicinal Plants. *Planta Med.* abril de 1989;55(02):117–22.
50. Jourdes M, Pouységu L, Deffieux D, Teissedre PL, Quideau S. Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. En: Ramawat KG, Mérillon JM, editores. *Natural Products* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [citado el 26 de agosto de 2022]. p. 1975–2010. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-22144-6_65
51. Alfei S, Marengo B, Zuccari G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxidants.* el 4 de agosto de 2020;9(8):707.
52. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int.* junio de 2011;44(5):1150–60.
53. Ríos JL, Giner RM, Marín M, Recio MC. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med.* octubre de 2018;84(15):1068–93.
54. Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS, Caroca R, Lazo-Vélez MA, Antonyak H, et al. Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev.* el 21 de febrero de 2022;2022:e3848084.
55. Baek B, Lee SH, Kim K, Lim HW, Lim CJ. Ellagic acid plays a protective role against UV-B-induced oxidative stress by up-regulating antioxidant components in human dermal fibroblasts. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2016;20(3):269.
56. Ríos JL, Giner R, Marín M, Recio M. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med.* octubre de 2018;84(15):1068–93.
57. Alfei S, Turrini F, Catena S, Zunin P, Grilli M, Pittaluga AM, et al. Ellagic acid a multi-target bioactive compound for drug discovery in CNS? A narrative review. *Eur J Med Chem.* diciembre de 2019;183:111724.
58. Lorenzo JM, Munekata PE, Putnik P, Kovačević DB, Muchenje V, Barba FJ. Sources, Chemistry, and Biological Potential of Ellagitannins and Ellagic Acid Derivatives. En: *Studies in Natural Products Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2019

[citado el 27 de agosto de 2022]. p. 189–221. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444641816000061>

59. Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. En: Gupta SC, Prasad S, Aggarwal BB, editores. *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado el 25 de agosto de 2022]. p. 473–9. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 928). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41334-1_20
60. Jordão J, Porto H, Lopes F, Batista A, Rocha M. Protective Effects of Ellagic Acid on Cardiovascular Injuries Caused by Hypertension in Rats. *Planta Med.* julio de 2017;83(10):830–6.
61. Abuelsaad ASA, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life Sci.* noviembre de 2013;93(20):714–22.
62. Johana Ortega Villalba K, Vaillant Barka F, Vélez Pasos C, Emilio Rodríguez P. Food Ellagitannins: Structure, Metabolomic Fate, and Biological Properties. En: Aires A, editor. *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge* [Internet]. IntechOpen; 2020 [citado el 5 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/tannins-structural-properties-biological-properties-and-current-knowledge/food-ellagitannins-structure-metabolomic-fate-and-biological-properties>
63. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res.* septiembre de 2009;53(S2):S310–29.
64. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects: Pharmacological aspects of tannins. *Br J Pharmacol.* junio de 2017;174(11):1244–62.
65. Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D. Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay. *J Agric Food Chem.* el 11 de noviembre de 2009;57(21):10181–6.
66. Aguilar-Zarate P, Wong-Paz JE, Buenrostro-Figueroa JJ, Ascacio JA, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN. Ellagitannins: Bioavailability, Purification and Biotechnological Degradation [Internet]. Bentham Science Publishers; 2018 [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2018/00000018/00000015/art00004>

67. 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.
68. 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 Mechanisms. *Adv Nutr.* el 1 de septiembre de 2016;7(5):961–72.
69. 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.* el 1 de agosto de 2004;43(4):205–20.
70. 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.* el 1 de octubre de 2006;136(10):2481–5.
71. 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.* el 13 de junio de 2012;60(23):5749–54.
72. 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.* octubre de 2004;348(1–2):63–8.
73. 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.* el 1 de diciembre de 2007;55(25):10476–85.
74. 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.* el 22 de octubre de 2014;62(42):10264–73.
75. 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.* el 18 de noviembre de 2014;19(11):18923–35.
76. González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MÁ, Tomé-Carneiro J, Zafrilla P, Mulero J, et al. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *J Funct Foods.* diciembre de 2015;19:225–35.
77. 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 metabolites

- revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food Funct.* 2018;9(8):4100–6.
78. kreidler M. FDA Warning Letter to Best on Earth Products | Quackwatch [Internet]. 2008 [citado el 11 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://quackwatch.org/cases/fdawarning/prod/fda-warning-letters-about-products-2008/best_on_earth/
 79. 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.* abril de 2010;27(4):250–5.
 80. 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.* septiembre de 2012;66(3):235–42.
 81. Stafford HA. The Evolution of Phenolics in Plants. En: *Recent Advances in Phytochemistry* [Internet]. Elsevier; 2000 [citado el 11 de septiembre de 2022]. p. 25–54. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079992000800039>
 82. Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes. *J Agric Food Chem.* el 1 de agosto de 2003;51(18):5497–503.
- 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.* julio de 2016;202:59–69.
84. 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.* abril de 2010;119(4):1497–501.
 85. Akbarpour V, Hemmati K, Sharifani M. Physical and Chemical Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit in Maturation Stage. el 30 de noviembre de 2008;6.
 86. Daniel EM, Krupnick AS, Heur YH, Blinzler JA, Nims RW, Stoner GD. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J Food Compos Anal.* diciembre de 1989;2(4):338–49.
 87. Soong Y, Barlow P. 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.* agosto de 2006;97(3):524–30.

88. Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). *J Agric Food Chem.* el 1 de octubre de 2004;52(20):6178–87.
89. 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.* el 1 de septiembre de 1998;46(9):3635–42.
90. Glabasnia A, Hofmann T. Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European Oak Wood (*Quercus robur* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. *J Agric Food Chem.* el 1 de mayo de 2006;54(9):3380–90.
91. 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: Liquid Chromatography. *J Sep Sci.* mayo de 2010;33(9):1204–15.
92. Jadhav R, Puchchakayala G. HYPOGLYCEMIC AND ANTIDIABETIC ACTIVITY OF FLAVONOIDS: BOSWELLIC ACID, ELLAGIC ACID, QUERCETIN, RUTIN ON STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE INDUCED TYPE 2 DIABETIC RATS. el 1 de enero de 2012;4(2):8.
93. Bhandary S, Sherly S, Kumari S, Bhat V. 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.* el 8 de agosto de 2013;Vol 6:192–8.
94. 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.* marzo de 2008;46(3):1119–24.
95. Wang H, Sui H, Zhu B. Ellagic acid, a plant phenolic compound, activates cyclooxygenase-mediated prostaglandin production. *Exp Ther Med [Internet].* el 13 de junio de 2019 [citado el 22 de septiembre de 2022]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.7667>
96. 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.* octubre de 2017;108:289–97.
97. 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):1600830.

98. 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.* el 13 de noviembre de 2013;61(45):10720–9.
99. 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.* marzo de 1986;2(1):53–62.
100. Enioutina EY, Job KM, Krepkova LV, Reed MD, Sherwin CM. How can we improve the safe use of herbal medicine and other natural products? A clinical pharmacologist mission. *Expert Rev Clin Pharmacol.* el 1 de septiembre de 2020;13(9):935–44.
101. 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-κB signaling in carbon tetrachloride induced rats. *Mol Biol Rep.* octubre de 2020;47(10):7959–70.
102. Cengiz M, Ali J, Kutlu H, Ayhanci A, Vejselova D. Potential Recruiting and Hepatoprotective Effects of Ellagic Acid in D-Galactosamine-Induced Liver Damage in Rats. *Pak J Zool.* el 27 de julio de 2017;49.
103. 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.* mayo de 2019;225:8–19.
104. Liu QS, Li SR, 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):1600587.
105. Zhang Y, Zhu K, Cui H, Liu Y, Lu YF, Pan HW, et al. Toxicological evaluation of *Oviductus ranae*: Acute, sub-acute and genotoxicity studies in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* mayo de 2017;203:101–9.
106. Gámez R, Mas R, s. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Rev CENIC Ciencias Bioacutegicas.* el 1 de septiembre de 2007;38(3):204–9.
107. 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.
108. 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.
109. 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-Ay mice. *Biochem Biophys Res Commun.* mayo de 2013;434(3):486–91.

110. Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C. Biochemical and Ultrastructural Lung Damage Induced by Rhabdomyolysis in the Rat. *Exp Biol Med.* septiembre de 2006;231(8):1430–8.
111. Wang H, Sui H, Zhu B. Ellagic acid, a plant phenolic compound, activates cyclooxygenase-mediated prostaglandin production. *Exp Ther Med [Internet].* el 13 de junio de 2019 [citado el 22 de septiembre de 2022]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.7667>
112. Li Y, Xia W, Zhao F, Wen Z, Zhang A, Huang S, et al. Prostaglandins in the pathogenesis of kidney diseases. *Oncotarget.* el 29 de mayo de 2018;9(41):26586–602.
113. 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.
114. White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *The Lancet.* agosto de 2008;372(9638):570–84.
115. Spigoni V, Mena P, Cito M, Fantuzzi F, Bonadonna R, Brighenti F, et al. Effects on Nitric Oxide Production of Urolithins, Gut-Derived Ellagitannin Metabolites, in Human Aortic Endothelial Cells. *Molecules.* el 2 de agosto de 2016;21(8):1009.
116. Filippo CD, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M. Oxidative Stress as the Leading Cause of Acute Myocardial Infarction in Diabetics. *Cardiovasc Drug Rev.* junio de 2006;24(2):77–87.
117. Orozco B. R. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (ECV) EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC). *Rev Médica Clínica Las Condes.* marzo de 2015;26(2):142–55.
118. S.A., Cozzi, M., Bush, E.L., Rabb, H., 2018. Distant Organ Dysfunction in Acute Kidney Injury: A Review. *American Journal of Kidney Diseases* 72, 846–856. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.03.028>.
119. 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 Mechanisms. *Adv Nutr.* el 1 de septiembre de 2016;7(5):961–72.
120. Kuriyama S. The Relation between Green Tea Consumption and Cardiovascular Disease as Evidenced by Epidemiological Studies. *J Nutr.* el 1 de agosto de 2008;138(8):1548S-1553S.

121. Bajpai M, Pande A, Tewari SK, Prakash D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr.* enero de 2005;56(4):287–91.
122. Dwivedi S, Jauhari R. Beneficial effects of Terminalia arjuna in coronary artery disease. el 20 de septiembre de 1997 [citado el 27 de octubre de 2022]; Disponible en: <https://imsear.searo.who.int/jspui/handle/123456789/3495>
123. Research C for DE and. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2018 [citado el 27 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>