

Influencia del vehículo en la toxicidad aguda oral de la vainillina en ratas Sprague Dawley

Influence of the vehicle in the oral acute toxicity of vainillin in Sprague Dawley rats

MSc. Yoagne María Trapero Quintana,^I MSc. Martha Estrella García Pérez,^{II} MSc. Lizet Aldana Velazco,^{III} Dra. C. María Antonia Torres Alemán^{IV}

^I Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Facultad de Farmacia. Universidad Laval. Quebec, Canadá.

^{III} Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

^{IV} Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la vainillina se ha propuesto como candidato terapéutico en el tratamiento de la anemia drepanocítica, enfermedad para la cual no existe tratamiento efectivo. En los estudios de toxicidad aguda oral, la elección del vehículo es un factor muy importante, principalmente cuando el producto es poco soluble en agua.

Objetivo: evaluar la influencia del dimetilsulfóxido y del aceite de almendras, utilizados como vehículos en la toxicidad aguda oral de la vainillina en ratas Sprague Dawley.

Métodos: se administró la vainillina por intubación intragástrica (gavage) a las concentraciones de dosis de 0,33-2 000 mg/kg; las ratas fueron observadas 14 días.

Resultados: el dimetilsulfóxido no causó ninguna mortalidad, mientras que esta se observó en las ratas que recibían 2 000 mg/kg de vainillina disuelta en dimetilsulfóxido. Los resultados del análisis macroscópico revelaron que estos animales presentaron autólisis y enteritis catarral, mientras que los que recibieron la vainillina disuelta en aceite de almendras manifestaron esteatosis centrolobulillar a nivel hepático.

Conclusiones: los resultados indican la importancia de una buena selección del vehículo y cómo puede influir en la interpretación toxicológica de estos. Al ser los estudios preclínico-toxicológicos, en especial, los que garantizan la inocuidad y el máximo grado

de seguridad de un producto, la vainillina no es completamente inocua cuando se administra por vía oral en roedores y los efectos observados dependen de una buena selección del vehículo a utilizar en los estudios preclínicos.

Palabras clave: vehículo, vainillina, toxicidad aguda oral.

ABSTRACT

Introduction: vainillin has been proposed as therapeutic candidate in sickle-cell anaemia treatment, a disease for which effective treatment does not exist. In the studies of oral acute toxicity, the election of the vehicle is a very important factor, mainly when the product is poorly soluble in water.

Objective: to evaluate the influence of dimethylsulfoxide and almond oil used as vehicles in the oral acute toxicity of vainillin in Sprague Dawley rats.

Methods: vainillin was administered by gavage at concentrations of 0,33-2 000 mg/kg. Rats were observed during 14 days for signs of toxicity.

Results: almond oil did not cause lethality, whereas mortality was observed in the rats receiving 2 000 mg/kg of vanillin dissolved in dimethylsulfoxide. The macroscopic analysis revealed that these animals presented autolysis and catarrhal enteritis while those receiving vanillin dissolved in almond oil showed steatorrhoeic hepatosis.

Conclusions: this investigation proved the importance of a good selection of the vehicle and how it can influence in the toxicological interpretation of results. Since the preclinical studies are intended to guarantee the harmlessness and the maximum degree of safety of a product, it was concluded that in such circumstances, vainillin is not completely innocuous when administered by oral route to rodents. The observed effects depend on the proper selection of the vehicle to use in the preclinical studies.

Key words: vehicle, vainillin, oral acute toxicity.

INTRODUCCIÓN

La anemia drepanocítica o hemoglobinopatía SS, es una anemia hemolítica congénita caracterizada por la presencia en la sangre de numerosos glóbulos rojos de formas anormales, más rígidos que los de un individuo normal.¹ Hasta el momento no se conoce una terapia efectiva para esta enfermedad, reduciéndose solamente al tratamiento de los síntomas. Esta enfermedad se considera un problema de salud pública a escala global. En Cuba afecta al 3,1 % de la población. La incidencia en pacientes de raza negra en la región oriental y occidental del país es de 10,6 y 3,04 % respectivamente.^{2,3}

El Centro de Biofísica Médica de Santiago de Cuba, trabaja en el diagnóstico y búsqueda de tratamientos efectivos para contrarrestar esta enfermedad investigando

de forma particular al 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina), aldehído aromático capaz de inhibir la polimerización de la desoxihemoglobina S (dHbS) mediante prevención de contactos intermoleculares entre las moléculas de hemoglobina (Hb).⁴ Este compuesto se ha convertido en uno de los candidatos terapéuticos de mayor interés a nivel mundial. Se ha comprobado su actividad farmacológica (antisickling) a través de la medida de los tiempos de relajación magnética por medio de las técnicas de resonancia magnética nuclear RMN⁵ y por microscopía electrónica de transmisión.⁶ La vainillina, se ha empleado como aditivo alimenticio desde el siglo XVIII, sin embargo, su utilización directamente en el ser humano como fármaco no está informada en la literatura.

La evaluación toxicológica oral de un nuevo candidato antidrepanocitario es crucial, considerando la cantidad importante de fármaco que se requiere para interactuar estéreo específicamente con la gran cantidad de Hb presente en los pacientes.⁷ Sin embargo, los resultados de los estudios toxicológicos dependen de las características farmacocinéticas del producto. Según resultados de diversas investigaciones, la biodisponibilidad oral de la vainillina cambia bajo la influencia de los vehículos. Así, la biodisponibilidad de la vainillina en ratas Sprague Dawley fue de 7,6 % cuando fue administrada por vía oral, en un vehículo que contenía cremophor, etanol y solución salina;⁸ mientras que en las ratas Wistar su biodisponibilidad fue de un 41 % disuelto en una solución de 0,5 % (w/v) de carboximetilcelulosa.⁹ Estos resultados sugieren que las características del vehículo podrían afectar la evaluación de la toxicidad aguda oral de esta sustancia.

Los estudios toxicológicos demuestran que la dosis letal media (LD_{50}) de la vainillina en animales es de 3 000 mg/kg para los conejos,¹⁰ 1 580-2 800 mg/kg para las ratas¹¹ y 1 400 mg/kg para los cerdos,¹² lo que indica la toxicidad oral baja para estas especies. Sin embargo, en estos estudios la vainillina fue introducida en el alimento y no hay manera de saber cuánto ingirieron los animales individualmente, de tal modo que causó dificultades con la valoración de la dosis real. Otros estudios toxicológicos son necesarios para evaluar la toxicidad aguda oral de la vainillina usando otros métodos para la estimación exacta de la dosis. Para superar este problema, a los animales se les puede administrar la vainillina por administración intragástrica (gavage).

La solubilidad limitada de la vainillina en agua nos obliga a considerar emulsiones y soluciones en aceites como vehículos para administrar las dosis capaces de demostrar efectos tóxicos. El propósito de este estudio es evaluar la influencia del vehículo del dimetilsulfóxido (DMSO) y aceite de almendras (AcA) en la toxicidad aguda oral de la vainillina en ratas Sprague Dawley.

MÉTODOS

Animales. Ratas Sprague Dawley , producidas por la División de Roedores Gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), adultos jóvenes entre 6 y 7 semanas (de ambos sexos), en un rango de peso entre los 170 a 200 g. Las hembras nulíparas y no grávidas. Los animales se recibieron con certificado de salud que garantizó su calidad SPF. Las condiciones ambientales fueron: temperatura: $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$; humedad relativa: 60-70 %; fotoperíodo: ciclo de 12 h luz en 24 h. Los animales se sometieron a un período de

readaptación de 6 días y se distribuyeron aleatoriamente, en grupos de tres y dos. El agua y alimento *ad libitum* (fórmula EMO: 1001) esterilizados por calor húmedo.

Sustancias químicas. 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (99,9 %), fabricada por Dallant, SA, España. Los vehículos usados fueron: AcA refinado calidad farmacológica , fabricado por Fravap, Alemania y DMSO (> 99,9 %) fabricado por Sigma-Aldrich.

Lugar del ensayo. La toxicidad aguda oral usando como vehículo el DMSO, se realizó en el Centro de Toxicología Experimental, CETEX en la Sala Protegida # 4, del CENPALAB, y la toxicidad aguda oral usando como vehículo AcA, se realizó en el Centro de Toxicología y Biomedicina de Santiago de Cuba, laboratorio de Toxicología General y Farmacología. Estas salas fueron sometidas previo al comienzo del estudio, a la desinfección mecánica y química empleando para ello Tego 51 al 1 %.

Diseño experimental. Se realizó una administración única por vía oral, previo ayuno de 12 a 18 h esta se administró mediante gavage con ayuda de una cánula metálica y con jeringuillas plásticas desechables. La vainillina se preparó antes de la administración y disolvió en los vehículos, AcA y DMSO, ambos para una concentración final 0,5 %. Las dosis seleccionadas para estos estudios fueron de 0,33; 300; 500; 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal, un grupo control (agua destilada) y un grupo con el vehículo. Durante este período los animales se observaron diariamente a fin de determinar muerte, o algún síntoma de toxicidad, describiendo duración e intensidad de estos en caso de que apareciesen, así como se midió el peso corporal los días 0, 7 y 14 del ensayo siempre a la misma hora de la mañana. Se practicó necropsia al finalizar el estudio. El sacrificio se realizó por dislocación atlanto-axoidea, previo desangrado por la vena femoral de los animales anestesiados con éter. Se efectuó examen macroscópico para detectar cualquier alteración en los órganos parenquimatosos.

El análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete estadístico SPSS, tomando un nivel $p < 0,05$ para la aceptación e interpretación de los resultados. Se calcularon las medias y desviaciones estándar de los pesos corporales.

RESULTADOS

Toxicidad aguda oral usando como vehículo el dimetilsulfóxido

Evaluación clínica. En todos los grupos la administración fue normal.

Los signos y síntomas clínicos observados en los animales a las dosis ensayadas fueron: cambio en el comportamiento, con incoordinación motora, letargo y caída en posición lateral, sin respuesta al estímulo del sobresalto. Se observaron además las orejas pálidas.

Los animales del grupo de dosis 2 000 mg/kg de peso corporal se mostraron postrados (letargo) y caída en posición lateral. A los 12 min de administrado el producto, murió el primer animal de este grupo, los próximos murieron a los 14 min, luego dos a los 39 min; se observaron en todos los animales salida del producto por fosas nasales y vía oral. Cinco horas después de la administración se detectó muerto a un animal del grupo de dosis 1 000 mg/kg de peso corporal. Al día siguiente a la administración

todos los animales se hallaban recuperados, excepto el último del grupo de 2 000 mg/kg de peso corporal, que murió a las 24 h con 21 min posteriores a la administración. En este momento se observaron secreciones de color amarillento por el recto.

Comportamiento del peso corporal. En la [figura 1](#) se puede observar el comportamiento de la media de los pesos de las hembras y los machos en los días 0, 7 y 14. Se mostró un incremento de esta variable en el tiempo para las diferentes concentraciones de dosis y el grupo control.

Evaluación anatopatológica. Todos los animales del grupo de dosis 2 000 mg/kg murieron posterior a la administración. Se les realizó la necropsia completa; se observó en los animales congestión y hemorragia en órganos parenquimatosos y gastroenteritis hemorrágica con distención intestinal por abundante líquido. A las 24 h de la administración se encontró muerto el último animal; al realizar la necropsia se observó autolisis, estómago con sangre digerida y enteritis catarral. En todos los animales se observaron en estómago e intestino delgado, extracción de líquido a la luz intestinal, lesión de la mucosa y hemorragia. La causa de muerte fue paro respiratorio. El animal del grupo de dosis 1 000 mg/kg de peso corporal muerto a las 5 h después de administrado presentó pulmones, hígado y bazos congestionados, además estómago con contenido de la sustancia que ocupa todo el intestino hasta el ciego.

El último día del estudio se realizó la necropsia a los restantes animales del ensayo, mediante un procedimiento completo de superficies, mucosas, cavidades y sus extremidades. No se observaron lesiones tóxicas provocadas por el producto de ensayo, en ninguno de los animales de los diferentes grupos experimentales.

Toxicidad aguda oral usando como vehículo aceite de almendra

Evaluación clínica. En todos los grupos la administración fue normal.

Los signos y síntomas clínicos observados en los animales a las dosis de 0,33 y 300 mg/kg de peso corporal fueron decremento de la actividad motora espontánea, balanceos, caída en posición lateral, somnolencia y disminución de los reflejos. A las dosis superiores los animales presentaron: somnolencia, disnea, decremento de la actividad motora espontánea, disminución de los reflejos, catalepsia, piloerección y diarrea. En este estudio no hubo muerte a ninguna de las dosis ensayadas, los días posteriores a la administración los animales presentaron comportamiento y hábitos normales, aunque en los animales de los grupos de dosis de 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal persistió en ellos la piloerección y agrupación en la esquina de la caja.

Comportamiento del peso corporal. En la [figura 2](#) se puede observar el comportamiento de la media de los pesos de las hembras y los machos en los días 1, 7 y 14. Se muestra un incremento de esta variable en el tiempo para los diferentes niveles de dosis y el grupo control.

Evaluación anatopatológica. El día final del ensayo (a los 14 días). Los animales sometidos a la administración de la vainillina, a las diferentes concentraciones de dosis, no manifestaron alteraciones anatopatológicas. Los hallazgos morfohistopatológicos a nivel hepático se caracterizaron por esteatosis centrolobulillar de ligera a moderada en algunos animales en todos los diferentes niveles de dosis y el grupo vehículo.

DISCUSIÓN

En el desarrollo de un fármaco existen muchos retos; entre los más comunes se encuentran la solubilidad, la absorción y la biodisponibilidad. Los compuestos ensayados con fines farmacéuticos y que presentan una pobre solubilidad y/o absorción traen como resultado un fracaso en la toxicidad y la incapacidad de obtener márgenes de seguridad y dosis máxima tolerada, características estas desfavorables en la estimación del riesgo.

En este trabajo se comparan los efectos de la vainillina por vía oral (gavage) con vehículos diferentes (DMSO y AcA) y cómo la interpretación de los resultados en ambos puede llevar a una clasificación distinta de la toxicidad del producto por influencia del vehículo. En ambos estudios se observaron signos clínicos que pudieran estar relacionados con la toxicidad inherente a la sustancia, debido a que los animales del grupo (vehículo) mostraron una recuperación más rápida que las restantes concentraciones de dosis.

Los datos de toxicidad aguda oral de una sustancia de prueba se utilizan para satisfacer los requisitos de clasificación del peligro para su valoración de riesgo en la salud humana y el ambiente.¹³ Sin embargo, son influenciados por las características químicas del producto y en el caso de compuestos poco solubles en agua, la opción del vehículo se debe considerar cuidadosamente, para obtener dosis y márgenes de seguridad máximos tolerados, lo que permitió la evaluación correcta del riesgo.

Los animales del grupo control de ambos estudios mostraron patrones de comportamiento normal, 2 h después de la administración, mientras que los que recibieron DMSO disminuyeron la actividad locomotora, letargo y baja respuesta al estímulo, y los que recibieron AcA, disminuyeron la actividad locomotora, baja respuesta a los estímulos y diarrea, lo cual sugiere que los vehículos indujeron una cierta toxicidad en los animales. Después de cinco horas, estas muestras de toxicidad desaparecieron. No se descarta que el estrés que provoca la excesiva manipulación y la administración, estén en relación con los resultados obtenidos.

La evaluación de la toxicidad aguda oral de la vainillina, administrada por gavage, usando diversos vehículos, DMSO y AcA, fue medida por la mortalidad, los cambios del peso corporal y los exámenes histopatológicos. En los estudios, los síntomas de toxicidad fueron observados, principalmente en las concentraciones de dosis más altas. Esta toxicidad fue atribuida a la toxicidad inherente de la vainillina y a su interacción con el vehículo. El análisis estadístico del peso corporal para el sistema de experimentos no demostró diferencias significativas entre los grupos tratados y sus controles respectivos ($p > 0,05$). La esteatosis centrolobulillar moderada observada a nivel hepático en los animales que recibieron la vainillina con AcA como vehículo, sugiere que esta alteración macroscópica puede ser debido a este solvente y no a un daño tóxico inducido por la vainillina.

Cuando los resultados de ambos sistemas de experimentos fueron comparados principalmente con la dosis de 2 000 mg/kg, fue posible observar la influencia significativa del vehículo en la toxicidad aguda oral de la vainillina. Aunque algunos estudios demuestran que DMSO no refuerza la absorción y la distribución en los tejidos

de los compuestos hidrofóbicos,^{14,15} se acepta extensamente que este solvente presenta una gran capacidad de pasar a través de las membranas y puede llevar otros fármacos con él.^{16,17} No se encontró ninguna notificación de estudios farmacocinéticos de la vainillina administrada por vía oral disuelta en DMSO, pero los resultados de esta investigación sugieren que este solvente podría realzar su biodisponibilidad y proporcionar efectos tóxicos, principalmente a una dosis alta.

En el caso de AcA, por sus características lipofílicas, se debe esperar que la vainillina sea bien absorbida después de la administración. Sin embargo, aunque un aumento de la solubilidad del vehículo aumenta generalmente la absorción de productos químicos, los vehículos extremadamente liposolubles pueden disolverse mal en los líquidos gastrointestinales, y su absorción y biodisponibilidad correspondientes serían bajas.¹⁸ Una pobre biodisponibilidad oral por lo tanto, trae como resultado concentraciones químicas en plasma mal controladas y dan lugar a que los efectos tóxicos puedan ser bajos.¹⁷ Este hecho podría justificar las diferencias observadas en la toxicidad aguda oral de la vainillina cuando es disuelta en AcA y en DMSO.

Los resultados de esta investigación son similares a algunos resultados divulgados en la literatura, que también demuestran que la toxicidad y la biodisponibilidad de una sustancia de prueba pueden ser más altas cuando son administrados con DMSO con respecto a otros vehículos. En ratones tratados con diphenyl diselenide (PhSe_2) administrados por vía oral se demostró que los que recibían este compuesto disuelto en DMSO presentaron concentraciones plasmáticas más altas de los que recibían (PhSe_2) disuelto en aceite de canola.¹⁹

En conclusión, los resultados demuestran que la toxicidad aguda por vía oral de la vainillina es dependiente de las características del vehículo; además no es totalmente inocua cuando está administrada por vía oral a dosis altas en ratas Sprague Dawley. Sin embargo, las evaluaciones toxicológicas adicionales que implican determinaciones hematológicas y bioquímicas serán recomendables para una comprensión mejor de la toxicidad de la vainillina por esta vía de administración en ratas Sprague Dawley.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Serjeant GR. Sickle Cell Disease. 2nd ed. Oxford: Medical Publications; 1992. p. 56, 61, 71-7, 120-366.
2. Colombo B, Guerchicoff E, Martínez G. Genética y clínica de las hemoglobinas humanas. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1993. p.146-95.
3. Espinosa E. La anemia drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1996;12(2):97-105.
4. Toro del G, Pozo AR, Rodríguez JC, Fernández AA, Soler C. Influencia del 4-hidrox-3-metoxibenzaldehído (vainillina) en la polimerización de la hemoglobina S (HbS). Rev Cubana Quím. 2002;14:59-64.
5. Toro del G, Falcón JE, Alonso Y, Valdés YC, Cabal CA. Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. Bioquímica. 2003;28(4):4-10.

6. Toro del G, Valdés YC, Rosa MC de la, Falcón V, Cabal CA. Actividad antidepresiva de la vainillina sobre hematíes de un paciente con drepanocitemia por microscopía electrónica de transmisión. *Bioquímica*. 2004;29(1):5-10.
7. Abraham DJ, Mehanna AS, Wireko FC, Whitney J, Thomas RP, Orringer EP. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood*. 1991;77:1334-41.
8. Beaudry F, Ross A, Lema P, Vachon P. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res*. 2010;24:525-30. doi: 10.1002/ptr.2975.
9. Trapero Y, González C, Olivera L. Influencia de vehículos en la farmacocinética a dosis única de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído). *Bioquímica*. 2007 Ene-Mar;32(1):5-9.
10. Deichmann W, Kitzmiller KV. Toxicity of vanillin and ethyl vanillin for rabbits and rats. *J Am Pharm Assoc*. 1940;29:425-8.
11. Hagan EC. Food flavorings and compounds of related structure. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol*. 1967;5:141-7.
12. Kirwin CJ, Galvin JB. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. 4 th ed. New York: John Wiley & Sons; 1993. p. 445-525.
13. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 24, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2001.
14. Egorin JM, Kaplan RS, Salzman M, Aisner J, Colvin M, Wiernik PH, et al. Cyclophosphamide plasma and cerebrospinal fluid kinetics with and without dimethyl sulfoxide. *Clin Pharmacol Therap*. 1982;32:122-8.
15. Rubinstein E, Lev-El A. The effect of dimethyl sulfoxide on tissue distribution of gentamicin. *Experientia*. 1980;36:92-3.
16. Watanabe E, Sudo R, Takahashi M, Hayashi M. Evaluation of absorbability of poorly-water soluble drugs: validity of the use of additives. *Biol Pharm Bull*. 2000;23:838-43.
17. Dirikolu L, Ross A, Lema P, Vachon P. Synthesis and detection of toltrazuril sulfone and its pharmacokinetics in horses following administration in dimethylsulfoxide. *J Vet Pharmacol Therap*. 2009;32:368-78.
18. Houston JB, Upshall GG, Bridges JW. A re-evaluation of the importance of partition coefficients in the gastrointestinal absorption of nutrients. *J Pharmacol Experimen Therap*. 1974;189:244-54.
19. Prigo M, Schumacher RF, Wayne NC, Zeni G. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicology Letters*. 2009;189:135-9.

Recibido: 7 de junio de 2012.
Aprobado: 16 de julio de 2012.

Yoagne María Trapero Quintana. Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente.
Patricio Lumumba s/n. CP 90500. Santiago de Cuba, Cuba. Correo
electrónico: ymtquin@infomed.sld.cu

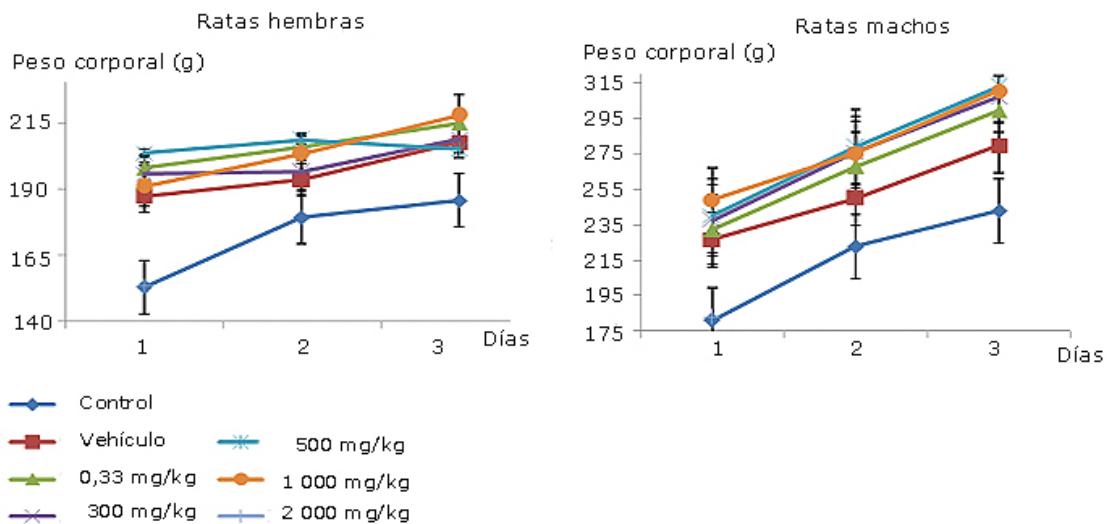


Fig. 1. Comportamiento del peso corporal de ratas Sprague Dowley administradas con vainillina disuelta en DMSO, a diferentes dosis durante 14 días (1: día 1; 2: día 7; 3: día 14).

[Regresar](#)

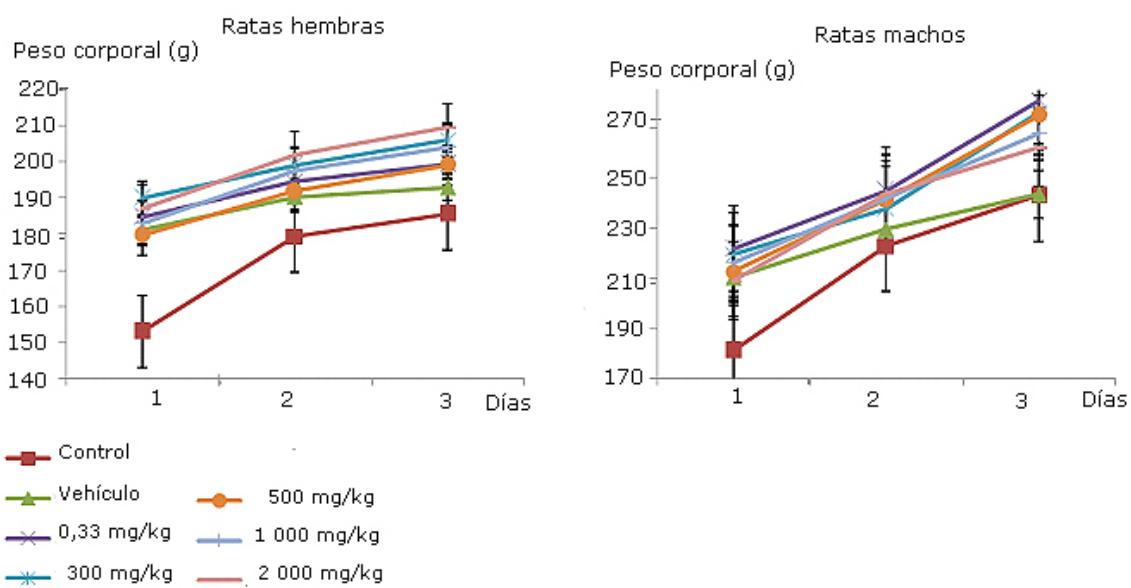


Fig. 2. Comportamiento del peso corporal de ratas Sprague Dowley administradas con vainillina disuelta en AcA, a diferentes dosis durante 14 días (1: día 1; 2: día 7; 3: día 14).

[Regresar](#)