

**Universidad de Oriente
Centro de Biofísica Médica**

**FARMACOCINÉTICA Y TOXICOLOGÍA DEL
4-HIDROXI-3-METOXIBENZALDEHÍDO (VAINILLINA) EN MODELOS
*IN VIVO.***

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud.

Yoagne Maria Trapero Quintana

**La Habana
2013**

**Universidad de Oriente
Centro de Biofísica Médica**

**FARMACOCINÉTICA Y TOXICOLOGÍA DEL
4-HIDROXI-3-METOXIBENZALDEHÍDO (VAINILLINA) EN MODELOS
*IN VIVO.***

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud.

Autor: MSc. Yoagne Maria Trapero Quintana

Tutor: Dra C. Maria Antonia Torres Alemán
Asesor: Dr. Carlos Alberto González Delgado

**La Habana
2013**

AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil en unas líneas agradecer a todas las personas que se involucran de diferentes formas en un trabajo de esta magnitud, para al final, llevarlo a feliz término. Necesitaría muchas cuartillas para expresar mi gratitud, no es mi intención olvidar a nadie.

A mis padres, Damian, hermano, a mi familia, por su apoyo incondicional, por confiar en mí, y brindarme en todo momento la fuerza, energías y seguridad para seguir adelante en los momentos más difíciles, pues no hubiera sido posible llegar al final sin ellos.

A la Dra. Maria Antonia Torres Alemán por sus oportunos consejos, experiencia y orientaciones para la culminación exitosa de la tesis.

Al Dr. Carlos González Delgado (chacho), quien me enseñó el camino de la farmacocinética, con quien compartí horas de investigación y aprendí lo bonito de la experimentación.

A mis amigos los que están cerca y los que no lo están, pero de los que nunca me ha faltado el apoyo y el empuje para seguir adelante. A Grisel por estar siempre, a Lourdes por su colaboración y respaldo.

A los compañeros de Biofísica Médica que siempre me apoyaron y no dejaron de creer en que se podía lograr. A Cary Paz por su ayuda desinteresada.

A los trabajadores de todos los centros en los que realicé las investigaciones y de los que siempre tuve apoyo y disposición para ayudar, (CENATOX, CIDEM (mercolo), CENPALAB, Laboratorio antidoping, CENTIS).

A Hervé Saint-Jalmes por comprar y enviar los reactivos, cuando la tesis parecía no tener salida.

A las oponentes de la predefensa, las doctoras Isis Bermudez Camps y Bárbara Navarro González y a todas las personas que dedicaron parte de su tiempo para la revisión de este trabajo.

A todas las personas que me han ayudado con la impresión y encuadernación de la tesis.

A todos, MUCHAS GRACIAS

*A mis padres, hermano
y Damian*

SÍNTESIS

La vainillina es un aldehído aromático con potencialidades para el tratamiento de la anemia drepanocítica: enfermedad de alta prevalencia sin tratamiento efectivo. Se presentan resultados relacionados con la evaluación preclínica de la vainillina; la búsqueda de un vehículo adecuado para estos estudios, el comportamiento farmacocinético en plasma y eritrocitos, la biodistribución; así como, la evaluación de la toxicidad en estudios agudos y subcrónicos *in vivo*. Se demostró que la solución de carboximetilcelulosa al 0,5%, garantiza el nivel adecuado para los estudios toxicológicos y la solución hidroalcohólica al 15% para los farmacocinéticos. Se observó una rápida distribución de la vainillina a los eritrocitos, un volumen de distribución compatible con su biodistribución, fundamentalmente al compartimento vascular. El tiempo de vida media resultó relativamente pequeño con un rápido aclaramiento, y 51% de biodisponibilidad. La vainillina no produjo mortalidad, aunque se observaron lesiones en estómago y riñón. Los principales signos de toxicidad fueron asociados a la depresión del sistema nervioso central. No se apreciaron alteraciones en el crecimiento, consumo de agua y alimentos de los animales, ni cambios en parámetros hematológicos y bioquímicos evaluados. Esto evidencia, que la vainillina no resulta tóxica en las dosis evaluadas para su uso como medicamento.

INDICE	Pág
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISION BIBLIOGRÁFICA	7
I.1 Anemia Hemolítica.	7
I.1.1 Anemia drepanocítica, Polimerización de la hemoglobina S.	7
I.1.2 Polimerización “in vivo”, vasooclusión y crisis dolorosas. Cuadro clínico, incidencia de la enfermedad.	8
I.1.3 Anemia Drepanocítica: Un problema de salud pública y social.	10
I.1.4 Agentes <i>Antisickling</i> o Antidrepanocíticos.	11
I.1.5 Tratamientos, terapia convencional.	12
I.1.6 Búsqueda de nuevos tratamientos efectivos.	13
I.2 Vainillina: origen y producción industrial.	15
I.2.1 Estructura química del 4-hidroxi-3- metoxibenzaldehído (vainillina).	16
I.2.2 Características físico-químicas de la (vainillina).	17
I.2.3 Potencialidades de la vainillina como candidato terapéutico.	18
I.2.3.1 Propiedades antidrepanocíticas.	18
I.2.3.2 Propiedades antimutagénicas.	19
I.2.3.3 Propiedades antineoplásicas.	19
I.2.3.4 Propiedades antioxidantes.	20
I.2.3.5 Propiedades neurodepresivas.	21
I.2.3.6 Propiedades antiinflamatorias.	22
I.3 Integración de la toxicología, la farmacocinética (PK) y la toxicocinética (TK) en estudios con modelos <i>in vivo</i> .	22
I.3.1 Farmacocinética, enfoque poblacional.	24
I.4 Estudios farmacocinéticos de la vainillina.	25
I.4.1 Metabolismo de la vainillina.	26
I.5 Estudios toxicológicos de la vainillina.	27

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
II.1 Reactivos.	29
II.2 Determinación de los niveles plasmáticos de vainillina a partir de la selección del vehículo adecuado para los ensayos preclínicos.	29
II.2.1 Animales de experimentación.	30
II.2.2 Vía de administración y nivel de dosis utilizado.	30
II.2.3 Preparación de las sustancias de ensayo.	31
II.2.4 Diseño experimental.	31
II.2.5 Condiciones cromatográficas y procedimiento de extracción.	33
II.2.6 Análisis farmacocinético.	33
II.3 Estudio farmacocinético de la vainillina administrada por vía endovenosa en ratas Sprague Dawley.	34
II.3.1 Animales de experimentación.	34
II.3.2 Preparación de la sustancia de ensayo.	35
II.3.3 Diseño experimental.	35
II.3.4 Análisis farmacocinético.	36
II.4 Estudio de linealidad cinética de la vainillina administrada por vía endovenosa a perros Beagles.	37
II.4.1 Animales de experimentación.	37
II.4.2 Preparación de la sustancia de ensayo.	38
II.4.3 Diseño experimental.	38
II.4.4 Análisis farmacocinético.	40
II.4.5 Procesamiento estadístico.	40
II.5 Estudios farmacocinéticos de la vainillina marcada con ¹²⁵ I.	40
II.5.1 Procedimiento general de marcaje.	40
II.5.2 Animales de experimentación.	41
II.5.3 Ensayos de la vainillina marcada con ¹²⁵ I administrada por vía oral y endovenosa.	41
II.5.4 Diseño experimental.	42
II.5.5 Procesamiento estadístico.	44
II.5.6 Cálculo de la biodisponibilidad.	44
II.6 Estudios toxicológicos.	45
II.6.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral. Método de clase tóxica aguda (CTA).	45
II.6.1.1 Animales de experimentación.	45

II.6.1.2 Preparación de la sustancia de ensayo.	46
II.6.1.3 Diseño experimental.	46
II.6.1.4 Determinaciones hematológicas y bioquímicas.	47
II.6.1.5 Determinaciones anatomopatológicas.	47
II.6.1.5.1 Examen macroscópico e histopatológico.	47
II.6.1.6 Análisis estadístico.	48
II.6.2 Evaluación de la toxicidad a dosis repetida 90 días.	48
II.6.2.1 Animales de experimentación.	48
II.6.2.2 Preparación de la sustancia.	49
II.6.2.3 Diseño experimental.	50
II.6.2.4 Observaciones realizadas.	50
II.6.2.5 Consumo de agua y alimentos.	51
II.6.2.6 Hematología y bioquímica.	51
II.6.2.7 Anatomía patológica	52
II.6.2.8 Análisis estadístico.	53
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
III.1 Determinación de los niveles plasmáticos de vainillina a partir de la selección del vehículo adecuado para los ensayos preclínicos.	54
III.2 Estudio farmacocinético de la vainillina administrada por vía endovenosa en ratas Sprague–Dawley.	56
III.3 Estudio de linealidad cinética de la vainillina por vía endovenosa en perros Beagles.	58
III.4 Estudios farmacocinéticos de la vainillina marcada con ¹²⁵ I por vía oral y endovenosa.	68
III.4.1 Resultados del marcaje y modelación aplicada.	68
III.4.2 Incorporación en eritrocitos después de la administración endovenosa.	69
III.4.3 Resultados de la modelación farmacocinética después de la administración endovenosa.	70
III.4.4 Resultados de la biodistribución después de la administración endovenosa.	72
III.4.5 Incorporación en eritrocitos después de la administración oral.	73
III.4.6 Resultados de la modelación farmacocinética después de la administración oral.	75
III.4.7 Resultados de biodistribución después de la administración oral.	76
III.4.8 Biodisponibilidad de la vainillina.	77
III.5 Estudios Toxicológicos.	79
III.5.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral. Método de clase tóxica aguda (CTA).	79

III.5.2 Evaluación de la toxicidad a dosis repetida 90 días.	88
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

La anemia drepanocítica (AD) es la anemia hemolítica determinada genéticamente más frecuente en el mundo, ocasionada por una mutación puntual en la posición seis del gen que codifica para la cadena β de la hemoglobina. Esto reduce significativamente la solubilidad de esta proteína y provoca su polimerización. Como consecuencia de ello, los glóbulos rojos aumentan su rigidez y toman forma de hoz. Este padecimiento afecta a millones de personas en todo el mundo, particularmente a los africanos de raza negra, los descendientes afrocaribeños, personas del Mediterráneo, del Medio Oriente y la India (Dick, 2007; Svarch, 2009).

La prevalencia de esta patología depende de características genéticas, condiciones ambientales, nivel de salud pública y social, así como de patrones matrimoniales (Steinberg, 1999; Davies, 1997; Martín *et al.*, 2008). Su frecuencia es mayor en África, el Medio Oriente, sur de Italia y Turquía, norte de Grecia, provincias occidentales de Arabia Saudita e India. Fue trasladada por el comercio de esclavos a Estados Unidos de Norteamérica, América Central, el Caribe y algunos países de América del Sur. En el mundo la frecuencia del estado de portador heterocigótico (AS) es del 7% y cada año nacen de 300 000 - 400 000 niños enfermos. En Estados Unidos es la hemoglobinopatía más frecuente, aproximadamente el 8 % de los afroamericanos porta la mutación. En países de América Latina y el Caribe, existe baja incidencia (Rodríguez *et al.*, 1998; Streetly, 1993; García *et al.*, 2010; Guyton y Hall, 2010). Se considera un problema de salud en Europa, debido a que la inmigración desde países en los que la enfermedad es prevalente, aumentó de manera considerable en los últimos 15 años. En la actualidad, existen en ese continente 1 500 000 portadores de hemoglobina AS (Roberts y De Montalembert, 2007; Svarch *et al.*, 2011).

En Cuba, debido a la alta prevalencia de esta patología, el sistema de salud pública dedica esfuerzos incalculables para el seguimiento de esta enfermedad. El 3,1% de la población está afectada por este tipo de anemia, con una marcada incidencia en la población de las provincias orientales, cuyas cifras oscilan entre el 5,59-10,60%. No

obstante, en las provincias occidentales se sitúa este padecimiento entre el 2,12-3,04 % (Muñiz *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2008; Svarch, 2012).

A pesar del vasto conocimiento que se tiene sobre este padecimiento, en la actualidad no se cuenta con una terapia efectiva (Svarch, 2012). Esta se reduce al tratamiento de los síntomas relacionados a las crisis vasooclusivas acompañadas de úlceras en las piernas, dolores reumáticos, crisis de anemias hemolíticas (Serjeant, 1992). Una de las razones por las cuales no se ha obtenido éxito en el desarrollo de fármacos antidrepanocíticos, es la excesiva cantidad de producto requerida para interactuar de manera estereoespecífica con las moléculas de Hb presentes en el organismo humano (Mehanna, 2001). Aunque numerosos agentes antidrepanocíticos han sido estudiados, hasta el momento la hidroxiurea (HU), es el único fármaco empleado para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, todos los pacientes no responden favorablemente al mismo y algunos no lo toleran debido a sus efectos adversos, tales como neutropenia, reticulocitopenia y la posibilidad de mutagenicidad y carcinogenicidad en terapias largas (Opkala, 2004; Ware, 2010). No obstante, a pesar que la AD se conoce hace más de cuatro siglos, la posibilidad de contar con un tratamiento efectivo sigue siendo una aspiración en el campo médico-farmacéutico. La búsqueda de compuestos que inhiban la formación de polímeros de la desoxihemoglobina S (dHbS) constituye una importante línea de investigación.

En experimentos encaminados a evaluar varios aldehídos para el tratamiento de la anemia drepanocítica, Zaugg (1977) observó la acción antidrepanocítica moderada de la vainillina. La unión covalente de la vainillina con la hemoglobina mutada S (Hb S) provoca un aumento de la afinidad de esta proteína por el oxígeno. Esta unión puede ocurrir tanto en solución como en el interior de los eritrocitos e inhibe la formación de polímeros de Hb S. La interacción no afecta el contenido acuoso e iónico de las células rojas, por lo que este compuesto es un posible candidato a evaluar en el tratamiento de la AD (Abraham *et al.*, 1991).

El 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) es el componente mayoritario de la vainilla natural, la cual es una de las esencias ampliamente utilizada a nivel mundial.

Su fuente natural es *Vanilla planifolia*, aunque se puede encontrar en pequeñas cantidades en otras plantas como el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Makkar y Beeker, 1994). Debido a sus propiedades organolépticas es altamente utilizada como saborizante y aromatizante en las industrias química, alimentaria y farmacéutica. Su elevada demanda en el mercado ha propiciado la búsqueda de fuentes alternativas de obtención, como la síntesis química y la biotecnológica (Barghini, 2007). Este compuesto es reconocido como “seguro” según la Asociación Manufacturera de Extractos y Sabores (FEMA) y se clasifica como aceptado para el consumo (Administración de Fármacos y Alimentos, FDA) (Opdyke, 1977; Mourtzinos *et al.*, 2009). En 1990 fue admitida por la Guía de Nuevos Alimentos Químicos, como una sustancia sintética aromatizante (Feron, 1991). La vainillina utilizada en los estudios es de origen sintético. En el país no se dispone de ella para su explotación como medicamento, por lo que se importa como materia prima.

Además de las acciones antidrepanocíticas demostradas, la vainillina tiene propiedades antioxidantes (Davidson y Naidu, 2000). Esta molécula puede inhibir las reacciones mediadas por peroxinitritos mediante su secuestro (Kumar *et al.*, 2004). Se han descrito los efectos potenciales de la vainillina en la prevención de algunos tipos de tumores, (Liang *et al.*, 2009) (Lirdprapamongkol *et al.*, 2009), así como la inhibición de la mutagénesis inducida por agentes físicos y químicos (Keshava *et al.*, 1998; Shaughnessy *et al.*, 2001). Actualmente se ha demostrado que este benzaldehído tiene una potente actividad antiinflamatoria. (Murakami *et al.*, 2007).

En Cuba, el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente es la institución líder en las investigaciones sobre los efectos terapéuticos de este aldehído, para el tratamiento de esta hemoglobinopatía. En varios estudios se corrobora la actividad antipolimerizante y antidepranocítica de esta sustancia (Abdala *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 1997; Del Toro *et al.*, 2003). Con el análisis crítico de todo lo reportado en la literatura sobre las características y los tratamientos de la AD, es necesario investigar la farmacocinética y la toxicología de la vainillina (estudios preclínicos), para proponer este candidato terapéutico para la AD.

La vainillina es una molécula soluble en compuestos orgánicos, por lo que al ser poco soluble en agua precipita rápidamente y forma cristales, principal problema que presenta en el desarrollo de los estudios preclínicos. Hasta el momento no existe mucha información científica reportada sobre su farmacocinética y de estudios *in vivo* que demuestren su biodisponibilidad.

Un estudio preliminar realizado en perros sugiere que esta molécula presenta una pobre absorción oral y su eliminación plasmática es muy rápida con un tiempo de vida media corto (González *et al.*, 2002). Aunque no se han realizado estudios de biodistribución, se ha comprobado su gran afinidad por la hemoglobina y los eritrocitos, lo que explica la actividad farmacológica (Del Toro *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Los reportes toxicológicos que existen en la literatura son como aditivo alimenticio (Kirwin y Galvin, 1993). No existen ensayos toxicológicos que demuestren su seguridad como medicamento.

Para acelerar el proceso de desarrollo preclínico, se conducen en paralelo los estudios *in vivo* que incluyen los que evalúan los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME). Estos son imprescindibles para un candidato terapéutico que garantizará, la correlación de sus características farmacocinéticas (PK) con sus efectos farmacológicos (estudios de PK/PD) y los estudios primarios de toxicidad.

En este contexto se enmarca la presente investigación, dirigida a la evaluación farmacocinética y toxicológica de la vainillina en animales de laboratorio. Se evalúan diferentes dosis que permiten brindar información sobre el comportamiento de esta molécula, para garantizar su uso farmacológico seguro.

Por todo lo anterior el **problema científico** de la presente investigación radica en que: a partir de la alta incidencia en el mundo y en Cuba de la AD, enfermedad que no cuenta aún con tratamiento efectivo. La vainillina es un aldehído aromático con actividad antidrepanocítica probada, sin embargo, su biodisponibilidad y seguridad como medicamento no está demostrada.

Hipótesis

El 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es confinado al compartimento vascular y es seguro durante su administración en dosis única y repetida por las vía oral y endovenosa, en modelos *in vivo*, por lo que puede ser un candidato terapéutico para la AD.

Objetivo general

Evaluar el comportamiento farmacocinético y toxicológico del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) en modelos *in vivo* a dosis única y repetida.

Objetivos específicos

1. Determinar el vehículo adecuado para los estudios farmacocinéticos y toxicológicos de la vainillina.
2. Caracterizar el comportamiento farmacocinético de la vainillina en plasma, a dosis única y en modelos *in vivo*.
3. Estimar la biodistribución de la (¹²⁵I-vainillina) en ratas por vía oral y endovenosa.
4. Caracterizar el comportamiento toxicológico de la vainillina a dosis única en ratas mediante un método alternativo y clasificar su nivel de toxicidad.
5. Caracterizar el comportamiento toxicológico de la vainillina a dosis repetida en ratas.

La **novedad científica** de este trabajo se fundamenta en que por vez primera en Cuba:

- Se realiza un estudio de caracterización farmacocinética en modelos *in vivo* a dosis única y repetida de vainillina en plasma, con vistas a su uso como candidato terapéutico.

- Se evalúa la toxicidad aguda y subcrónica (90 días), por vía oral de la vainillina, para su uso como medicamento, ya que solo existían estudios toxicológicos, para ser empleado como aditivo alimentario.
- Se clasifica su nivel de toxicidad según las normas de la OECD, para su uso como candidato terapéutico.
- Es la primera contribución al tema en el mundo, sobre el comportamiento de la farmacocinética intraeritrocitaria y la biodistribución de la vainillina a dosis única por vía oral y endovenosa.

Los resultados de esta investigación han sido presentados en más de 15 eventos científicos tanto nacionales como internacionales, están incluidos en 11 artículos publicados en revistas de prestigio nacional e internacional (Anexo 1).

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Anemia Hemolítica

La anemia hemolítica se manifiesta como consecuencia del desbalance entre la velocidad de destrucción y la producción de los eritrocitos, lo cual disminuye el tiempo de vida media de estos. En estas condiciones, la médula ósea trata de mantener el volumen celular requerido y aumenta, de seis a ocho veces, la producción y liberación de eritrocitos jóvenes (reticulocitos) a la circulación periférica (Spivak, 2000).

En las anemias hemolíticas hereditarias la alteración en el eritrocito se puede expresar bajo diferentes formas, se definen por la coexistencia de anormalidades cualitativas o cuantitativas, o ambas, en las cadenas de globina. Entre estas se incluyen las talasemias, que se caracterizan por la capacidad limitada en la síntesis de las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina (Hb) y, las alteraciones en la secuencia de restos de aminoácidos. Las variantes moleculares más frecuentes de las hemoglobinopatías son las mutaciones puntuales de los genes que codifican para la Hb, como las S, C, D y E. Estas alteraciones dependerán en gran medida de la posición y el tipo de mutación (Weatherall, 1997; García, 2010).

I.1.1 Anemia drepanocítica, polimerización de la hemoglobina S

La hemoglobinopatía S o Anemia drepanocítica (drepanocitemia) es una anemia hemolítica crónica de intensidad variable pero habitualmente grave. De acuerdo a informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año nacen de 300 000 a 400 000 niños afectados y en el mundo la padecen un total de 240 millones de personas (Del Toro, 2001; Svarch, 2012).

La anemia drepanocítica es de origen genético e intensidad variable, pero habitualmente grave. Se origina por una mutación puntual en el gen que codifica para la cadena β de la hemoglobina, lo que da lugar al reemplazo del aminoácido hidrofílico ácido glutámico, por el aminoácido hidrofóbico valina, en la posición seis de la cadena β de la molécula de hemoglobina normal (Hb) (Eaton, 1990; Nagel, 2001). Esta mutación provoca que la Hb sea menos soluble en condiciones de hipoxia o

desoxigenación, lo cual ocasiona su polimerización y precipitación en el interior del eritrocito (Mehanna, 2001) es decir; las moléculas de desoxihemoglobina (dHbS) se unen formando agregados moleculares en forma de estructuras microtubulares elongadas que rigidifican, distorsionan y disminuyen la flexibilidad del glóbulo rojo (Colombo, 1993).

La polimerización, está asociada a la reducción del contenido de iones y de agua de la célula y a la consecuente deshidratación celular. Este proceso conlleva a que el glóbulo rojo se distorsione y disminuya su flexibilidad, adquiriendo forma de hoz. En este estado, estas células se tornan más rígidas, pueden obstruir pequeños capilares en la circulación y ocasionar una oxigenación deficiente en los tejidos. La hipoxia tisular causada por la vaso-oclusión en la microcirculación y el consiguiente daño de los órganos, constituyen la primera causa de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (de Jong, 2001; De Franceschi y Corrocher, 2004).

I.1.2 Polimerización “*in vivo*”, vasooclusión y crisis dolorosas. Cuadro clínico, incidencia de la enfermedad

El resultado de la polimerización “*in vivo*” es la obstrucción del flujo sanguíneo en los microcapilares (vasooclusión). La vasooclusión ocasiona crisis dolorosa y daños de los órganos que contribuyen sustancialmente a la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (Colombo, 1993).

La crisis dolorosa es una obstrucción aguda, a veces subaguda, de la microcirculación por células falciformes, seguidas de isquemia. En ocasiones se presenta necrosis y destrucción tisular. Se han identificado un gran número de eventos que precipitan las crisis dolorosas: la deshidratación, la fatiga, la menstruación, la ingestión de alcohol, el estrés emocional y la acidosis, entre otros, pero no se conoce qué mecanismo “dispara” esta complicación (Serjeant, 1992).

La interpretación de los resultados de las investigaciones realizadas, para tratar de determinar la variabilidad en la frecuencia de las crisis dolorosas, indican que la causa principal de las crisis vasoclusivas (CVO) y las diferencias entre los pacientes

están en las variaciones en la anatomía y en las propiedades dinámicas de la microcirculación, y no en la mayor probabilidad de polimerización intracelular de las células.

En la polimerización existe un tiempo de demora (td) o proceso de nucleación durante el cual las unidades de dHbS se asocian unas con otras para formar un núcleo crítico con la posterior adición de otras unidades (Eaton, 1990).

Las manifestaciones clínicas de la hemoglobinopatía S no aparecen en el momento del nacimiento, debido a la aumentada proporción de hemoglobina fetal (HbF) que existe en esa época de vida. El proceso hemolítico comienza semanas después del nacimiento y se hace evidente a las doce semanas. La Hb desciende rápidamente en los primeros tres meses, se mantiene estable hasta seis meses y vuelve a disminuir a los 15 meses, no manifestándose más cambios relacionados con la edad hasta los seis años. Entre los tres y seis meses el valor promedio de la Hb es de 8,0 g/L y a los 15 meses de 7,0 g/L. En este proceso existen marcadas diferencias interindividuales (Bunn, 1997).

El diagnóstico se establece alrededor del año de edad y las causas más frecuentes son: anemia, infecciones, crisis mano-pie, ictericia, hepatoesplenomegalia, y CVO dolorosas abdominales y osteomioarticulares. El mayor por ciento de muertes se encuentra en la niñez. Un estudio reciente conducido por una clínica en Dallas, TX (N=980) divulgó que 98.4% de sus pacientes sobrevivieron a la edad de 18 años. La creación de centros multidisciplinarios comprensivos del cuidado del paciente, mejoraron cabalmente la mortalidad, llegando a la edad adulta (Jordan *et al.*, 2013).

Las manifestaciones clínicas de la HbS son de distintos tipos y causas, pero la mayor parte de ellas están condicionadas por oclusión vascular de los glóbulos rojos. Esta oclusión vascular puede ocurrir en forma aguda o crónica. Las CVO dolorosas son las manifestaciones clínicas más frecuentes y las que determinan en gran medida la severidad de la HbS. Aparecen comúnmente en el segundo o tercer año de vida. Del total de pacientes en Cuba que presentan dicha manifestación acuden a consultas el 74,1 % son niños y el 82,2 % son adultos (Svarch *et al.*, 2011).

En todos los órganos se pueden producir infartos por oclusión vascular aguda. La oclusión vascular crónica, y en algunos casos la sobrecarga de hierro, conducen a lesiones permanentes e irreversibles. Entre las alteraciones que pueden presentarse se encuentran: cardiovasculares, pulmonares, renales, hepáticas, del sistema nervioso central, oculares, óseas, así como, infecciones, úlceras en las piernas y priapismo. Esta enfermedad se vuelve multisistémica crónica que va desde el fallo de los órganos hasta la muerte que comúnmente ocurre entre los 20 y 50 años de edad (Troutman, 2003; Svarch *et al.*, 2011; Mc Cavit, 2012). Esta patología se hereda como rasgo autosómico recesivo y es más frecuente en individuos de la raza negra, así como, en el sexo masculino (Lee *et al.*, 1994). La mayor incidencia de esta enfermedad se reporta en África tropical, donde el 45 % de la población es portadora de la mutación. En América Latina y el Caribe, uno de cada 100 individuos de raza negra es portador del gen mutado. En Estados Unidos (EE.UU) específicamente la incidencia es de aproximadamente uno de cada 700 nacimientos (Sans-Sabrafren *et al.*, 2001; Svarch 2012). En nuestro país, el 3,1 % de la población general es portadora del gen de la HbS, con una marcada prevalencia en la zona oriental en comparación con las regiones centrales y occidentales de la isla (Espinosa, 1996; Fernández *et al.*, 2008; Svarch, 2012).

I.1.3 Anemia Drepanocítica: Un problema de salud pública y social

La anemia drepanocítica es la única patología hematológica de carácter genético que constituye todavía un problema de salud pública y social. En Cuba por más de treinta años se han dedicado recursos humanos y materiales en diversas investigaciones relacionadas con esta enfermedad, y se han abarcado tópicos tan importantes como la fisiopatología, el crecimiento y el desarrollo intelectual y social del enfermo. En el Instituto de Hematología e Inmunología existe un Programa de Atención Integral que incluye: seguimiento sistemático desde temprano en la vida en una consulta especializada, la administración de ácido fólico de forma permanente y de penicilina oral profiláctica los primeros 5 años de la vida; así como la educación del niño y de sus padres (Martínez *et al.*, 2012). Desde 1986 se realiza esplenectomía parcial en la

crisis de secuestro esplénico con excelentes resultados (Svarch *et al.*, 2011). El problema de esta enfermedad lo constituye la no-existencia de un tratamiento efectivo, reducido solo al sintomático. Si bien la hemoglobinopatía SS no es una de las principales causas de muerte, sí afecta a una fracción no despreciable de nuestra sociedad (3,1%) que posee un alto índice de mestizaje (Espinosa, 1996; Svarch, 2012). Estudios realizados en una población determinada de adultos demostraron que el rendimiento intelectual fue normal, sin embargo las limitaciones propias de la enfermedad implicaron que un 70 % repitieran cursos escolares y el 26 % no estuvieran vinculados a actividades laborales. El perfil de personalidad demostró que eran reservados, emotivos, socialmente tímidos, inseguros y dependientes. El estudio de la estabilidad psíquica reveló una combinación de rasgos de personalidad neurótica. El perfil psicopatológico era el propio de la depresión (Espinosa, 1996). Los niños presentan retraso en su crecimiento y desarrollo. Se han postulado diferentes hipótesis: disfunciones hormonales, deficiencias nutricionales, otros plantean que la causa es multifactorial pero hasta el momento no se ha comprobado fehacientemente ningún mecanismo (Bloom, 1995).

Como puede observarse, esta enfermedad constituye un problema de trascendencia social ya que provoca limitaciones de salud, caída de la calidad de vida, preocupación y carga económica familiar. Todas estas razones justifican la importancia de la búsqueda de tratamientos efectivos para contrarrestarla.

I.1.4 Agentes Antisickling o Antidrepanocíticos

Los principales requerimientos para que un agente sea útil en la terapia clínica de la anemia drepanocítica son:

- Ser de fácil administración (preferentemente oral) y con una absorción predecible.
- Atravesar la célula, reaccionar con la HbS o con la membrana, previniendo la polimerización y el sickling.
- No comprometer la función fisiológica de la Hb o la estructura celular, no alterar las propiedades de enlace con el oxígeno de la Hb modificada.

- No provocar efectos hematológicos secundarios: hemólisis, afinidad incrementada por el oxígeno.
- No causar efectos tóxicos.

(Serjeant, 1992; Tierney, 1999; Del Toro, 2001):

Se han reportado una serie de compuestos que influyen en la polimerización de la HbS, existiendo distinción entre los conocidos como agentes antisickling y antigeling (Wilburn, 1991). Un compuesto antisickling es aquel que es capaz de atravesar la membrana y prevenir o revertir la falciformación (sickling) de los glóbulos rojos, generando inhibición de la polimerización o no. Un compuesto antigeling es capaz de prevenir la polimerización de la dHbS mediante interacción directa o indirecta con la Hb. Este no penetra a través de la membrana celular en cantidades suficientes por lo que no es capaz de revertir o prevenir el sickling cuando entra en contacto con el glóbulo rojo. No obstante a esta clasificación relativa, la comunidad científica ha establecido la denominación común de **Agentes Antisickling** independientemente de su mecanismo de acción (Wilburn, 1991).

En todos los efectos, los tóxicos se convierten en el primer factor que prohíbe su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de la anemia drepanocítica (Del Toro, 2001).

I.1.5 Tratamientos, terapia convencional

La ausencia, hasta la fecha, de un tratamiento farmacológico adecuado (Mc Cavit, 2012) para la Anemia Drepanocítica ha hecho que como parte de la terapia convencional, durante los períodos de crisis dolorosas, se sugieran otras opciones, como son :

Vasodilatadores, los cuales mejoran la circulación capilar durante la crisis dolorosa (la literatura reporta el uso de la papaverina, inyección intravenosa de sulfato de magnesio al 50 %), anticoagulantes, para inhibir los cambios secundarios de la coagulación a la vasooclusión en las crisis dolorosas, y algunos inhibidores de la agregación plaquetaria como la aspirina (Ballas, 1997; Serjeant, 1992), analgésicos (Griffin, 1994), antibióticos para los períodos febriles y la sepsis pneumocócica. Se

reporta el empleo de la vacuna neumocócica y la penicilina profiláctica en los primeros años de vida (Rogers, 1995; Bjornson, 1996; Quinn *et al.*, 2010) y terapia transfusional (Campbell, 1993).

A pesar de los conocimientos de la etiopatogenia de la enfermedad, aún no se cuenta con una terapia farmacológica efectiva de prevención o de remisión de sus manifestaciones clínicas. El tratamiento actual solo comprende el manejo y el control general de los síntomas relacionados con la crisis, mediante el empleo de vasodilatadores, anticoagulantes, algunos inhibidores de la agregación plaquetaria, analgésicos, antibióticos y terapia transfusional (Campbell *et al.*, 1993; Charache, 1996; Bjornson *et al.*, 1996; Ballas, 1997; Elander *et al.*, 2004; Rees *et al.*, 2010).

Una de las razones por las cuales no se ha obtenido éxito en el desarrollo de fármacos antidrepanocitarios, es la excesiva cantidad de producto requerida para interactuar de manera estereoespecífica con el elevado número de moléculas de Hb presentes en el organismo humano (Mehanna, 2001). Además, como solo una fracción del fármaco es selectivamente transportada dentro de los eritrocitos (el resto es metabolizado o excretado), las dosis estimadas para este tipo de patología están en un rango de uno a cuatro gramos diarios. Por estos motivos y debido a los largos períodos de tratamiento, la baja toxicidad es una premisa fundamental para un buen candidato terapéutico para esta patología (Abraham *et al.*, 1991).

I.1.6 Búsqueda de nuevos tratamientos efectivos

Actualmente los pacientes con hemoglobinopatía SS reciben tratamiento para sus síntomas y no para curar la enfermedad. Las investigaciones para la cura de esta enfermedad progresan por diferentes vías:

- Desarrollo de agentes antisickling. Una molécula que promete es la vainillina un producto químico encontrado en algunas plantas y que puede sintetizarse en el laboratorio (Beshore, 1994).
- Estudio de los genes que aumentan la producción de hemoglobina fetal (HbF). La Hidroxiurea (HU) es un fármaco que parece trabajar en esta vía, pero no

uniformemente y no en todos los pacientes, aunque es teratogénica y mutagénica en modelo animal, incrementó el número de eritrocitos con HbF, el porcentaje de HbF y la cantidad de HbF por célula (Goldberg, 1990; Charache, 1992). Esta afecta el transporte pasivo de K^+ , incrementa el volumen corpuscular medio (VCM), altera la permeabilidad de la membrana celular y la deformación, a la vez que disminuye la adhesión de las células rojas al endotelio; por lo que provoca la disminución de la severidad clínica y el número de CVO (Charache, 1995; Saleh, 1999; Roa, 1997). La HU tiene muchas características para ser un fármaco ideal para la anemia drepanocítica y proporciona beneficios terapéuticos a través de múltiples mecanismos de acción. Aquellos pacientes que responden experimentan menos episodios dolorosos y disfrutan una salud general mejorada. No hay manera de predecir quién responderá al tratamiento y quién no. La HU se ha probado en ensayos clínicos sola y combinándose con la eritropoyetina, hormona que estimula la producción de eritrocitos (Ware, 2010). El impacto de la HU sobre la hemólisis es modesto, aún no se conoce su influencia a largo plazo en pacientes con hemólisis. Se ha encontrado una tendencia a la significación entre el uso de la HU y el componente hemolítico (Arencibia *et al.*, 2012).

- Trasplante de médula ósea (TMO) o terapia génica. Con los avances en la ingeniería genética se ha fortalecido el uso de esta terapia como vía alternativa en el tratamiento de algunas hemoglobinopatías como la drepanocitemia y la talasemia. El TMO es usado como una terapia alternativa específicamente para aquellos enfermos sometidos a largos regímenes de transfusiones. La ventaja de este procedimiento es que pudiera ser una verdadera cura a largo plazo. La desventaja es que no siempre funciona y puede haber complicaciones inmunológicas serias. El trasplante es tan peligroso que no se realiza a menudo. Este consiste en el reemplazo del gen β -globínico anormal por uno normal mediante el trasplante de médula ósea (TMO) o de células hematopoyéticas (*stem-cell*), cuando existen donantes compatibles disponibles. Esta terapia ofrece, a los enfermos con AD, una mejor expectativa en cuanto a la longevidad y calidad de vida (Mentzer, 1994; Kalinyak, 1995). El tratamiento tiene los riesgos potenciales aprensivos: cuando el nuevo gen se inserta

en el cromosoma no hay seguridad de que no se active otro gen (cáncer) o se inactive uno esencial. La terapia génica constituye una alternativa futura que encierra ventajas y riesgos para el enfermo con drepanocitemia. Además es una vía más costosa y de menor posibilidad de ejecución en aquellos países de mayor prevalencia de la drepanocitemia. Independientemente del problema que esta plantea: ¿Cómo transferir efectivamente genes de forma segura o de riesgos compatibles con la vida y que no afecten la calidad de esta? (Persons, 2000; Reik, 2004). Es actualmente la única terapia curativa para esta enfermedad, todavía, esta modalidad del tratamiento es poco utilizada en el mundo, el centro para la investigación internacional del trasplante de sangre y médula divulgó que se han reportado menos de 500 trasplantes en las base de datos, debido esto a su riesgo significativo de mortalidad (Buchanan, 2010).

- Fármacos nuevos que modulan la hemoglobina F tales como el decitabine y los ácidos grasos de cadena corta pueden mejorar los resultados.

- Terapias que emergen resultado de una amplia comprensión de la fisiopatología de la AD es la promesa de los ensayos clínicos que se han incorporado; estos incluyen las estatinas, anticoagulantes, glutamina, y terapias de modificación del óxido nítrico (Buchanan, 2010).

I.2 Vainillina: origen y producción industrial

La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es uno de los compuestos más empleados a nivel mundial como aromatizante y saborizante (Walton, 2003; Sinha, 2007). A pesar de que anualmente se producen más de 12 000 toneladas de este producto, solo el uno por ciento se obtiene de su fuente natural. En la actualidad, la producción por esta vía no satisface la demanda mundial por lo que se explotan mayormente las vías biotecnológicas como la síntesis microbiana a partir de estilbenos, lignina, eugenol y ácido ferúlico (Barghini, 2007).

Debido a sus propiedades organolépticas, este compuesto es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como modificador del sabor y olor, así como antibacteriano (Rupasinghe *et al.*, 2006). Actualmente es muy utilizado en la confitería y en la preparación de bebidas. Presenta grandes ventajas respecto a otros saborizantes debido a que es compatible con el sabor de muchas frutas, aún a altas concentraciones (Korthou y Verpoorte, 2007). Aproximadamente el 50 % de la producción de vainillina sintética, se utiliza en las industrias farmacéutica y química, en la elaboración de herbicidas o fármacos como la papaverina, L-metildopa, L-dopa y de agentes antimicrobianos como el *trimethoprim* (Hocking, 1997; Walton, 2003).

I.2.1 Estructura química del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina)

La vainillina es un benzaldehído que posee en posición *-meta* un grupo metoxi y un grupo hidroxilo en posición *-para* (Figura 1). El átomo de carbono carbonílico se encuentra en el estado de hibridación sp^2 , está enlazado a un átomo de carbono y a uno de hidrógeno a través de simples enlaces σ y a un átomo de oxígeno, a través de un doble enlace (σ y π). (Morrison, 1987).

La estructura química es la siguiente:

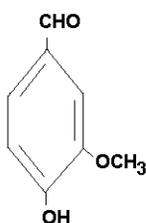


Figura 1. Estructura química de la vainillina.

La estructura y la polaridad del grupo carbonilo, determinan las propiedades químicas de este tipo de compuesto. Este grupo proporciona un sitio para la interacción de agentes nucleofílicos por el carbono y de agentes electrofílicos por el oxígeno. Las principales reacciones químicas en las que participa la vainillina son: la oxidación, la reacción de Cannizaro (auto-oxidación), la adición de alcohol en medio

ácido, la reducción a alcohol, la condensación benzoínica, la hidrólisis y la adición de derivados de amonio (Morrison, 1987). Esta última es de gran importancia, pues está involucrada en la interacción con varias moléculas orgánicas como la hemoglobina, lo que le confiere a la molécula ciertas propiedades farmacológicas. La vainillina reacciona con la molécula de HbS según (ecuación 1) formando una base de Schiff.



La velocidad de la reacción depende de la rapidez de formación del enlace entre el nucleófilo y el carbono carbonílico, y de los efectos electrónicos y estéricos de los grupos enlazados al carbono carbonílico que actúan sobre el mismo y sobre el estado de transición (Morrison, 1987; Fernández, 1997).

I.2.2 Características físico-químicas de la vainillina

El aldehído aromático 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído tiene estructura cristalina en forma de agujas finas de color blanco o amarillo pálido, con olor agradable y sabor a vainilla. Es muy soluble en etanol, cloroformo, éter, sulfuro de carbono, ácido acético glacial, piridina, aceites y soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos. Las propiedades físico químicas se resumen en la tabla 1 (Sinha *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de la vainillina.

Propiedades	Datos
Fórmula Molecular	C ₈ H ₈ O ₃
Estructura Química	(CH ₃ O)C ₆ H ₃ (OH) CHO
Peso molecular	152,15
Temperatura de ebullición	285 °C
Temperatura de Fusión	80-81 °C
Solubilidad en agua	1g/100mL
Densidad	1,056 g/mL
Acidez	(pKa) 7.781
Basicidad	(pKb) 6.216
Constante de disociación	pKa1 = 7,4; pKa2 = 11,4 (25 °C)

Fuente: Sinha *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012

I.2.3 Potencialidades de la vainillina como candidato terapéutico

I.2.3.1 Propiedades antidrepanocíticas

Una de las primeras investigaciones realizadas con la vainillina como candidato terapéutico, fue la evaluación antidrepanocitaria *in vitro* (Zaugg *et al.*, 1977). En los primeros estudios realizados sobre la influencia de la vainillina para el tratamiento de la anemia drepanocítica, se evidenció que este compuesto puede atravesar la membrana eritrocitaria desde el plasma, concentrarse en el citosol e interactuar con la hemoglobina mutada (HbS), inhibiendo su polimerización. De esta manera, la vainillina mejora la funcionalidad del eritrocito debido a que incrementa el número de moléculas de HbS en estado soluble (Zaugg *et al.*, 1977). Posterior a los estudios de Zaugg, se confirmó la moderada acción del compuesto al ser comparada con otros aldehídos, demostrando su capacidad para reducir la falciformación y producir un incremento del número de células normales (Bedell *et al.*, 1979).

En 1991, se demostró que la vainillina reacciona covalentemente con la HbS, lo que aumenta la afinidad de esta proteína por el oxígeno. Además, se comprobó que la molécula no produce cambios significativos en el contenido iónico y de agua del eritrocito. Mediante el empleo de técnicas de cristalografía de rayos X, se encontró un sitio principal y otro de menor ocupación, en el enlace de la vainillina con la Hb (Abraham *et al.*, 1991). En estudios más recientes, se ha corroborado la inhibición de la polimerización de la HbS, debido a la inhibición de los sitios de contacto intermoleculares (Álvarez *et al.*, 1997; Del Toro *et al.*, 2003). La inhibición de la HbS también ha sido comprobada *in vivo*, mediante el empleo de ratones transgénicos que tienen eritrocitos característicos de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2004).

Este compuesto es capaz de atravesar la membrana eritrocitaria desde el plasma, concentrarse en el interior del glóbulo rojo y reaccionar con la HbS en los sitios estratégicos necesarios para la estabilización del polímero y de esta forma inhibir su formación.

Las microfotografías obtenidas utilizando la Microscopía Electrónica de Transmisión (Jeem 2000 EX, Jeol) mostraron la formación de las fibras de los polímeros de desoxihemoglobina S en las muestras controles HbS (tiempos 0, 5 y 24h). En las muestras tratadas con la vainillina no se observaron fibras en numerosos hematíes y sí una tendencia al incremento del número de hematíes en estado bicóncavo helicoidal. La inhibición de la formación de las fibras de los polímeros de dHbS observada en este estudio corrobora los reportes sobre la moderada actividad antisickling de la vainillina sugiriendo un posible modo de acción a través de la inhibición de los sitios de contacto intermoleculares (Del Toro *et al.*, 2004).

I.2.3.2 Propiedades antimutagénicas

La vainillina es capaz de inhibir la mutagénesis inducida por sustancias químicas y agentes físicos en varios modelos animales (Tsuda *et al.*, 1994; Akagi *et al.*, 1995). Este compuesto es capaz de reducir la citotoxicidad *in vitro* en células V79 de hámster chino, tras la exposición aguda a rayos X y ultravioletas (UV) (Keshava *et al.*, 1998). Se ha observado la habilidad de la vainillina de inhibir la mutación en células AL (híbrido de células de hamster y humanos) inducida por varios mutágenos químicos, sugiriendo que la vainillina puede ser prometedora en la acción quimiopreventiva del cáncer (Gustafson *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2005). Otros estudios encontraron que la vainillina inhibe la mutagénesis espontánea en la línea celular humana HCT116 de cáncer de colon dependiendo de la concentración en las exposiciones a largo plazo y es también eficaz en exposiciones a corto plazo, también se demostró por primera vez que la vainillina reduce espontáneamente la fracción mutante (mutantes/106 sobrevivientes) a concentraciones tóxicas mínimas en células de mamíferos (King *et al.*, 2007).

I.2.3.3 Propiedades antineoplásicas

Las propiedades antineoplásicas de la vainillina la hacen objeto de estudio de numerosos investigadores. Estudios sobre el efecto antitumoral han demostrado que esta sustancia tiene efectos quimiopreventivos en modelos carcinogénicos de ratas (Shaughnessy *et al.*, 2001). Además, es capaz de inhibir la proteína quinasa

dependiente de ácido desoxirribonucleico. Esta enzima está involucrada en la transducción de señales para la proliferación y diferenciación celular, eventos necesarios para el desarrollo de las células cancerígenas. Por otro lado, se ha demostrado que mejora la sensibilidad de las células cancerígenas al cisplatino, un antineoplásico de amplio uso (Duran y Karran, 2003).

La vainillina impide la metástasis del cáncer de mama en modelos experimentales. La administración de 100 mg/kg diarios durante un mes a ratonas BALB/c implantadas con una línea celular 4T1, produjo una reducción significativa del número de colonias que hicieron metástasis, con respecto a las controles (Lirdprapamongkol *et al.*, 2005). Recientemente se ha constatado el efecto anticarcinogénico y antimetastásico de la vainillina debido a la inhibición de enzimas requeridas para los procesos de metástasis e invasión de tumores. Esta sustancia inhibe la actividad gelatinolítica de proteinasa-9 de la matriz extracelular en células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2). Este efecto se logra a través de la inhibición de la actividad del factor nuclear NF-kappaB, el cual regula la expresión de esta proteína (Garg y Aggarwal, 2002). Como resultado, se redujo considerablemente la invasividad de las células HepG2 en un modelo específico para este fin, a concentraciones no tóxicas y en dosis dependiente (Liang *et al.*, 2009).

Este compuesto también inhibe la migración celular por la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la fosfoinositol 3-quinasa (Lirdprapamongkol *et al.*, 2009). La presencia de un grupo aldehído en la estructura química de la vainillina es importante para ejercer la acción inhibitoria. Además, esta sustancia también inhibe la angiogénesis, determinada en el ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Lirdprapamongkol *et al.*, 2009).

1.2.3.4 Propiedades antioxidantes

Recientemente se ha manifestado la actividad antioxidante de la vainillina debido a su poder reductor. Se comprobó que es capaz de secuestrar especies reactivas de oxígeno (ERO) como los peroxinitritos, e inhibir las reacciones mediadas por este tipo

de compuesto (Kumar *et al.*, 2004). Otras evidencias señalan que a concentraciones de 2,5 mmol/L, este benzaldehído puede proteger contra la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica inducida por fotosensibilización en mitocondrias de hepatocitos. El mecanismo propuesto comprende la posibilidad de remover el oxígeno singlete, el cual es responsable del daño inducido (Jayashree *et al.*, 2000; Kamat *et al.*, 2000). En un estudio donde se evaluó la actividad antioxidante de la vainillina usando múltiples ensayos se evidenció el aumento de la concentración de vainillina y la actividad antioxidante en plasma de ratones tras administración oral. Esto sugiere que la actividad antioxidante de la vainillina pudiera ser más beneficiosa que lo pensado para el cuidado de la salud diaria (Akihiro *et al.*, 2011).

Fueron investigadas las propiedades antioxidante, antiinflamatoria y hepatoprotectora de la vainillina en estudios *in vivo* en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), sustancia usada para inducir el daño en el hígado. Los resultados sugieren que los efectos antioxidante y antiinflamatorio de la vainillina contra las lesiones agudas inducidas por el CCl₄ pueden implicar la capacidad de bloquear los radicales libres generados por el CCl₄. Los mecanismos de protección incluyen la inhibición de los procesos de la oxidación de la proteína y del lípido, del aumento en actividades enzimáticas antioxidantes y de la inhibición de los mediadores de la inflamación, que da lugar a la recuperación de parámetros biológicos y a la integridad de los aspectos histológicos del hígado (Makni *et al.*, 2011; Castán *et al.*, 2012).

I.2.3.5 Propiedades neurodepresivas

La vainillina tiene características propias de sustancias depresoras del sistema nervioso central, al ser administrada por vía parenteral en mamíferos. De acuerdo con esta propiedad se ha propuesto que puede ser empleada como agente psicoterapéutico a corto plazo, en un rango de dosis de 200 a 1500 mg/kg de peso corporal. Otras aplicaciones comprenden la disminución de la ansiedad y sus complicaciones, la relajación muscular a corto plazo, la supresión de los movimientos ligeros sin afectación de movimientos mayores y la actividad anticonvulsivante.

Debido a que esta molécula no posee átomos de nitrógeno, representa un agente tranquilizante con una toxicidad relativamente baja (Abraham *et al.*, 1997).

I.2.3.6 Propiedades antiinflamatorias

Actualmente se ha demostrado que este benzaldehído tiene una potente actividad antiinflamatoria. Es capaz de inhibir la activación del factor nuclear NF-kappaB estimulado por lipopolisacáridos y la expresión del gen de la ciclooxigenasa tipo 2, en una línea de células macrófagas murinas (Murakami *et al.*, 2007).

Las propiedades antiinflamatorias de la vainillina le permiten no solo prevenir la colitis inducida, sino también mejorar el cuadro inflamatorio establecido en este modelo murino, mediante la inhibición *in vivo* de la actividad del factor NF-kappaB. Asimismo, la administración oral de la vainillina inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias que están relacionadas con la colitis inducida por TNBS y que son reguladas por el factor de transcripción nuclear NF-kappaB, como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Además, la vainillina estimula la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-4, la cual se encuentra suprimida en este modelo inflamatorio. El potencial antioxidante de la vainillina también puede contribuir a la prevención de las enfermedades inflamatorias del intestino grueso (IBD, siglas en inglés) humanas, pues se conoce que los radicales libres son un factor de riesgo en estas enfermedades (Wu *et al.*, 2009).

I.3 Integración de la toxicología, la farmacocinética (PK) y la toxicocinética (TK) en estudios con modelos *in vivo*

La PK y la toxicología han evolucionado desde una distante colaboración hacia una integración o simbiosis de alta correlación práctica. Se ha establecido una estrecha relación entre especialistas de diferentes disciplinas, aumentando los conocimientos sobre las alteraciones metabólicas que tienen lugar bajo condiciones de exposición a altas dosis. Así la TK proporciona una explicación a las respuestas observadas después de la administración de altas dosis para establecer un grado razonable de extrapolación y poder estimar los márgenes de seguridad (Maas *et al.*, 2007).

La PK se utiliza para seleccionar un vehículo o sistemas de liberación de fármaco que produzca las concentraciones plasmáticas deseadas en la especie animal de interés. La solubilidad del producto puede limitar el uso de determinados vehículos comunes en los estudios de seguridad, este tipo de estudio farmacocinético puede influir en el diseño de la forma farmacéutica empleada en los ensayos clínicos. Los datos cinéticos pueden utilizarse como un puente de unión entre la farmacología y la toxicología y entre la farmacocinética y la toxicocinética (Smith *et al.*, 2001).

La importancia del vehículo en el desarrollo de soluciones es obtener una que permita perfeccionar la exposición y translocación de fármacos y que exista una buena biodisponibilidad y seguridad (Deacqunita *et al.*, 2008).

La toxicidad es una cualidad a la vez intrínseca y relativa de todas las sustancias y depende de un conjunto de condiciones y circunstancias, como son los procesos de biotransformación (los que aumentan o disminuyen la toxicidad), así como los mecanismos de defensa del individuo, también influyen otros factores externos e internos, como el estado fisiológico del individuo (a su vez muy influenciados) y la participación concomitante de otros xenobióticos. La potencialidad tóxica de una sustancia es mayor cuanto menor sea la dosis precisa para producir un efecto nocivo (De la Iglesia, 1992).

El conocimiento y comprensión de la farmacocinética de una molécula es fundamental al afrontar un estudio toxicológico. Esta disciplina estudia el curso de los xenobióticos en el tiempo dentro del organismo, la cual incluye procesos como absorción, distribución, metabolismo y eliminación (Gaviraghi *et al.*, 2001). Las variables farmacocinéticas permiten dilucidar importantes aspectos como: ruta y velocidad de absorción y de eliminación del xenobiótico, posibles metabolitos con actividad toxicológica, órganos o sistema de órganos a los cuales se distribuye el producto en estudio, entre otros. Estos parámetros son indispensables al afrontar un diseño toxicológico experimental (Smith *et al.*, 2001).

El empleo de la farmacocinética integrado a las evaluaciones toxicológicas es una práctica ampliamente utilizada en el mundo actual (Smith, 1997). Esto se debe

principalmente, a que los efectos tóxicos de un xenobiótico pueden, en ocasiones, depender de las concentraciones alcanzadas en los órganos blancos. Existe un consenso general que la “dosis interna” de un determinado producto, definida mas apropiadamente como exposición sistémica, puede brindar una mayor información toxicológica que la obtenida mediante la dosis administrada externamente (Johnson y Wolfgang, 2001). La exposición sistémica es un factor determinante para la acción de los fármacos y, por consiguiente, para su eficacia y seguridad. Factores como toxicidad, farmacocinética y eficacia están directamente relacionados (Eddershaw *et al.*, 2000). Por ejemplo, la toxicidad puede ser el motivo para la terminación de un producto en la fase de desarrollo; pero la causa real podría ser una prolongada e innecesaria exposición sistémica, en otras palabras, una farmacocinética desfavorable (Singh, 2006). Este concepto incluye factores como baja disponibilidad debido a una pobre absorción; un breve tiempo de vida media de eliminación que conlleve a un corto tiempo de acción por saturación; excesiva variabilidad debido a agentes genéticos y ambientales, entre otros (Walker, 2004; Wilding y Bell, 2005).

Los perfiles farmacocinéticos de muchos fármacos son, de manera general, dependientes de la concentración, en un rango terapéutico y se denomina como farmacocinética lineal o proceso cinético de primer orden. La linealidad implica que los cambios en la variación de la concentración de la molécula son proporcionales a la concentración de esta, sin que exista ningún proceso de saturación. Sin embargo, a altas concentraciones, la cinética tiende a cambiar en dependencia de la concentración, debido a la saturación de ciertos procesos (ADME) y es reconocida como farmacocinética no lineal (Kwon, 2002). El comportamiento no lineal en la farmacocinética de un fármaco puede ser una fuente sustancial de variabilidad en el nivel de exposición y respuesta del mismo.

1.3.1 Farmacocinética, enfoque poblacional

A partir de la descripción de la modelación no lineal basada en efectos mixtos por Sheiner trajo una revolución en el análisis farmacocinético con la introducción del enfoque poblacional (Sheiner *et al.*, en 1977). Este enfoque, aplicado en la evaluación

farmacocinética y farmacodinámica (PK/PD) está cobrando cada día más aplicación en la práctica clínica y experimental porque aporta una poderosa herramienta de análisis adaptable a un sin número de situaciones. La unidad de análisis no es el individuo sino la población de muestras, con la ventaja de que puede ser escasa, no balanceada o fragmentaria en comparación con el enfoque tradicional que exige esquemas de muestreos rígidos y extensos (Roy y Ette, 2005). De esta forma, combinado con un adecuado análisis matemático y estadístico se convierte en una alternativa a los diseños con secuencia de extracción extensa y cuenta, desde hace tiempo, con normativas para su aplicación (FDA, 1999).

El enfoque poblacional es aplicado muy convenientemente en grupos poblacionales específicos como en pacientes pediátricos, oncológicos (Slaviero, 2003; Bruno, 2005) y otros donde los esquemas extensivos de muestreo no resulten apropiados y también en la evaluación de la influencia de variables categóricas como la edad, el sexo (Skinner, 2003). Desde el punto de vista experimental también ha cobrado relevancia y se ha sugerido su uso en animales, como enfoque especial en algunas normativas. Hoy día es cada vez más frecuente su aplicación en PK/PD experimental (Bender, 2010; Lee, 2009) y toxicología (Aarons, 2001).

I.4 Estudios farmacocinéticos de la vainillina

Don Farthing en 1999 desarrolló un método por HPLC para la determinación de metabolitos de vainillina y ácido vainillínico en plasma, eritrocitos y orina en humanos. El método demostró ser lineal de 2 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para las muestras de plasma y para las muestras de orina de 2 a 40 $\mu\text{g/mL}$. Este se utilizó en la evaluación de los efectos de la vainillina en los estudios de farmacocinética y farmacodinamia en pacientes sometidos a tratamiento para la Hemoglobinopatía SS (Farthing *et al.*, 1999).

En estudios realizados en ratas y perros a través de administración por vía oral a diferentes dosis, se ha determinado que esta molécula tiene una pobre absorción, pero alcanza la concentración máxima en pocos minutos después de la administración. La eliminación es igualmente rápida, lo cual justifica su corto tiempo de vida media (González *et al.*, 2002).

En la literatura científica hay muy pocos reportes sobre la farmacocinética de esta molécula. No existen datos en cuanto a la biodistribución y farmacocinética intraeritrocitaria de este aldehído. Es conocido que tiene afinidad por la molécula de Hb y que puede internalizarse hacia el interior de los eritrocitos para unirse a esta, lo cual le permite ejercer su acción farmacológica (Del Toro, *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Por lo que aún quedan algunas dudas en cuanto a su comportamiento cinético.

Hinderling en 1997, en su artículo *Red Blood Cells: A neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* refiere; *La significación de estudiar la cinética de distribución de fármacos en los eritrocitos en animales y humanos no es apreciada completamente.* Los estudios de distribución de fármacos en eritrocitos no ha sido muy desarrollado, por lo que no existe una amplia información.

1.4.1 Metabolismo de la vainillina

Los aldehídos en general son metabólicamente detoxificados por oxidación in vivo o mediante la reducción a alcoholes. La oxidación de la vainillina se realiza a través de la ruta de las molibdeno hidroxilasas entre las cuales se encuentran la aldehído oxidasa (AOX) y la xantina oxidasa (XO), como resultado de la cual se obtiene fundamentalmente ácido vainillínico (Kirwin y Galvin, 1993). El ácido vainillínico tiene efectos beneficiosos en la colitis ulcerativa, inducida por sulfato de sodio, indicando de este modo su utilidad en la regulación de la inflamación intestinal crónica (Kim, 2010) y su inocuidad ha sido reportada (Anklam *et al.*, 1997; Mourtzinou *et al.*, 2009). La AOX tiene una amplia especificidad por los aldehídos, incluidos los aldehídos aromáticos por los cuales tiene más afinidad que la XO. Es mayoritariamente citosólica con alguna actividad primaria microsomal en el hígado y necesita del oxígeno para oxidar aldehídos a ácidos carboxílicos. La oxidación de aldehídos por XO genera especies reactivas de oxígeno lo cual puede provocar daños en caso de un desbalance de oxidación-reducción (O'Brien *et al.*, 2005).

La presencia de glucurónidos y sulfatos conjugados han sido detectados en la orina de ratas tratadas con una dosis de 100 mg/kg de vainillina en la dieta. También se encontraron otros metabolitos en concentraciones menores como: alcohol vainillínico,

vainillil-glicina, catecol, 4-metilcatecol, guaycol, y 4-metilguaycol (Kirwin y Galvin, 1993). El análisis cinético de la glucuronización de la vainillina se realizó en los microsomas de hígado obtenidos de animales de experimentación. Así, la rata puede ser un mejor modelo que otras especies para la estimación de la glucuronización de la vainillina (Yu *et al.*, 2012).

I.5 Estudios toxicológicos de la vainillina

En el desarrollo de un fármaco se transita por varias etapas que parten de los estudios “*in vitro*” buscando actividad farmacológica, hasta los “*in vivo*”, estos últimos se realizan primeramente en animales (ensayos preclínicos) y luego en el hombre (ensayos clínicos) con el objetivo de probar su eficacia terapéutica y su seguridad clínica. Los estudios preclínicos toxicológicos, en especial, garantizan la inocuidad y el máximo grado de seguridad.

La sociedad moderna exige que ningún fármaco deba pasar a disponibilidad del hombre, sin una evaluación toxicológica apropiada, ya que debe evitarse cualquier forma sutil e imprevista de toxicidad.

Los primeros estudios de toxicidad realizados a la vainillina en animales se remontan al año 1940, estuvieron encaminados a determinar la dosis letal media aguda oral (LD₅₀) en ratas (1 580 mg/kg), cobayos (1 400 mg/kg) conejos (3 000 mg/kg) (Deichmann *et al.*, 1940; Jenner *et al.*, 1964; Taylor *et al.*, 1964). Para determinar los efectos tóxicos a largo plazo, se administraron diferentes dosis de este compuesto en la dieta de ratas, durante 91 días. Se emplearon cantidades de 3 000, 10 000 y 50 000 ppm (proporciones equivalentes a 150, 500 y 2 500 mg/kg/día). Los registros de comportamiento, crecimiento, mortalidad, peso corporal y de órganos post mortem y los estudios hematológicos e histopatológicos, indicaron que no hubo efectos adversos en las ratas mantenidas bajo una dieta con 3 000 ppm de vainillina. Sin embargo, a dosis mayores, los animales manifestaron eventos toxicológicos moderados como retardo en el crecimiento y aumento de los riñones, el hígado y el bazo (Hake y Rowe, 1963). En estudios crónicos posteriores, la sustancia se

administró mezclada con el alimento y directamente en el tracto digestivo. La dosis mayor evaluada fue equivalente a una ingestión diaria de 2 500 mg/kg de peso corporal, equivalente a 14 000 veces el estimado *per cápita* diario de una persona de 60 kg de peso corporal. En este ensayo se determinaron parámetros hematológicos y bioquímicos: conteo de células blancas y glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito, y se realizaron exámenes macroscópicos, e histopatológicos. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pesos corporales ni de los órganos, ni entre el resto de los parámetros evaluados de los animales tratados respecto a los controles (Hagan, 1967).

No se han observado reacciones significativas de sensibilización a la molécula de vainillina en seres humanos. No obstante, se ha informado cierta acción irritante en los ojos y en las mucosas del tracto respiratorio en estudios de sensibilización inducida en la piel. Se estima que puede provocar la muerte a dosis de 500 mg/kg por vía oral, en adultos humanos (Yu, 2005).

En estudios recientes administrando vainillina por vía intraperitoneal y oral en ratas se observó que la vainillina disuelta en una solución hidroalcohólica, podría causar periodos cortos de inconsciencia por vía intraperitoneal, aunque este fenómeno no parece indicar efectos tóxicos de la vainillina en tejidos del riñón, hígado y cerebro (KetLi *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios toxicológicos de la vainillina reportados en la literatura, la evalúan como aditivo alimenticio. Por lo que administran el compuesto en la dieta del animal, esta vía es apropiada para aditivos alimenticios. Este tipo de administración aunque es utilizado con frecuencia en estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos, es menos exacta que las otras rutas de administración de dosis. Esto se debe sobre todo a diferencias entre el peso corporal y el consumo de alimentos individual de los animales, lo que resulta un consumo de alimento variable (Wallace, 2008).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

En el diseño experimental, se presenta un grupo de ensayos preclínicos para la evaluación y cuantificación de la vainillina en plasma a partir de la selección del vehículo adecuado que asegure que la sustancia penetre en el organismo y se desplace hasta llegar al lugar donde con mayor o menor especificidad ejercerá la acción. Luego, están los estudios desarrollados para determinar el perfil farmacocinético *in vivo* de la vainillina en dos especies animales y en tercer lugar, los ensayos toxicológicos de primera barrera, correspondientes a la evaluación a dosis única y repetida de la vainillina por vía oral, (cumpliendo con el principio de las 3 R) como candidato a fármaco para la Anemia Drepanocítica.

La conducción de todos los estudios estuvo orientada por los Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental del MINSAP (MINSAP 2004), los Procedimientos Operacionales de trabajo para la Toxicología Experimental, así como la aprobación de los protocolos para el trabajo con animales, por el comité de ética de las instituciones en los que se desarrollaron los mismos (POT), y por las consideraciones sobre Bioseguridad expresadas en el Manual de Bioseguridad de cada institución.

En los estudios de farmacocinética, los valores de concentración plasmática inferiores al límite de cuantificación de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, no fueron tomados en consideración en el análisis farmacocinético.

II.1 Reactivos

La vainillina utilizada fue de origen comercial (SIGMA, Inglaterra), (anexo 2) y el resto de los reactivos fueron comerciales procedentes de Sigma (St Louis MO), Merck (Alemania).

II.2 Determinación de los niveles plasmáticos de vainillina a partir de la selección del vehículo adecuado para los ensayos preclínicos

El estudio correspondiente a la parte experimental se realizó en la Dirección de la Unidad de Ciencia y Técnica de Base, Control Biológico del Centro de Investigación y

Desarrollo de Medicamentos CIDEM (Mercolo). La parte analítica se realizó en el Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad del Centro Nacional de Toxicología (CENATOX).

II.2.1 Animales de experimentación

En el estudio se utilizaron ratas Wistar procedentes de la colonia del Laboratorio de Investigaciones Biológicas del CIDEM.

Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales con temperatura de 22 ± 2 °C, humedad relativa de 65-80 %, ciclo luz oscuridad 12:12. El comportamiento de la temperatura y la humedad se verificó diariamente y se asentó en el modelo correspondiente. El alimento suministrado en forma peletizada contenía en su composición la fórmula EMO 1002 (ALYco, CENPALAB). El agua estéril se depositó en biberones de cristal de 500 mL con pipetas de acero inoxidable. Se realizó la limpieza diaria de la instalación y de todos los utensilios para el mantenimiento animal. La desinfección de todas las superficies se realizó con Tego 51 al 1 %.

II.2.2 Vía de administración y nivel de dosis utilizado

La vía de administración seleccionada para el producto en estudio fue la oral, ya que era la propuesta para su administración en humanos. La sustancia se administró mediante intubación intragástrica, utilizando una cánula curva metálica (gavage). La dosis seleccionada para este estudio fue de 400 mg/Kg de peso corporal, tomando en consideración que la dosis propuesta de vainillina a utilizar en el humano es de uno a cuatro gramos por día, lo cual corresponde a 14 y 57 mg/Kg de peso corporal, respectivamente en individuos adultos (70 Kg) (Abraham, 1991), y dado también a la necesidad de realizar estudios posteriores subcrónicos y crónicos. Por tal motivo, en este estudio empleamos esta dosis, para todas las soluciones evaluadas y así verificar su solubilidad, y de esta forma determinar si a esta dosis se obtienen niveles plasmáticos que proporcionen un adecuado nivel de exposición (magnitud y velocidad de la absorción).

Debido a la baja solubilidad de la vainillina en sistemas acuosos, el estudio se realizó utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como vehículo, en virtud de su baja toxicidad, y

el hecho que es un producto ampliamente empleado en estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos pues no tiene efectos tóxicos ni provoca irritabilidad local. Su utilización es aceptada en un rango de concentraciones de 0,5 - 5% de suspensión acuosa (Auletta, 2002; Gad, 2006). Se estudiaron dos suspensiones empleando este vehículo a concentraciones diferentes 0,5% y 2% con el objetivo de definir la que favoreciera una mejor absorción y por lo tanto, pudiera ser utilizada en los estudios preclínicos requeridos en el desarrollo de este producto. Se utilizó como solución de referencia o control una solución hidroalcohólica al 15%. Para la selección del vehículo a emplear se tomó en cuenta el criterio planteado por la OECD según el cual es recomendable, siempre que sea posible, considerar primeramente el uso de soluciones o suspensiones acuosas (OECD, 2001).

II.2.3 Preparación de las sustancias de ensayo

Se prepararon las soluciones de CMC (SIGMA) al 2% y 0,5%, dejándolas en reposo 24 horas antes de utilizarlas. La concentración de las soluciones a administrar fue de 50 mg/mL, se pesaron 5 g de vainillina para ambas soluciones, y se completó a 100 mL de la solución de CMC al 0,5 % y al 2%. Se agitaron durante cinco minutos a una velocidad de 245 rpm; posteriormente, se llevó a un baño termostatado durante 50 minutos, a una temperatura de 40°C. Para preparar la solución hidroalcohólica al 15 % se pesaron 5 g de vainillina se disolvieron en 15 mL de etanol y luego de disuelta se completó hasta 100 mL de agua.

II.2.4 Diseño experimental

Se utilizaron 36 animales machos, adultos jóvenes, de la línea Wistar, en un rango de peso entre 200-250 g. Los animales se recibieron con certificado de salud y fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de seis en cajas T4 autoclaveables plásticas (Policarbonato) y traslúcidas, con fondo y tapa de rejilla intercambiables.

Grupos experimentales

Grupo 1. 12 machos (solución carboximetilcelulosa al 0,5 %)

Grupo 2. 12 machos (solución carboximetilcelulosa al 2 %)

Grupo 3. 12 machos (solución hidroalcohólica al 15 %)

Para la selección de los intervalos de tiempo se tuvo en cuenta lo que refiere Kwon, (2002), para determinar los puntos de la curva de concentración contra tiempo en un estudio farmacocinético se recomiendan tomar como mínimo hasta siete puntos. Mientras más puntos de muestreo se tomen, mejor será el ajuste y se logra un buen perfil farmacocinético. Por lo que a los animales, se les tomaron muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min.) para cuantificar los niveles plasmáticos de la sustancia de ensayo. De cada rata se tomaron cuatro extracciones de sangre correspondiendo siempre la primera al inicio (antes de la administración) y las otras tres a diferentes tiempos posterior a la administración. Se emplearon tres animales por punto de muestreo. Este diseño nos permitió utilizar un número pequeño de animales por formulación estudiada (12 animales en cada una), para obtener niveles plasmáticos en la fase de absorción y eliminación de cada animal. El mismo permite definir con precisión los valores de Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y evaluar de forma preliminar la cinética general de la vainillina en este modelo animal por vía oral. En la tabla 2 se muestra el diseño empleado.

Tabla 2. Diseño empleado en la evaluación farmacocinética para la selección del vehículo.

Grupo	Tiempos de muestreo (min)
Primer	0,1,15,45
Segundo	0,3,20,60
Tercero	0,5,30,90
Cuarto	0,10,120,180

La extracción de sangre se realizó del seno orbital de los animales anestesiados con éter dietílico y utilizando para ello capilares heparinizados. Se extrajo un mL por punto. La sangre fue recogida directamente en viales plásticos (Eppendorf) de 1,5 mL los cuales contenían en su interior cinco μ L de heparina, a continuación se centrifugó a 12 000 rpm durante cinco minutos, para la separación del plasma, del cual se tomó una

alícuota de 0,5 mL que fue transferida a viales plásticos (1,5 mL) con tapa y fondo cónico se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Se trabajaron seis ratas cada día para los tres grupos. Después de cada extracción se les suministró agua por vía oral (\approx 2 mL), para reemplazar el volumen de sangre, aunque tenían libre acceso al agua en las cajas. Estos animales estaban en ayuna desde el día anterior.

Para la determinación de los niveles plasmáticos se utilizó un método analítico validado en el Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad del Centro Nacional de Toxicología (CENATOX) Anexo 3 (Olivera, 2002). Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua bidestilada. Los patrones de plasma se prepararon a partir de un pool de plasma obtenido de sangre de ratas de la misma colonia. Los solventes empleados para la cromatografía fueron metanol y acetonitrilo grado HPLC (Riedel-de Haën, Alemania).

II.2.5 Condiciones cromatográficas y procedimiento de extracción

Se utilizó un Cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-6A a 230 nm, y una columna analítica Merck ODS (4,6 mm i.d x 25 cm). La fase móvil consistió en una mezcla de tampón fosfato 100 mM (pH = 5,5): Metanol (1:1), a un flujo de 1 mL/min a una temperatura de 50°C. La cuantificación se realizó determinando la altura de los picos obtenidos en los cromatogramas correspondientes al analito. Se procedió a la extracción según técnica validada (Olivera *et al.*, 2002).

II.2.6 Análisis farmacocinético

Los datos de concentración plasmática fueron analizados utilizando el programa de computación WinNonlin profesional, versión 5.1 A; Pharsight Co., 2005. Una vez obtenidos los niveles plasmáticos tras la administración de las formulaciones sometidas a estudio se estimaron mediante técnicas “no compartimentales” los parámetros farmacocinéticos siguientes:

C_{máx} y T_{máx}: Se obtuvieron directamente de los datos experimentales.

$AUC_{0-t} = \int_0^t C(t)dt$: Área hasta el último tiempo experimental: Es un indicador de la cantidad de fármaco absorbido, C(t) es la concentración de fármaco en plasma. Se calcula por el método de los trapecios.

AUC_{0-∞} Área total: es la suma del área experimental (hasta el tiempo T) y el área calculada por extrapolación del modelo que se ajusta en la fase de eliminación terminal.

$$F_{Rel.} = \frac{AUC_{0\ CMC}^{\infty}}{AUC_{0\ solHA}^{\infty}} \text{ Biodisponibilidad}$$

II.3 Estudio farmacocinético de la vainillina administrada por vía endovenosa en ratas Sprague Dawley

Se realizó en el Centro de Toxicología Experimental, (CETEX) del Centro Nacional para la producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y la analítica en el Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad del Centro Nacional de Toxicología (CENATOX).

II.3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 42 ratas machos Sprague Dawley, procedentes de la División de Animales Gnotobióticos del (CENPALAB), los cuales tenían un peso entre 200 y 250 g. El ensayo se llevó a cabo en una sala con ambiente controlado a temperatura de 22±2°C, humedad relativa 65-80% y ciclo luz oscuridad 12:12. Cada animal fue identificado mediante una tarjeta de datos que incluyó: número asignado, peso, fecha de inicio, fecha de muestreo y observaciones.

Los animales se alojaron en grupos de tres y dos en cajas T4 autoclaveables, plásticas (policarbonato), traslúcidas, con fondo y tapa de rejilla intercambiables. El alimento peletizado, fórmula EMO 1002 (ALYCO, CENPALAB) se ofreció esterilizado por calor húmedo en autoclave. El agua autoclaveada se depositó en biberones plásticos traslúcidos de 500 mL con pipetas de acero inoxidable. Se realizó limpieza

diaria de la instalación y de todos los utensilios para el mantenimiento animal. La desinfección de todas las superficies se realizó con Tego 51 al 1%. Los animales se identificaron del uno al seis mediante marcas o muescas realizadas en la oreja para cada uno de los grupos de extracción correspondiente. Las cajas en que fueron ubicados se identificaron para cada grupo.

II.3.2 Preparación de la sustancia de ensayo

Se administró una dosis única por vía endovenosa de 100 mg/Kg de peso, empleando para ello una solución de 12,5 mg/mL de vainillina en solución alcohólica al 15 % la cual fue preparada de la manera siguiente. Se preparó una solución madre disolviendo 1,25 g de vainillina en 15 mL de etanol y se completó hasta un volumen de 100 mL de solución salina fisiológica. La selección de esta dosis responde a los estudios farmacodinámicos reportados en la literatura para la molécula en estudio (Kirwin y Galvin, 1993; Zhang *et al.*, 2004 y Lirdprapamongkol *et al.*, 2005).

II.3.3 Diseño experimental

Cada animal se mantuvo en ayuno desde la noche anterior al día de la administración de la formulación a evaluar permitiéndosele solo tomar agua libremente. Los animales fueron pesados el día de la administración antes de que se produjera la misma.

El volumen que se administró se calculó a partir del peso de cada animal, utilizando una jeringuilla plástica de un mL, canalizando la vena de la cola y previa desinfección de la zona de punción. La solución fue administrada con un intervalo de tiempo de un animal a otro de forma tal que permitiera la extracción sin interferencias de las muestras de sangre en cada uno de los animales. La administración de la dosis a estudiar se realizó en forma de dosis única mediante bolo endovenoso.

A los animales se les tomó muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo antes de administrar el producto e inmediatamente después de la administración a los 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 minutos después de la administración según (Kwon, 2002), para cuantificar los niveles plasmáticos de la sustancia de ensayo. A cada rata se le realizaron tres extracciones de sangre correspondiendo siempre la primera al tiempo igual cero y las otras dos a diferentes

tiempos posterior a la administración. Se emplearon seis animales por punto de muestreo. Las extracciones se realizaron del seno orbital de los animales anestesiados con éter dietílico, y utilizando para ello capilares heparinizados. El volumen de muestra (sangre total) a obtener fue de 2 mL por punto. El esquema de los grupos y el tiempo de muestreo asignado a cada muestra en la tabla 3.

La sangre fue vertida en viales plásticos de dos mL de capacidad de fondo cónico, el cual contenía en su interior cinco μ L de heparina e inmediatamente centrifugadas a 12 000 rpm durante dos minutos. Se tomó una alícuota de un mL de plasma el cual fue transferido a viales plásticos (1,5 mL), fueron tomadas por duplicado. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis por HPLC. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas del estudio anterior.

Tabla 3. Diseño empleado en la evaluación farmacocinética de la vainillina administrado por vía endovenosa en ratas Sprague Dawley.

Grupo	Tiempos de muestreo (min.)
Primero	1 y 30
Segundo	3 y 45
Tercero	5 y 60
Cuarto	10 y 75
Quinto	15 y 90
Sexto	20 y 120
Séptimo	25 y 180

II.3.4 Análisis farmacocinético

Los datos de concentración plasmática en función del tiempo fueron analizados utilizando el programa de computación WinNonlin profesional, versión 5.1 A; Pharsight Co., 2005. Se realizó un análisis no compartimental para el cálculo de los principales parámetros farmacocinético a partir de las ecuaciones que se exponen a continuación:

- K_e : Se calculó mediante el método de regresión lineal de la fase de eliminación terminal.

- $T_{1/2elim}$: Se calculó mediante la relación $T_{1/2} = 0.693/K_e$

- $C_{\text{máx}}$ y $T_{\text{máx}}$: Se obtuvo directamente de los datos experimentales.
- $AUC_{0-t} = \int_0^t C(t)dt$: Área hasta el último tiempo experimental: Es un indicador de la cantidad de fármaco absorbido, $C(t)$ es la concentración de fármaco en plasma. Se calcula por el método de los trapecios.
- $AUC_{0-\infty}$ Área total: es la suma del área experimental (hasta el tiempo T) y el área calculada por extrapolación del modelo que se ajusta en la fase de eliminación terminal.
- MRT: Se calculó por la relación $MRT = AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}$
- CL: Se determinó por la relación $CL = \text{Dosis} / AUC_{0-\infty}$
- Volumen de distribución (V_d Área) $V_z = \text{Dosis} / k_e \times AUC_{0-\infty}$

Se realizó el cálculo de los parámetros de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) y la media aritmética para valores de concentración plasmática y para cada parámetro farmacocinético, empleando el programa STATGRAPHICS Plus 5.1.

II.4 Estudio de linealidad cinética de la vainillina administrada por vía endovenosa a perros Beagles

II.4.1 Animales de experimentación

Se realizó en el CETEX del CENPALAB y la analítica en el CENATOX. Se utilizaron seis perros Cenp:Beag, machos, jóvenes, con pesos corporales comprendidos entre 10 y 15 Kg, procedentes de la División de Animales Convencionales del CENPALAB. Los animales se alojaron individualmente en jaulas metálicas de acero inoxidable, con bandeja para recolección de desechos (INPUD), con paredes lisas de 76 cm de alto por 72 cm de ancho y 101,5 cm de profundidad, con puerta de rejilla. Fueron alimentados con pienso granulado, fórmula CCO1503 procedente del CENPALAB, en cantidades de 400 g diarios y aproximadamente 800 cm³ de agua. Después de su

llegada al local de experimentación, los perros se mantuvieron por un período de readaptación de 15 días previos al estudio.

II.4.2 Preparación de la sustancia de ensayo

Se administró una dosis única por vía endovenosa de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg de peso, empleando soluciones de 9, 18, 36 y 72 mg/mL respectivamente en solución alcohólica al 15 % las cuales fueron preparadas de la manera siguiente: se preparó una solución madre disolviendo 20 g de vainillina en 100 mL en solución hidroalcohólica al 30% (se disuelven los 20 g de vainillina en 30 mL de etanol y se completa a 100 mL de solución salina fisiológica): para la dosis de 15 mg/Kg se tomaron 1,13 mL de la solución madre y se disolvieron en 25 mL de solución salina, la de 30 mg/Kg se tomaron 4,5 mL de la solución madre y se disolvieron en 50 mL, la de 60 mg/Kg se tomaron 9 mL de la solución madre y se disolvieron en 50 mL y la dosis de 120 mg/Kg se tomaron 9 mL de la solución madre y se disolvieron en 25 mL de solución salina fisiológica.

Para la selección de los niveles de dosis partimos de que la dosis estimada para su uso en el humano es de uno a cuatro gramos diarios para un humano de 70 Kg promedio de peso corporal (Abraham, 1991). Al extrapolar los valores del rango terapéutico en el humano para una rata de peso de 250 g lo cual corresponde a un rango de 14 - 57 mg/Kg de peso corporal. Se tomó la dosis de 60 mg/Kg como la dosis más cercana al valor terapéutico, se tomaron dos dosis por debajo (15 y 30 mg/Kg) y una por encima (120 mg/Kg) siendo siempre la siguiente el doble de la que antecede.

II.4.3 Diseño experimental

Fue un diseño cuadrado latino, cruzado y aleatorizado con cuatro niveles de dosis y cuatro periodos de estudio. Se conformaron cuatro grupos de animales (2 grupos de 2 animales y 2 grupos de un animal) de forma tal que todos los animales recibieron cada uno de los niveles de dosis a estudiar (tabla 4). La distribución de los animales por grupo y nivel de dosis se realizó de forma aleatoria. Entre cada periodo de estudio medió un periodo de lavado de 7 días.

Tabla 4. Distribución de los perros Beagles utilizados en el estudio de la vainillina, administrada por vía endovenosa, según las dosis y períodos evaluados.

Período	15 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	120 mg/kg
I	Animales 1 y 2	Animales 3 y 5	Animal 6	Animal 4
II	Animal 4	Animales 1 y 2	Animales 3 y 5	Animal 6
III	Animal 6	Animal 4	Animales 1 y 2	Animales 3 y 5
IV	Animales 3 y 5	Animal 6	Animal 4	Animales 1 y 2

Cada animal se mantuvo en ayuno desde la noche anterior al día de la administración, permitiéndosele solo tomar agua libremente. Se distribuyeron en jaulas individuales. Se pesaron al inicio de cada período del estudio para calcular y rectificar el volumen de la solución a administrar si fuese necesario por aumento del peso corporal.

El volumen a administrar se calculó a partir del peso de cada animal, utilizando una jeringuilla de cristal excéntrica de 20 mL, canalizando la vena cefálica y desinfección de la zona de punción. La administración de cada una de las dosis estudiadas se realizó en forma de dosis única mediante bolo endovenoso.

Las extracciones se realizaron colocando un catéter en la vena yugular o por punción directa de las venas siguientes: yugular, safena y cefálica, empleando para ello jeringuillas de cristal, excéntricas de 5 mL y agujas No. 20 o 21. La secuencia de extracción fue la siguiente: antes de administrar el producto, inmediatamente después de terminada la administración y a los 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120 y 180 minutos después de la administración según (Kwon, 2002). El volumen a extraer fue de 5 mL. La sangre fue vertida en tubos de cristal de 10 mL de capacidad de fondo cónico, el cual contenía en su interior 5 μ L de heparina e inmediatamente centrifugadas a 12 000 rpm durante 10 minutos. Del plasma se tomó una alícuota de un mL el cual fue transferido a viales plásticos (2 mL) con tapa y fondo cónico, fueron tomadas por duplicado. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis por HPLC. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas del estudio anterior.

II.4.4 Análisis farmacocinético

El análisis farmacocinético se realizó igual que el estudio anterior.

II.4.5 Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 5,1. Se calcularon los estadígrafos: media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada parámetro evaluado. Se evaluó los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza mediante los test de Chi-Cuadrado, Test de Skewness y el test de Kurtosis. Los parámetros que cumplieron con estos supuestos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando el test de Rangos Múltiples para determinar los pares de valores que difieren entre si. En caso contrario, se empleo el test no paramétrico de Kruskal - Wallis. El AUC normalizado y el Vss se analizaron mediante un test ANOVA. La Cmax normalizada, el $t_{1/2}$, el CL y el Vz fueron analizados mediante el test de Kruskal - Wallis. Se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la relación entre el AUC y la Cmax con los diferentes niveles de dosis. En todos los casos se estableció un nivel de significación $p < 0,05$.

II.5 Estudios farmacocinéticos de la vainillina marcada con ¹²⁵I

Los estudios se realizaron en el Centro de Isótopos Radiactivos (CENTIS).

II.5.1 Procedimiento general de marcaje

Se utilizó el método del yodógeno (Fraker, 1978; Salacinski, 1981) en fase sólida. En un tubo Eppendorff de 250 μ L, con el yodógeno previamente preparado, se adicionaron 100 μ L de solución tampón de fosfato pH 7,4 y 10 μ L de ¹²⁵I. Se agitó durante cinco minutos y se adicionó 10 μ L de vainillina de 30 mg/mL en etanol/ tampón de fosfato pH 7,4 al 50 %. Se agitó durante 10 minutos más.

Posteriormente, se extrajo la reacción del marcaje con una jeringuilla y se aplicó en una columna de SepPak C18 (Water, EE.UU), se realizaron dos eluciones con un mL de tampón de fosfato y tres eluciones de un mL con etanol/tampón al 50 %. Todas las fracciones se midieron en un curímetro (Capintec, EE.UU). El yodo libre eluyó en las

primeras fracciones de tampón y la vainillina marcada se encontró en la primera fracción de etanol/tampón, se determinó el rendimiento por el por ciento en esta fracción con relación al total utilizado. La purificación se realizó en cartuchos de SepPak C18 (Waters, EEUU), después de aplicar la mezcla de reacción se eluyó el exceso de yodo con dos fracciones de dos mL de NaCl 0,9% y se extrajo la [¹²⁵I]-vainillina en tres fracciones de un mL de etanol al 50 % en NaCl 0,9 %. Las fracciones tres y cuatro conteniendo la [¹²⁵I]-vainillina fueron utilizadas en los estudios para preparar las soluciones a administrar.

II.5.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dowley machos (CENPALAB), con un rango de peso corporal entre 204 a 270 g (236 ± 16 g). Se alojaron en condiciones convencionales en jaulas de policarbonato (Tecniplast, Italia).

II.5.3 Ensayos de la vainillina marcada con ¹²⁵ I administrada por vía oral y endovenosa

Los animales recibieron una dosis de 20 mg/Kg de peso corporal, para la administración oral y de 10 mg/Kg para la administración endovenosa. La selección de las dosis estuvo dada por las características de solubilidad de la vainillina en el yodo. La cantidad necesaria de vainillina para la dosis especificada se pesó y disolvió en 0,3 mL de etanol. Posteriormente se le adicionó la [¹²⁵I]-vainillina en solución de NaCl 0,9 %.

Para la administración oral: se prepararon 7,5 mL de la disolución conteniendo 16 mg/mL de vainillina y 27 MBq (730 μ Ci) de [¹²⁵I]-vainillina, para una concentración radiactiva de 3,6 MBq/mL (97,3 μ Ci/mL) y una actividad específica de 0,23 MBq/mg (6,1 μ Ci/mg). El contenido de etanol fue del 13,3 % y se administró 0,3 mL por animal.

Para la administración endovenosa: se prepararon seis mL de la disolución conteniendo 7,8 mg/mL de vainillina y 21 MBq (570 μ Ci) de [¹²⁵I]-vainillina, para una concentración radiactiva de 3,5 MBq/mL (95 μ Ci/mL) y una actividad específica de

0,45 MBq/mg (12,2 μ Ci/mg). El contenido de etanol fue del 16,7 % y se administró 0,3 mL por animal.

II.5.4 Diseño experimental.

Se formaron cuatro grupos de cuatro animales cada uno y se les administró la dosis indicada. Los animales del uno al ocho se colocaron en jaulas convencionales de policarbonato con fondo de reja inoxidable (Tecniplast, Italia) y papel absorbente para recoger los residuos, los animales del nueve al 16 se colocaron individualmente en jaulas metabólicas (Tecniplast, Italia) para la determinación del perfil de excreción. La planificación de los muestreos y sacrificios por grupo de animales se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Esquema de muestreo después de la administración oral y endovenosa de [125 I]-vainillina.

Rata No.	Tiempos de muestreo de sangre y disección											
	1min	2min	5min	10min	15min	30min	1h	2h	4h	8h	12h	24h
1	x		x		x		X <input type="checkbox"/>					
2	x		x		x		X <input type="checkbox"/>					
3	x		x		x		X <input type="checkbox"/>					
4	x		x		x		X <input type="checkbox"/>					
5		x		x		x			X <input type="checkbox"/>			
6		x		x		x			X <input type="checkbox"/>			
7		x		x		x			X <input type="checkbox"/>			
8		x		x		x			X <input type="checkbox"/>			
9	x		x					x			X <input type="checkbox"/>	
10	x		x					x			X <input type="checkbox"/>	
11	x		x					x			X <input type="checkbox"/>	
12	x		x					x			X <input type="checkbox"/>	
13		x		x						x		X <input type="checkbox"/>
14		x		x						x		X <input type="checkbox"/>
15		x		x						x		X <input type="checkbox"/>
16		x		x						x		X <input type="checkbox"/>

Sacrificio y disección

Las muestras de sangre, no superior a 70 μ L, se tomaron mediante capilar heparinizado a través del plexo retro orbital. Cuatro extracciones de sangre de 70 μ L representan el 1,7 % del volumen de sangre de una rata de 225 g promedio (Brown, 1997) a extraerse en un intervalo de tiempo mínimo de una hora, para evitar un efecto adverso en la fisiología del animal o en la farmacocinética del producto. La sangre se vació en tubos ependorff de 0,5 mL heparinizados y se midió la radiactividad en ellas

en un contador automático (Berthold, LB 2104, Alemania). Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante un minuto y se tomó una muestra de plasma para su medición en las mismas condiciones.

Los valores de concentración encontrados en sangre, plasma y eritrocitos referidos todos a la unidad de volumen de sangre ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de sangre).

Esto permite apreciar la relación: $Q_S = Q_P + Q_E$ donde:

Q_S es la cantidad total en sangre, Q_P es la cantidad en plasma y Q_E es la cantidad

en eritrocitos.
$$Q_S = \frac{Q_{S\%} * D}{100} \quad Q_P = \frac{Q_{P\%} * D}{100} * V_P \quad V_P = 1 - H$$

Donde:

$Q_{S\%}$ es la cantidad en sangre expresada en porcentaje de la dosis por mL (%D/mL), $Q_{P\%}$ es la cantidad en plasma expresada en porcentaje de la dosis por mL (%D/mL), D es la cantidad administrada en microgramos, H es el hematocrito y V_P es el volumen de plasma en un mL de sangre.

A partir de las ecuaciones generales de los modelos utilizados:

$$C_{(t)} = D \cdot (A \cdot e^{-\alpha(t-t_D)} + B \cdot e^{-\beta(t-t_D)}) \quad (\text{EV})$$

$$C_{(t)} = D \cdot (A \cdot e^{-\alpha(t-t_D)} + B \cdot e^{-\beta(t-t_D)} - (A + B) \cdot e^{-k\alpha(t-t_D)}) \quad (\text{VO})$$

realizada por Monolix (donde $C(t)$ es la concentración a tiempo t , t_D es el tiempo al que se administra la dosis, $t_D=0$, D es la dosis, A , B , α y β son las constantes del modelo), se estimaron los valores de concentración a cada valor de t para cada individuo.

El sacrificio para la disección de órganos y tejidos se realizó mediante anestesia con éter dietílico. Después de sacrificar los animales se realizó la disección de los órganos y tejidos siguientes: hígado, bazo, riñones, corazón, pulmones, cerebro, músculo, tejido adiposo, estómago, intestino delgado, intestino grueso y tiroides.

El patrón de excreción se determinó colectando orina y heces fecales a las cuatro, 12 y 24 h en los animales del nueve al 16. Las muestras de orina colectadas se llevaron

a un volumen de 50 mL con NaCl 0,9 % y de ella se tomó un mL para su medición en el contador automático (Berthold, LB 2104, Alemania). Las muestras de heces fecales se homogenizaron en 50 mL de NaCl 0,9 % y se tomó un mL para su medición en el contador automático. Se calculó el por ciento de dosis acumulada y el por ciento de dosis por gramo en cada muestra. A partir de estos datos se determinó la concentración en unidades de masa equivalentes de la vainillina en las muestras. Para ello se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel, especialmente programada para estos fines.

II.5.5 Procesamiento estadístico

El procesamiento de los datos para el análisis farmacocinético se utilizó el sistema Monolix, versión 3.1; 2009 (Lavielle, 2009) siguiendo el análisis compartimental. Este sistema de cálculo, y su algoritmo SAEN (del inglés Stochastic approximation expectation maximization), combinado con código Monte Carlo (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) (Kuhn, 2004) dedicado al análisis de modelos no lineales de efectos mixtos (Savic, 2011), ha demostrado ser robusto y con amplias posibilidades de modelación y simulación en estudios farmacocinéticos (Samson, 2006, 2007).

II.5.6 Cálculo de la biodisponibilidad

Tomando en consideración que el programa Monolix, no realiza el cálculo de algunos parámetros farmacocinéticos como el AUC, $t_{1/2}$, y estos son necesarios para el cálculo de la biodisponibilidad, se calcularon empleando los datos de concentración plasmática promedio obtenidos de la determinación de los niveles en sangre con el contador automático (Berthold, LB 2104, Alemania). Una vez obtenidos los niveles plasmáticos promedios se estimaron mediante técnicas “no compartimentales” utilizando el programa de computación WinNonlin profesional, versión 5.1 A; Pharsight Co., 2005. Se calcularon los mismos parámetros farmacocinéticos de los estudios anteriores y la biodisponibilidad relativa:

$$F_{Rel.} = \frac{AUC_{0\ Oral}^{\infty}}{AUC_{0\ EV}^{\infty}} \times \frac{D_{ref}}{D_{test}} \text{ Biodisponibilidad Relativa}$$

II.6 Estudios Toxicológicos.

Para estos estudios, se utilizaron ratas, este modelo animal es una de las especies más empleadas en los estudios toxicológicos, debido principalmente a similitudes metabólicas con la especie humana, así como a su pequeño tamaño y naturaleza relativamente dócil. Además, tiene un período de vida corto y como consecuencia de esto, un breve ciclo de gestación. Esto permite el estudio del comportamiento de un determinado producto durante una gran parte de la vida del animal. Además, la amplia utilización de esta especie en la investigación científica ha permitido la acumulación de datos con respecto a su nutrición, enfermedades y biología en general (Johnson, 2007).

II.6.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral. Método de clase tóxica aguda (CTA)

El estudio se realizó en la Dirección de la Unidad de Ciencia y Técnica de Base, Control Biológico del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos CIDEM (Mercolo).

El método de clases tóxica aguda (CTA), basado en las evaluaciones biométricas junto con los resultados experimentales demuestra que es una alternativa sensible y fiable a la prueba de la DL₅₀ (Schlede, 1995). Se utilizó la norma No.423 "Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method" de la OECD, del año 2001. Caracterizada por la administración única a un número reducido de animales. En las CTA no se requiere de grupo control siempre que el vehículo usado sea común su uso. Debido a las condiciones y objetivos de este ensayo en el que se realizaron pruebas de hematología, bioquímica y patología y era necesario efectuar comparaciones se incluyó un grupo control.

II.6.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron seis ratas (tres hembras y tres machos), para el grupo tratado y seis para el grupo control, adultos jóvenes entre 42 y 50 días, de la línea Wistar. El peso de las hembras fue de 148,8 a 150,0 g, y el de los machos se comportó entre 171,0 a

172,8 g. Las hembras nulíparas y no grávidas. Se alojaron en grupos de tres en cajas T4 autoclaveables plásticas (Policarbonato) y traslúcidas, con fondo y tapa de rejilla intercambiables.

II.6.1.2 Preparación de la sustancia de ensayo

Se preparó una solución de carboximetilcelulosa (CMC) a 0,5%, dejándose en reposo 24 horas antes de utilizarla. Para preparar la solución a la concentración de 200 mg/mL, se pesaron 5 g de vainillina (Balanza digital Sartorius), se añadieron 25 mL de la solución de CMC al 0,5 %, y se agitó durante 5 minutos a una velocidad de 245 rpm (Minizaranda Minzard 20001), posteriormente se llevó a un baño termostatado por espacio de 50 minutos, a una temperatura de 40°C (Baño termostatado MUW W1).

II.6.1.3 Diseño experimental

Los animales se mantuvieron en cuarentena durante los siete días establecidos por las normas de crianza y manejo de animales de experimentación y según procedimientos normalizados de trabajo (PNT). Las ratas se pesaron, marcaron individualmente y se distribuyeron al azar, 24 horas antes de iniciar el estudio. Un día antes de comenzar el estudio se tomó muestra de sangre para las determinaciones hematológicas y bioquímicas. Una vez distribuidas las ratas, usando tres animales de cada sexo por grupo experimental, se eliminó el alimento y la camada. Siguiendo este período de ayuno se calculó el volumen administrado según el nivel de dosis correspondiente.

Grupos experimentales:

Grupo Hembras: 3 hembras **(1H, 2H, 3H)**

Grupo Machos: 3 machos **(1M, 2M, 3M)**

Grupo Hembras Control: 3 hembras **(1HC, 2HC, 3HC)**

Grupo Machos Control: 3 machos **(1MC, 2MC, 3MC)**

La administración del producto se realizó comenzando por el nivel de dosis de 2000 mg/Kg de peso corporal, mediante intubación intragástrica. A los animales del grupo

control se administró solamente la solución de CMC al 0,5%. Transcurridas unas tres horas de la administración, los animales recibieron agua y alimentos *ad libitum*.

El pesaje se realizó, a los 0, 7 y 14 días, a la misma hora de la mañana, para determinar posibles variaciones de peso (anexo 4). Finalizada la administración, comenzó la observación clínica de los signos y síntomas más representativos (anexo 5). Las observaciones se hicieron diarias con el fin de detectar cualquier signo de toxicidad. Se exploró la conducta de los animales a través de la actividad motora espontánea, la actividad exploratoria, la conducta social y los movimientos posturales. Al concluir los días de observación se tomó muestras de sangre para las determinaciones hematológicas y bioquímicas, se sacrificaron los animales, y se enviaron al departamento de Anatomía Patológica.

II.6.1.4 Determinaciones hematológicas y bioquímicas

Se tomaron muestras de sangre por punción del seno orbital de los animales, previa anestesia con éter dietílico y utilizando capilares heparinizados. Se determinó: hemoglobina, hematocrito, conteo diferencial y global de leucocitos y eritrocitos. Las técnicas analíticas utilizadas según Suardíaz *et al.*, 2004.

Se determinó: Aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), glucosa, colesterol y urea. Se procedió experimentalmente igual que las determinaciones hematológicas. Las técnicas analíticas utilizadas según Suardíaz *et al.*, 2004.

II.6.1.5 Determinaciones anatomopatológicas

II.6.1.5.1 Examen macroscópico e histopatológico

La eutanasia se efectuó mediante anestesia con éter dietílico, seguida de exsanguinación y dislocación cervical. Se tuvieron en cuenta los aspectos siguientes: coloración, tamaño, forma, peso y distribución anatómica. Una vez realizada la inspección macroscópica se procedió a la extracción de los órganos o fragmentos de órganos según el caso. Se muestrearon del sistema digestivo el estómago, la pared estomacal (incluyendo píloro y cardias), el intestino delgado, el intestino grueso, los ganglios mesentéricos y también los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones,

suprarrenales, testículos y ovarios. Los órganos y tejidos fijados fueron seccionados adecuadamente e incluidos en parafina, cortados entre 4 y 6 micras y extendidos en láminas, luego de lo cual se procedió a la tinción con Hematoxilina-Eosina. Las láminas generadas fueron observadas al microscopio Carl Zeiss Standard 25. Las muestras fueron seccionadas y dispuestas siguiendo las normas establecidas para ratas, referidas en las directrices de la OECD.

II.6.1.6 Análisis estadístico

Se utilizó el programa “SPSS. 11.0 para Windows” para estimar las variaciones de peso en los días 0, 7 y 14 y las variaciones entre los parámetros hematológicos y bioquímicos en los días 0 y 14 a través de un Análisis descriptivo con los estadígrafos de todas las variables, un análisis de t-student de muestras independientes comparándose los grupos (vainillina, control); sexo; días (0, 7 y 14, para el peso; 0 y 14, para las variables hematológicas y bioquímicas). También se realizó un análisis de varianza factorial donde los factores a analizar fueron grupo, sexo y días con respecto a la variable peso. La comparación de medias se realizó según la dócima de Tukey.

II.6.2 Evaluación de la toxicidad a dosis repetida 90 días

El ensayo se realizó en el CETEX del CENPALAB. Tomando como base las recomendaciones de la metodología descrita en la norma 408 de la OECD, para el desarrollo de estudios de toxicidad.

II.6.2.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratas Sprague Dawley provenientes de la División de Animales Gnotobióticos del CENPALAB, jóvenes (6-7 semanas de edad) con un rango de peso aproximado de 176-225 g, a las cuales se administraron tres regímenes de dosificación: 160, 400 y 800 mg/Kg de peso corporal diarios, durante 13 semanas, en condiciones de sala protegida y ambiente controlado: $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 70-85 % de humedad relativa y fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Para la selección de los niveles de dosis partimos de que la dosis estimada para su uso en el humano es de uno a cuatro gramos diarios para un humano de 70 Kg promedio de peso corporal (Abraham, 1991). Al extrapolar los valores del rango terapéutico en el humano para una rata de 250 g de peso, corresponde a un rango de 14 - 57 mg/Kg de peso corporal y teniendo en cuenta que la regulación (OECD, 1998) establece:

- Que la dosis máxima debe producir efectos tóxicos, pero no una alta incidencia de mortalidad (no + 10%), se propone como dosis alta 800 mg/Kg. Para ello se tuvo en cuenta resultados de un ensayo agudo oral en ratas, en el cual a la dosis de 300 mg/Kg se obtuvo efectos tóxicos reversibles, mientras que a 1000 mg/Kg existieron efectos tóxicos y mortalidad (Aldana, 2000).
- Recomienda que la dosis más baja sea superior a la terapéutica y no produzca toxicidad, se establece como dosis baja 160 mg/Kg.
- Teniendo en cuenta la media aritmética entre la dosis baja y alta, además de la solubilidad de la sustancia y que sea ligeramente tóxica, se establece como dosis media 400 mg/Kg.

II.6.2.2 Preparación de la sustancia

Se utilizó como vehículo una solución de (CMC) al 0,5 %. Se prepararon tres soluciones de Vainillina en la solución de CMC al 0,5 %: dosis alta: 40 mg/mL de Vainillina, dosis media: 20 mg/mL, y dosis baja: 8 mg/mL, con el objetivo de minimizar las diferencias de volumen a administrar. El producto se administró por vía oral, mediante intubación intragástrica, utilizando una cánula curva metálica (gavage). Los cálculos para determinar los volúmenes administrados se explican en el Anexo 6. A medida que los animales aumentaron de peso, se reajustó el volumen de la sustancia de ensayo, con vistas a mantener la dosis correspondiente. Como volumen límite de exposición se utilizó el previsto para la administración oral de soluciones no acuosas (1 mL/100 g de peso corporal).

II.6.2.3 Diseño experimental.

Cada grupo estuvo formado por un total de 20 animales (10 hembras y 10 machos), exceptuando los grupos Control y Dosis Alta, los cuales contaron con 32 animales (16 hembras y 16 machos). Los animales adicionales de los grupos Control y Dosis Alta (6/sexo para cada uno) estuvieron destinados al periodo de recuperación, los cuales una vez terminadas las 13 semanas de administración de sustancias, permanecieron en la sala experimental, con el objetivo de determinar la reversibilidad o persistencia de algún posible efecto tóxico. El periodo de recuperación fue de tres semanas. Se establecieron cuatro grupos experimentales, empleando el programa de números aleatorios LABTOOLS9.

Grupo 1: Control	(solución de CMC al 0,5%)
Grupo 2: Dosis Baja	(160 mg/Kg de peso corporal)
Grupo 3: Dosis Media	(400 mg/Kg de peso corporal)
Grupo 4: Dosis Alta	(800 mg/Kg de peso corporal)

El ensayo tuvo una duración de 13 semanas, con un esquema de administración en base a seis días de la semana, aunque la semana tiene siete días, sin embargo, basado sobre todo en las consideraciones prácticas, cuando se administra por gavage es aceptable administrar en la semana en base hasta cinco días (Wallace, 2008). Las dosis se repartieron en dos administraciones diarias, una en la mañana y la segunda en la tarde. Los animales se mantuvieron en ayuno desde el día previo al comienzo del ensayo y se pesaron al inicio de cada semana, para determinar posibles variaciones de peso.

II.6.2.4 Observaciones realizadas.

El período de observación fue de 13 semanas, para evaluar el estado físico de los animales. Se realizaron dos observaciones, una en la mañana y otra en la tarde. Se observó particularmente la aparición de signos relacionados con la administración oral, así como cambios en piel, pelaje, ojos, membranas mucosas, la ocurrencia de secreciones o excreciones y actividad del sistema autónomo (lagrimeo, piloerección,

entre otros). Se prestó atención a cambios en la locomoción, postura, respuesta a la manipulación, movimientos tónicos y clónicos, presencia de estereotipos, entre otros. Las heces se observaron para detectar alteraciones en el aspecto y la consistencia. La medición semanal del peso corporal se determinó en una Balanza Sartorius PT-1200 (capacidad de pesada 1210 g) de forma individual a todos los animales, antes de administrar la sustancia por primera vez y luego semanalmente.

II.6.2.5 Consumo de agua y alimentos

El agua y el alimento se suministraron diariamente a la misma hora. Las cantidades ofrecidas y las no consumidas se anotaron en el registro correspondiente. El consumo de alimento y agua se determinó una vez por semana hasta la conclusión del estudio para determinar si se produjeron variaciones en sus comportamientos.

II.6.2.6 Hematología y bioquímica

Se tomaron muestras de sangre para realizar los exámenes de hematología y de bioquímica sanguínea a todos los animales antes de comenzar el estudio, en la semana 13, y luego del periodo de recuperación (al finalizar el ensayo). La extracción se realizó a través del seno orbital de los animales, anestesiados con éter dietílico, y se utilizó para ello pipetas Pasteur. Los animales se sometieron a ayuno previo de 12 horas. La sangre para hematología se colectó en viales que contenían EDTA (40 μ L por mL de sangre). Para la bioquímica sanguínea se tomaron viales de dos mL, donde se dejó coagular la sangre y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm en una centrífuga Eppendorf durante 10 minutos; los sueros obtenidos (conservados a -20°C) se utilizaron para las determinaciones.

Se determinaron los parámetros hematológicos siguientes: hemoglobina (HB), hematocrito (HTC), eritrocitos (ETO) y constantes corpusculares (volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), conteo de plaquetas (PLT) y conteo total (LEUC) y diferencial de leucocitos (neutrófilos (N), linfocitos (L), eosinófilos (E) y monocitos (M). Todos los parámetros se determinaron en un Contador de Células

MICROS ABX (Roche Diagnostic Systems), exceptuando las células diferenciadas que se observaron al microscopio.

En bioquímica sanguínea se determinaron las proteínas totales (PT), alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamil transpeptidasa, albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (ALP), creatinina (CREA), bilirrubina total (Bil-T), colesterol (CHOL), triglicéridos (TG), ácido úrico (AU), urea nitrogenada (BUN), calcio(Ca), potasio (K), sodio (Na), fósforo (PHOS), glucosa (GLUC) e índice A/G en un Analizador Automático Hitachi-902 (Roche Diagnostic Systems). Se calcularon los valores del índice Albumina/globulina (A/G), mediante la fórmula $A/G = (ALB/PT - ALB)$.

II.6.2.7 Anatomía patológica

Al concluir el periodo de administración se realizó un examen macroscópico y microscópico a tejidos y órganos de los animales tratados con la dosis máxima de vainillina, con el objetivo de evaluar cambios estructurales y patológicos tal y como es recomendado para estudios toxicológicos subcrónicos (Auletta, 2002).

La eutanasia se efectuó mediante anestesia con éter dietílico, seguida de exsanguinación y dislocación cervical. Se realizó la necropsia completa a todos los animales, incluyendo a los que murieron antes de la fecha de culminación de la fase experimental. En la necropsia se examinó la superficie externa del cuerpo, todos los orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Se tomó el peso corporal post mortem e inmediatamente se pesaron los siguientes órganos: hígado, riñones, adrenales, corazón, pulmones, timo, bazo, encéfalo, testículo y ovarios para evitar su desecación. Además se determinó el peso relativo de los órganos (peso de órgano/peso post-mortem x 100).

Los órganos y tejidos siguientes fueron preservados para examen histopatológico en formol neutro al 10 %: corazón, aorta, pulmón, bazo, timo, ganglios mesentérico y cervical, páncreas, esófago, tráquea, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, vejiga urinaria, ciego, colon, recto, glándulas salivales, hígado, testículos, epidídimo,

ovarios, úteros, cervix, vagina, próstata, vesículas seminales, hipófisis, adrenales, tiroides, paratiroides, encéfalo (varias secciones), músculo estriado voluntario, nervio ciático, lengua, esternón con médula ósea (incluyendo tres articulaciones), glándula mamaria, ojos (retina, nervio óptico), riñones, incluyendo las lesiones macroscópicas observadas. Los órganos y tejidos fijados fueron seccionados adecuadamente e incluidos en parafina, cortados entre 4 y 6 micras y extendidos en láminas, luego de lo cual se procedió a la tinción con Hematoxilina-Eosina. Las láminas generadas fueron observadas al microscopio Carl Zeiss Standard 25. Las muestras fueron seccionadas y dispuestas siguiendo las normas establecidas para ratas, referidas en las directrices de la OECD (OECD ,1998).

II.6.2.8 Análisis estadístico.

Todos los datos obtenidos fueron introducidos en los modelos correspondientes y posteriormente en bases de datos, utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5.1. A partir de los mismos se determinaron la media (X) y la desviación estándar (DE) para cada grupo por sexo. La normalidad se determinó por el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el Test de Levene. Cuando se cumplieron estas premisas, se realizó Análisis de Varianza (ANOVA) factorial simple teniendo en cuenta las variables grupo y tiempo, utilizando para definir las diferencias el test de LSD. Cuando no se cumplió la premisa de normalidad y/u homogeneidad de varianzas, se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Se trabajó para un nivel de significación de $p < 0,05$. Para el análisis de las variables de Hematología y Química Sanguínea se utilizaron además los intervalos normales, establecidos a partir de todos los datos obtenidos en la primera extracción. El límite inferior del intervalo está constituido por el valor medio menos 1,5 veces la Desviación Estándar ($X - 1,5 DE$) y el límite superior por el valor medio más 1,5 veces la Desviación Estándar ($X + 1,5 DE$). Para las comparaciones estadísticas del muestreo final del estudio, se elaboró igualmente el rango antes mencionado, pero a partir de los datos obtenidos de los animales del grupo control.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Determinación de los niveles plasmáticos de vainillina a partir de la selección del vehículo adecuado para los ensayos preclínicos

En la figura 2 se observan las curvas correspondientes a los perfiles farmacocinéticos de la vainillina en las soluciones de CMC al 2% y 0,5%. Para la solución al 0,5% los valores de concentración plasmáticas fueron superiores con relación a la solución al 2%, y se alcanzaron valores de concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de 63,7 μ g/mL y 13,45 μ g/mL respectivamente. El tiempo necesario para alcanzar estos valores ($T_{m\acute{a}x}$) fue de 3 y 10 minutos respectivamente.

Paralelamente, en la figura 3 se observan los perfiles de concentración plasmática de vainillina en las soluciones de CMC al 0,5% y solución hidroalcohólica (HA) al 15%. Para esta última, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ fue de 110,7 μ g/mL con un $T_{m\acute{a}x}$ igual a los cinco minutos. Los valores de los parámetros farmacocinéticos que definen el nivel de exposición de la sustancia evaluada, tomando en consideración la magnitud y la velocidad de la absorción de la vainillina, se muestran en la tabla 6.

En esta tabla se observa que con la suspensión de CMC al 0,5% se obtuvo una mayor área bajo la curva (AUC_{total}) con relación a la de CMC al 2%; de igual forma los valores de C_{max} alcanzados para la primera resultaron superiores. En los últimos dos puntos de la curva de CMC al 2% se observó una tendencia al aumento de la concentración al final del tiempo de muestreo, lo cual pudiera estar dado por una absorción de vainillina remanente dadas las características antes comentadas para esta solución. La vainillina para ejercer la acción penetra al interior de los eritrocitos y se une de forma estable mediante enlaces covalentes a la hemoglobina S, ocurriendo una disminución rápida de los niveles plasmáticos, producto de la simultaneidad de los procesos de distribución al interior de los eritrocitos y a su eliminación propiamente dicha del organismo (Abraham *et al.*, 1991). Junto con esta disminución de los niveles plasmáticos se debe corresponder un aumento de los valores de concentración intraeritrocitarios. Al calcular la biodisponibilidad relativa (F_{rel}) de ambas formulaciones tomando como referencia a la solución hidroalcohólica al 15%

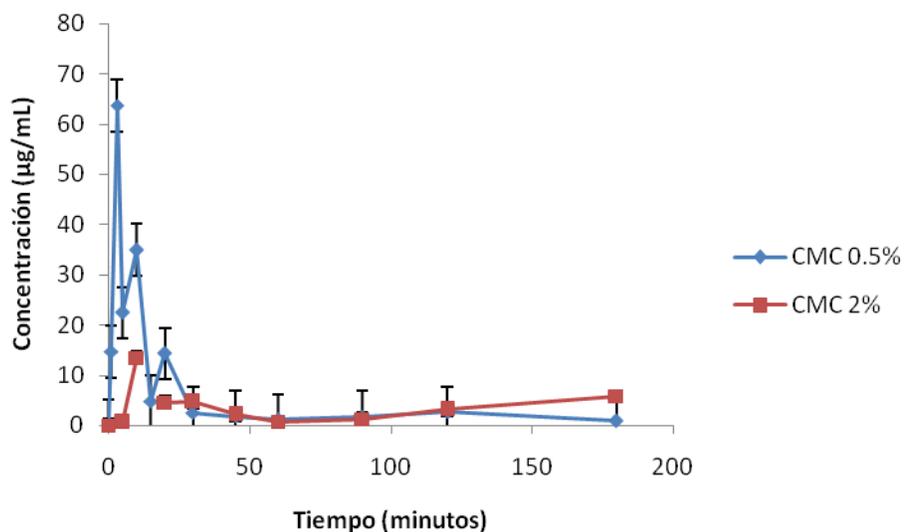


Figura 2. Perfiles de concentración plasmática en función del tiempo para las soluciones de vainillina en CMC al 0.5 % y 2 % a la dosis de 400 mg/Kg en ratas Wistar por vía oral ($p < 0.05$).

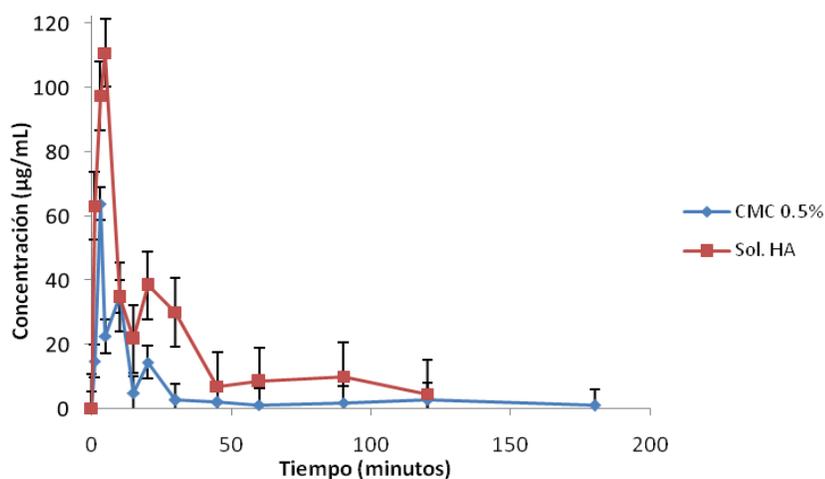


Figura 3. Perfiles de concentración plasmática en función del tiempo para las soluciones de CMC al 0.5% y solución hidroalcohólica al 15% a la dosis de 400 mg/Kg en ratas Wistar, por vía oral ($p < 0.05$).

se obtiene una biodisponibilidad mayor para la de CMC 0.5% (41 %) que para la de CMC al 2 % (32 %).

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de las soluciones hidroalcohólica al 15% y de CMC al 0,5% y 2% a la dosis de 400 mg/Kg en ratas Wistar por vía oral.

Parámetros Farmacocinéticos	Sol. HA 15%	Sol. CMC 0,5%	Sol. CMC 2%
AUC _{total} (µg_min/mL)	1965.25	801.25	623.45
C _{max} (µg/mL)	110.7	63.7	13.45
T _{max} (min)	5	3	10
F _{rel} (%)	-	41	32

AUC: área bajo la curva; C_{max}: concentración máxima; T_{max}: tiempo máximo; Ke: constante de eliminación; t_{1/2}: tiempo de vida media; MRT: tiempo de residencia; T_{lag}: tiempo de latencia; F_{rel}: biodisponibilidad relativa

Los resultados obtenidos pudieran estar dados por las características físico-químicas de la suspensión resultante de la unión de la vainillina con la CMC. A la observación visual la suspensión de CMC al 2% resulta ser una suspensión viscosa lo cual dificulta la disolución de la vainillina provocando que esta ocurra de forma no homogénea. Lo que conlleva que al administrar esta suspensión la dosis pudiera no corresponderse con la calculada de acuerdo al peso de cada animal. Esta característica pudiera contribuir a que el número de moléculas en contacto con la mucosa del epitelio gastrointestinal para ser absorbidas, así como la velocidad a la cual ocurre este proceso se dificulte. Sin embargo en la suspensión de CMC al 0,5%, se favorece la solubilidad de la vainillina, tal vez porque tiene menor viscosidad.

En correspondencia con esto, el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (T_{máx}) es mayor para la suspensión de CMC al 2% que para la de CMC al 0,5% (10 y 3 minutos respectivamente). Todo esto trae como resultado que los niveles de concentración plasmática alcanzados para la suspensión de CMC al 0,5% sean mayores (figura 2). A pesar de que los valores de concentración plasmática alcanzados para la suspensión de CMC al 0,5% fueron mayores que para la del 2%, la biodisponibilidad de la primera continúa siendo baja. Esto último puede estar dado por los factores siguientes: los posibles procesos de biotransformación de esta

sustancia tanto a nivel de la pared gastrointestinal así como a un efecto de primer paso hepático y los procesos de degradación de la vainillina en el tracto gastrointestinal.

Un aspecto importante a considerar en el análisis de los resultados es que estos estudios cinéticos se han realizado en una especie roedora, la cual presenta un metabolismo más intenso que otras especies animales (Gad, 2007). Estudios cinéticos realizados en perros demostraron que en esta especie, la vainillina presenta una biodisponibilidad del 60 % (González *et al.*, 2002).

Estos resultados permiten definir que para los estudios toxicológicos, tanto a dosis única como repetida, el vehículo más adecuado a emplear es la suspensión de CMC al 0,5%. Para los estudios farmacocinéticos el vehículo a emplear es la solución HA al 15 %.

Resulta importante señalar que la elección de un adecuado vehículo en los estudios preclínicos, es fundamental a la hora de un buen diseño experimental. Este puede influir sobre la absorción sistémica, distribución, metabolismo y eliminación de las sustancias de ensayo (Kim *et al.*, 2007). Por consiguiente, un detallado conocimiento de cómo los vehículos alteran estos procesos, es de primordial importancia al interpretar los resultados de los estudios toxicológicos orales (Harris *et al.*, 2008).

III.2 Estudio farmacocinético de la vainillina administrada por vía endovenosa en ratas Sprague – Dawley

Con el propósito de determinar el perfil farmacocinético de la vainillina se realizó un estudio en ratas Sprague – Dawley (SD). Las medias de concentraciones plasmáticas se determinaron en una dosis única de vainillina de 100 mg/Kg de peso corporal.

Los valores de concentración plasmática obtenidos para cada tiempo de muestreo y su desviación estándar se observan en el anexo 7. Como se puede apreciar los valores de concentración descienden en el tiempo, lo que guarda amplia correspondencia con la vía de administración utilizada.

Los niveles de vainillina en plasma desaparecen muy rápidamente de tal manera que ya a los 15 minutos es imposible detectarlos como se observa en la figura 4. Se distinguen dos fases en este proceso, la fase de distribución, que se extiende los primeros cinco minutos después de la administración de la dosis y una segunda fase, asociada a la eliminación plasmática.

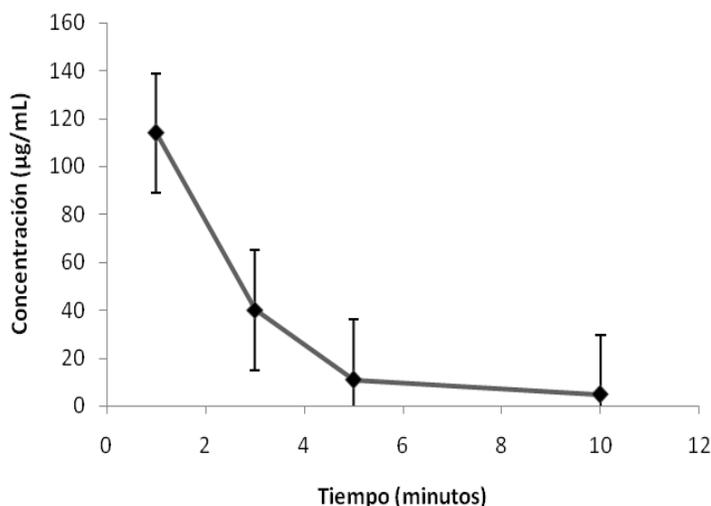


Figura 4. Perfil de concentración vs tiempo de la vainillina administrada por vía intravenosa a ratas Sprague – Dawley a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Cada valor es la media de tres determinaciones.

A partir de las concentraciones plasmáticas, se determinaron los parámetros farmacocinéticos con el objetivo de caracterizar cinéticamente la vainillina (tabla 7).

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos calculados tras la administración endovenosa de una dosis de 100 mg/kg de vainillina a ratas SD

Parámetros farmacocinéticos	Vía endovenosa
$t_{1/2}$ (min)	2,0
v_d (mL)	458,83
Cl (mL/min)	159,18
MRT (min)	2,83
C_{max} (µg/mL)	113,89
AUC (µg-min/mL)	314,09

$t_{1/2}$: tiempo de vida media; MRT: tiempo de residencia media;
 CL: aclaramiento plasmático; V_d : volumen de distribución;
 C_{max} : concentración máxima; AUC: área bajo la curva

Como se observa, de los datos experimentales obtenidos tras la administración endovenosa, el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y el tiempo de residencia media (MRT) fueron de 2 y 2,83 minutos, respectivamente. La combinación de ambos parámetros indica el tiempo en el que se ha eliminado el 50 y 63,2% de vainillina respectivamente, de la circulación sistémica, el cual puede considerarse relativamente pequeño, si se compara con los resultados obtenidos en ratas con otras moléculas de diferente naturaleza química por ejemplo la warfarina (Zhu y Shin, 2005). Sin embargo, los resultados de esta investigación se encuentran dentro del rango informado en otros estudios con esta misma molécula y de otros aldehídos (Zhang *et al.*, 2004 y Andersen, 2006).

El valor de aclaramiento plasmático (CL) de 159,18 mL/min, está en correspondencia con los valores de $t_{1/2}$ y MRT, por lo que la vainillina se elimina rápidamente, esto sugiere que hay una eliminación plasmática rápida, debido a que la vainillina se distribuye en el compartimento vascular, al interior de los eritrocitos lo cual se confirma con un volumen de distribución (Vd) de 458,83 mL superior al volumen sanguíneo característico de la especie animal empleada.

III.3 Estudio de linealidad cinética de la vainillina por vía endovenosa en perros Beagles

Para establecer una comparación entre los parámetros farmacocinéticos de dos especies diferentes, se determinó el perfil de concentración de vainillina contra tiempo en una especie no roedora, en este caso perros Beagles. Del mismo modo se evaluaron varias dosis para determinar el efecto de estas sobre la linealidad cinética.

En la tabla 8 se representan los datos de las concentraciones plasmáticas promedio obtenidos con posterioridad a la administración en forma de bolo endovenoso para las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg. Los valores de concentración descendieron con un transcurso lógico en el tiempo, lo que guarda amplia correspondencia con la vía de administración utilizada. Con el aumento de la dosis, se obtuvieron valores de concentraciones superiores al límite de cuantificación a intervalos de tiempos más

prolongados, en la secuencia general de muestreo, es decir, para la dosis de 15 mg/Kg solo se obtuvieron valores hasta los 15 minutos, para la dosis de 30 mg/Kg hasta los 30 minutos, para la dosis de 60 mg/Kg hasta los 60 minutos y para la dosis de 120 mg/Kg hasta los 75 minutos. En el anexo 8, se muestran las tablas con los datos de concentración plasmática individual de cada animal para cada nivel de dosis.

Tabla 8. Concentraciones plasmáticas promedio ($\mu\text{g/mL}$) de vainillina para cada dosis a los diferentes intervalos de tiempo.

Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (minutos)									
	1	3	5	10	15	20	30	45	60	75
15	38.14 \pm 13.03	21.92 \pm 8.34	6.18 \pm 3.80	1.92 \pm 1.24	0.74 \pm 0.58					
30	88.93 \pm 33.41	39.22 \pm 21.81	19.40 \pm 13.34	8.51 \pm 2.76	2.74 \pm 1.55	0.85 \pm 0.53	0.78 \pm 0.54			
60	114.7 \pm 69.45	24.43 \pm 13.31	41.55 \pm 18.57	19.23 \pm 6.61	10.08 \pm 2.42	6.53 \pm 3.20	1.66 \pm 0.87	0.67 \pm 0.48	0.39 \pm 0.29	
120	252.03 \pm 40.80	172.74 \pm 44.59	135.26 \pm 34.24	76.06 \pm 16.92	44.81 \pm 12.88	26.75 \pm 9.9	17.16 \pm 9.33	4.52 \pm 1.5	1.40 \pm 0.47	1.14 \pm 0.59

Considerando que la vainillina penetra al eritrocito y se une a la Hb para ejercer su efecto antipolimerizante, este comportamiento estaría dado al hecho de que a medida que las dosis aumentan, la velocidad y magnitud de captación por el eritrocito cada vez se hace menor por lo que se puede cuantificar vainillina a mayores tiempos. A las dosis de 15 y 30 mg/Kg es más rápida la entrada al eritrocito, ya que existen sitios de unión de la vainillina a la Hb libres, los que disminuyen con el aumento de la dosis. Las medias de concentración plasmática a diferentes dosis administradas por vía intravenosa, determinadas en diferentes intervalos de tiempo, se representan en la figura 5.

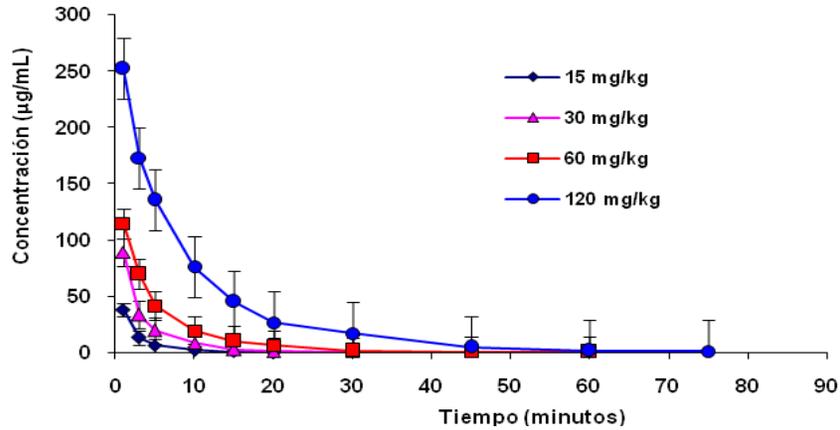


Figura 5. Perfiles concentración contra tiempo de diferentes dosis de vainillina administradas por vía endovenosa a perros Beagles. Cada valor es la media de seis valores.

Como se observa en la figura 5, las concentraciones plasmáticas disminuyen exponencialmente en el transcurso del tiempo. Se evidencia una disminución marcada en los primeros diez minutos, coincidiendo esta con la denominada fase de distribución de xenobióticos. En la segunda fase, más prolongada, se observó una disminución menos pronunciada de la concentración en el tiempo. Esto es típico de una eliminación, tal y como se ha reportado en otros estudios farmacocinéticos (Smith *et al.*, 2001).

Por otra parte, se observó que la disminución de las concentraciones era más pronunciada en las dosis más bajas (15 y 30 mg/Kg), detectándose más tempranamente la fase de eliminación. Este fenómeno pudiera deberse a la posible unión de la vainillina a todos los sitios disponibles en las moléculas de (Hb), precisamente por su baja concentración plasmática. Al aumentar la dosis a 60 y 120 mg/kg, el número de sitios de unión ocupados en la molécula de Hb aumenta, retrasando la fase distributiva lo que posibilita que se detecten concentraciones plasmáticas de vainillina durante un periodo de tiempo mayor.

Resultados similares fueron obtenidos por Guenette *et al.*, 2006 con el eugenol, un compuesto aromático, el cual sigue un comportamiento cinético semejante, cuando es

administrado por vía oral en ratas. Las concentraciones plasmáticas de este compuesto decaen rápidamente luego de la primera hora de administración.

También se ha observado que el tiempo de vida media del benzaldehído, una sustancia muy empleada en la fabricación de productos cosméticos, es de sólo 10 minutos cuando es administrado a ratas por vía inhalatoria, similar a lo obtenido con la vainillina en este estudio (Andersen, 2006). Este comportamiento también está acorde a la vía de administración empleada, la cual se caracteriza por una disminución de las concentraciones plasmáticas en el tiempo al inocularse el compuesto en estudio directamente en el torrente sanguíneo (Smith *et al.*, 2001). A partir de los valores de concentración plasmática, fueron determinados además, los parámetros farmacocinéticos, con el objetivo de caracterizar cinéticamente la molécula en estudio, (tabla 9).

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos tras la administración de vainillina por vía intravenosa a dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg de peso corporal, a perros Beagles.

Parámetros Farmacocinéticos	Dosis (mg/kg)			
	15	30	60	120
C _{máx} (µg/mL)	38,14 ± 21,91	88,99 ± 39,21	114,7 ± 24,43	252,02 ± 40,80
AUC (µg-min/mL)	127,05 ± 1,82	341,4 ± 152,8	699,38 ± 152,93	2318,36 ± 94,86
Ke (min ⁻¹)	0,3347 ± 0,11	0,22 ± 0,07	0,1220 ± 0,0688	0,0786 ± 0,00
t _½ (min)	2,24 ± 0,61	3,3 ± 1,0	7,47 ± 4,30	8,88 ± 0,80
V _D (mL)	476 ± 233	463,2 ± 192,9	931,3 ± 518,7	683,2 ± 148
CL (mL/min)	150,5 ± 73	101,3 ± 38,1	89,7 ± 21,9	53,1 ± 9,3
MRT (min)	3,17 ± 1,05	4,13 ± 0,76	7,76 ± 1,87	11,56 ± 1,88

Cada valor es la media de seis determinaciones ± la desviación estándar. C_{máx}: concentración máxima; AUC: área bajo la curva; Ke: constante de eliminación; t_½: tiempo de vida media; V_D: volumen de distribución; CL: aclaramiento; MRT: tiempo de residencia media.

En el estudio, los valores de C_{máx} alcanzados aumentaron proporcionalmente al aumento de la dosis con valores de 38,14 ± 21,91; 88,99 ± 39,21; 114,7 ± 24,43 y 252,03 ± 40,80 µg/mL respectivamente. En la figura 6 se observa una relación lineal entre estas dos variables. El análisis de regresión lineal demostró que existe una alta correlación y una relación estadísticamente significativa (p < 0.05), cuyo coeficiente de determinación (R²) es 0.9769.

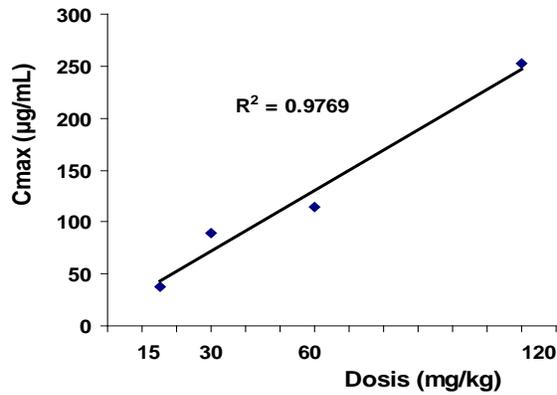


Figura 6. Determinación entre la C_{max} y las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg administrada en bolo ev a perros Beagles.

Al normalizar la C_{max} para sus respectivas dosis se obtuvieron valores de 2,54, 2,96, 2,23 y 2,09 para las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg respectivamente. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis empleado para el análisis de los datos demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos resultados ($p= 0.4180$), demostrando una linealidad de este parámetro dependiente de la dosis.

El AUC_{0-∞} presentó un comportamiento similar a la C_{max}. Al analizar la relación existente entre este parámetro y las diferentes dosis, observamos de manera similar, una relación lineal entre estas dos variables. El análisis de regresión lineal demostró que existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuyo coeficiente de determinación R² es 0,9696. La figura 7 muestra esta relación.

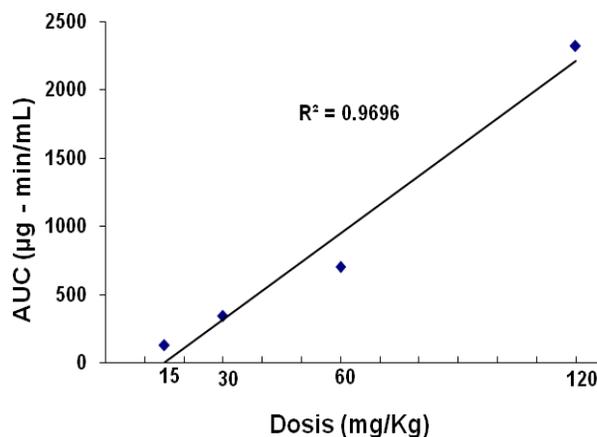


Figura 7. Determinación entre el área bajo la curva y las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg administrada en bolo ev a perros Beagles.

Sin embargo, al normalizar el $AUC_{0-\infty}$ con sus respectivas dosis se obtuvieron valores de 8,5; 11,4; 11,7 y 19,3 para las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg respectivamente. El análisis de varianza (ANOVA) realizados a los valores del $AUC_{0-\infty}$ normalizados para sus respectivas dosis, demuestra que existen diferencias significativas entre los valores promedios ($p = 0.0012$). El Test de Rangos Múltiples indica que el valor de $AUC_{0-\infty}$ normalizada para la dosis de 120 mg/Kg, es el que difiere con las restantes tres dosis.

Por su parte, al realizar el cálculo del cociente de los valores del $AUC_{0-\infty}$ de las dosis de 30 y 60 mg/Kg en relación a la de 15 mg/Kg se cumple aproximadamente la relación esperada de 2 y 4. Sin embargo, para la dosis de 120 mg/Kg el valor observado es 18, muy superior al esperado de 8. Estos resultados demuestran que para la dosis de 120 mg/Kg, no existe un aumento proporcional en los valores de este parámetro con el incremento de la dosis (figura 8).

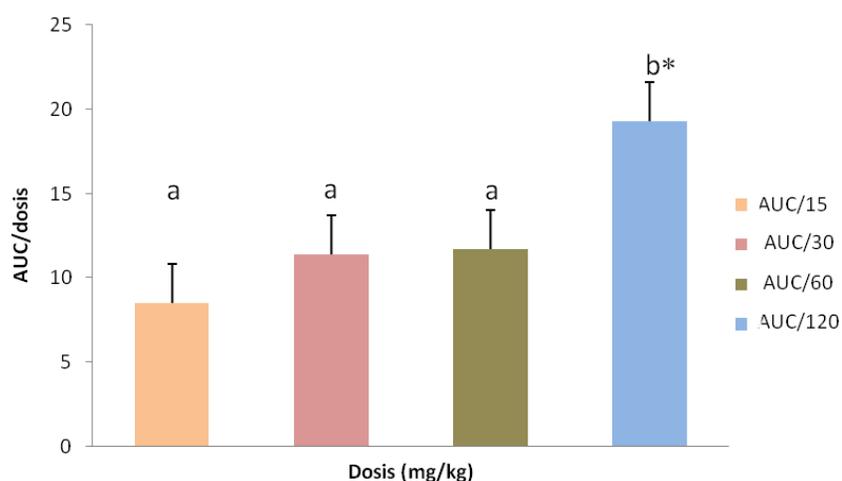


Figura 8. Valores de AUC normalizados contra sus respectivas dosis. Cada valor es la media de seis determinaciones \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ diferencias significativas. (ANOVA).

Este valor de dosis representa un punto de inflexión de la cinética, lo que indica que el sistema comienza a tener un comportamiento no lineal lo que pudiera incidir en una respuesta toxicológica (Dixit y *et al.*, 2003). Otro aspecto interesante, que pudiera

estar relacionado con el aumento desigual del AUC, es que durante la fase experimental se observó que una vez administrada la dosis de 120 mg/Kg, todas las muestras de plasma estaban hemolizadas. La hemólisis trae como consecuencia que una mayor cantidad de moléculas de vainillina permanezcan en el plasma, al disminuir la masa de eritrocitos circulantes, hacia los cuales se distribuirían estas moléculas. Esto pudiera ser otra causa que condiciona que, las concentraciones plasmáticas son superiores, lo que establece evidentemente, un aumento en el AUC observado para la dosis de 120 mg/Kg. Este incremento del AUC producto de la hemólisis trae como resultado un mayor número de moléculas de vainillina disponibles para ejercer un efecto tóxico deviniendo en un posible índice de manifestación de toxicidad.

La hemólisis aquí detectada contrasta con resultados de dos estudios realizados *in vitro*. En estos se concluyó que la vainillina y sus isómeros químicos (ortovainillina e isovainillina), no tienen efectos hemolíticos sobre eritrocitos humanos (Del Toro *et al.*, 2002 y Alonso, 2005). Estas divergencias reafirman que los ensayos *in vitro* son un primer acercamiento al fenómeno en cuestión, pero la valoración final debe ensayarse en modelos *in vivo*, pues los equilibrios de difusión e incorporación son más potentes en los modelos animales (Dere *et al.*, 2006; Evertsen y Johnsen; 2009).

El fenómeno de hemólisis también puede incidir en el equilibrio distributivo de la molécula de vainillina. Al desaparecer los eritrocitos, se pierden centros de captación de esta sustancia en el organismo, contrario a lo que ocurre a las dosis inferiores, en las cuales se incrementa el volumen por fenómenos de enlazamiento a las células sanguíneas.

La figura 9 muestra como los valores de tiempo de vida media ($t_{1/2}$) aumentan gradualmente con el incremento de la dosis. Estos valores son muy pequeños, siendo solo de 2,24 minutos para la dosis de 15 mg/kg y aumentando gradualmente con el incremento de la dosis a 3,30, 7,48 y 8,88 min respectivamente. El análisis realizado demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.0007$) entre estos valores. Como se evidencia, el aclaramiento (CL) en correspondencia con el

comportamiento del tiempo de vida media, resulta ser elevado para las dosis de 15 mg/kg alcanzando un valor de $150,45 \pm 72,95$ mL/min y disminuyendo progresivamente a $101,27 \pm 38,06$, $89,27 \pm 21,87$, $53,07 \pm 9,26$ para las dosis de 30, 60, 120 mg/Kg, respectivamente. El análisis estadístico demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados ($p= 0,0074$).

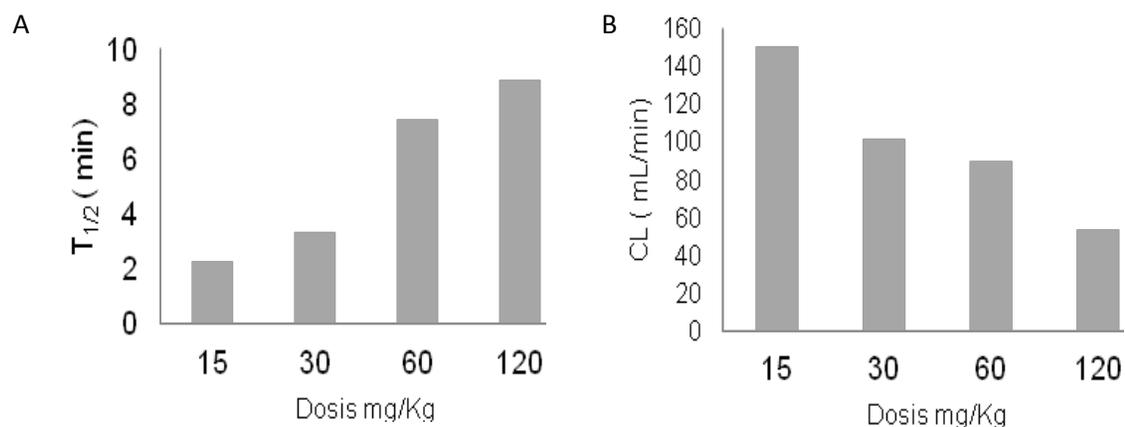


Figura 9. Comportamiento del tiempo de vida media (A) y del aclaramiento (B), para las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/kg administrada en forma de bolo ev. en perros Beagles.

La linealidad cinética presupone que parámetros característicos de la disposición cinética de un fármaco como el $t_{1/2}$ y el CL permanezcan constantes en un rango de dosis determinado. Llama la atención, entonces, el hecho de que estos dos parámetros varían con el aumento de la dosis, lo cual hace pensar en un comportamiento no lineal de los mismos.

Dada las características farmacodinámicas de este producto y bajo las condiciones experimentales, los datos obtenidos sugieren que el perfil farmacocinético observado pertenece a la fase distributiva. Por lo tanto, el comportamiento para estos dos parámetros resulta lógico. De esta forma, en vez del aclaramiento sistémico de este fármaco del organismo, observamos su aclaramiento plasmático, producto del proceso de distribución o internalización del mismo hacia su órgano diana (eritrocitos), y en correspondencia el tiempo de vida media con que ocurre este proceso.

Por lo tanto, a la menor dosis le corresponde el mayor valor de aclaramiento ya que como se plantea anteriormente, a esta dosis los eritrocitos son capaces de captar rápidamente las moléculas de vainillina presente en el plasma. Esta captación va disminuyendo con el aumento de la dosis lo cual se refleja en una disminución del aclaramiento.

Como se puede constatar, el $t_{1/2}$ de la vainillina para todas las dosis evaluadas es corto, teniendo en cuenta que las concentraciones plasmáticas disminuyen a la mitad antes de transcurrido los primeros 5 minutos. Estos resultados se corresponden con lo obtenido por Zhang *et al.*, 2004, que observaron valores de $t_{1/2}$ de 10,2 minutos para una dosis de 100 mg/Kg, comparable con una de las dosis ensayadas en este experimento (120 mg/Kg). Además, es conocido que los aldehídos por su naturaleza química reactiva son raramente acumulados en los organismos biológicos (Kutzman *et al.*, 1980; Barghini *et al.*, 2007). El MRT obtenido también fue corto, lo que confirma el $t_{1/2}$, pues es una medida del tiempo en que la molécula permanece en circulación en el organismo.

Los valores de aclaramiento también son una medida de la rápida eliminación plasmática que sufre esta molécula. Esto puede ser debido a la distribución de la vainillina hacia órganos muy irrigados o el compartimiento vascular. Lo anterior está relacionado con los volúmenes de distribución resultantes, los cuales indican que el producto en cuestión no se internaliza hacia tejidos periféricos permaneciendo en el sistema vascular. Ello está en consonancia con el mecanismo de acción de la vainillina debido a su alta afinidad por la Hb, proteína mayoritaria en el sistema vascular, lo cual posibilita su utilización como agente antidrepanocítico (Abraham *et al.*, 1991; Del Toro *et al.*, 2003).

El volumen de distribución (V_d) con valores promedio de $476,38 \pm 232,99$; $463,24 \pm 192,89$; $931,30 \pm 518,65$ y $683,23 \pm 148$ mL para las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg, muestran valores muy semejantes al volumen sanguíneo de la especie animal empleada (88 mL/Kg), se observa en la figura 10. A las dosis de 15 y 30 mg/Kg la vainillina no ocupa todos los sitios disponibles de la molécula de Hb, quedando Hb sin

unirse por lo que los V_d son similares. A la dosis de 60 mg/Kg hay mayor cantidad de moléculas de vainillina que se internalizan y el número de sitios ocupados aumenta, por lo que es lógico que el V_d aumente. A la dosis de 120 mg/Kg se observó hemólisis (no hubo problemas en la administración), la masa eritrocítica es menor, la vainillina que iba a penetrar no lo hace, por lo que el V_d en vez de aumentar disminuye. Este comportamiento es un indicador de que la vainillina se mantiene en el depósito vascular, sugiriendo una limitada distribución extravascular.

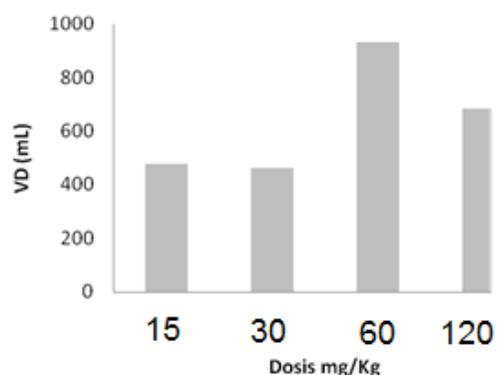


Figura 10. Comportamiento del volumen de distribución para las dosis de 15, 30, 60 y 120 mg/Kg administrada en forma de bolo i.v. en perros Beagles.

Este comportamiento es lógico si tenemos en cuenta, el mecanismo de acción de este compuesto donde juega un papel fundamental los eritrocitos para cumplir su acción como agente antidrepanocítico. Otros autores confirman que la no linealidad cinética puede deberse a la unión saturable de las moléculas en estudios a los eritrocitos, que puede afectar la farmacocinética. Se plantea que los glóbulos rojos representan la población más grande de los constituyentes de la sangre, tanto en número como en tamaño, siendo un reservorio para muchos compuestos que pueden distribuirse y unirse a sus componentes intracelulares. Se ha informado además que la distribución hacia éstos (si se refiere a componentes), varía de molécula a molécula y puede depender de factores tales como la temperatura y el pH. Se asevera que la interacción con los hematíes puede resultar en la formación de bases Schiff, las cuales son estructuras orgánicas muy estables (Hinderling, 1997; Van den Bongard *et al.*, 2003 y Shank *et al.*, 2005).

En general los resultados de los estudios farmacocinéticos en plasma realizados en varios modelos animales y a varias dosis, sugieren que la vainillina sufre un rápido metabolismo en mamíferos. El tiempo de vida media, demuestra la rápida eliminación que manifiesta esta molécula del plasma; así como el volumen de distribución indica que la molécula se concentra en el compartimento vascular.

III.4 Estudios farmacocinéticos de la vainillina marcada con ^{125}I por vía oral y endovenosa

III.4.1 Resultados del marcaje y modelación aplicada

El rendimiento del marcaje fue del 65,8% en el realizado para la administración intravenosa y del 61,5% en el realizado para la administración oral. En los dos casos la pureza radioquímica fue superior al 95%.

Se evaluaron dos modelos el mono y el bicompartimental. En el caso de la administración intravenosa se aplicó una parametrización del modelo monocompartimental y dos parametrizaciones del modelo bicompartimental. En la administración oral se hicieron cuatro parametrizaciones en el modelo monocompartimental y dos parametrización en el bicompartimental. Los modelos aplicados a los datos derivados de la administración oral están dados por la dispersión de los datos. Los modelos aplicados se encuentran resumidos en la tabla 10 y 11.

Tabla 10. Modelos aplicados a los perfiles farmacocinéticos obtenidos después de la administración intravenosa.

Modelo	Compartimentos	Eliminación	Parametrización
1	1	1 ^{er} orden	V, k
19	2	1 ^{er} orden	V, k, k_{12} , k_{21}
20	2	1 ^{er} orden	Cl, V_1 , Q, V_2

V y V_1 : volumen de distribución del compartimento central (mL), k: constante de eliminación, k_{12} y k_{21} : constantes intercompartimentales, Cl: aclaramiento (mL/h), V_2 : volumen de distribución del segundo compartimento (mL).

Tabla 11. Modelos aplicados a los perfiles farmacocinéticos obtenidos después de la administración oral.

Modelo	Compartimentos	Absorción	Eliminación	Parametrización
7	1	1 ^{er} orden	1 ^{er} orden	k_a, V, k
8	1	1 ^{er} orden	1 ^{er} orden	k_a, V, Cl
13	1	orden 0	1 ^{er} orden	T_{k0}, V, k
14	1	orden 0	1 ^{er} orden	T_{k0}, V, Cl
29	2	1 ^{er} orden	1 ^{er} orden	$k_a, V, k, k_{12}, k_{21}$
30	2	1 ^{er} orden	1 ^{er} orden	k_a, Cl, V_1, Q, V_2

V y V_1 : volumen de distribución del compartimento central (mL), k : constante de eliminación, k_{12} y k_{21} : constantes intercompartimentales, k_a : constante de absorción, Cl : aclaramiento (mL/h), V_2 : volumen de distribución del segundo compartimento (mL), T_{k0} : duración de la absorción (h), Q : aclaramiento intercompartimental.

La diversidad de modelos aplicados no está dirigida solamente a la selección del número de compartimentos, sino que permite también la obtención de diferentes parámetros por la parametrización directa que aporta cada modelo, cuestión que es posible gracias al sistema de cálculo utilizado.

III.4.2 Incorporación en eritrocitos después de la administración endovenosa.

En la figura 11, se observan los perfiles de concentración en sangre, plasma y eritrocitos hasta las 24 horas de administrado. Después de la administración endovenosa, las concentraciones de vainillina en el plasma disminuyeron rápidamente durante los primeros 15 minutos siguientes a la administración, no se llegan a observar valores altos de captación en eritrocitos. Como tendencia se aprecia que los perfiles de concentración en sangre de vainillina plasmática y eritrocitaria son muy similares y alcanzan una magnitud equivalente después de las dos horas de administrada.

La fase que estamos observando es la fase de eliminación. La cinética de eliminación es mucho más rápida que la cinética de captación en el eritrocito.

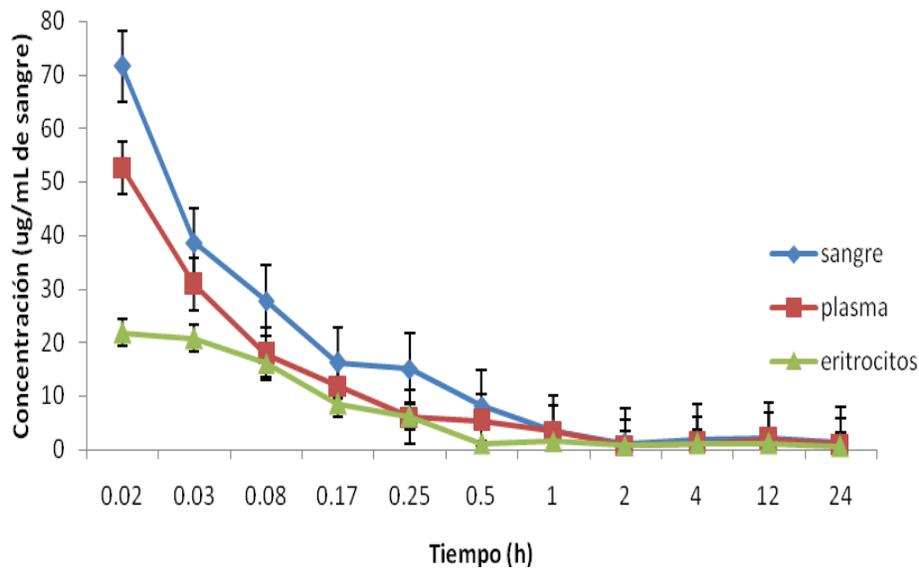


Figura11. Concentraciones de vainillina en sangre, plasma y eritrocitos por mL de sangre. Se obvian las dispersiones para una mejor apreciación gráfica.

La distribución de fármacos en eritrocitos varía: con algunos fármacos. En muchos fármacos la velocidad de distribución al eritrocito es rápida y se alcanza el equilibrio de segundos a minutos, estos casos son observados a través de procedimientos *in vitro* (en los que se puede determinar la velocidad de distribución) para obtener resultados significativos (Hinderling, 1997).

En los métodos *in vitro* se utiliza un sistema cerrado, donde a medida que aumenta en el eritrocito disminuye en el plasma, por lo que las condiciones del estado estacionario de equilibrio pueden ser establecidos fácilmente. En los estudios *in vivo* los fármacos que penetran rápidamente al eritrocito alcanzan el estado estacionario en las condiciones de equilibrio, aunque al ser un sistema abierto, se presentan otros acontecimientos cinéticos tales como la fase de eliminación, las que ocurren simultáneamente (Hinderling, 1984). Esto es lo que ocurre en el estudio por lo que solo se observa la fase de eliminación.

III.4.3 Resultados de la modelación farmacocinética después de la administración endovenosa

Dado que el análisis farmacocinético se realizó con el programa Monolix, con aplicar una parametrización se tiene el criterio suficiente para saber si aplicar uno u otro

modelo. Cada modelación da una parametrización diferente, en el estudio en aras de reportar la mayor cantidad de parámetros para una mejor caracterización del perfil farmacocinético se empleó más de un modelo en ocasiones, siempre del compartimento bicompartimental, el que mejor ajuste da tomando, los criterios de información AIC y BIC.

La parametrización resultante de los modelos 19 y 20 con similares criterios de información aportaron un volumen de distribución del compartimento central entre 10,4 mL (modelo 20) y 17,6 mL (modelo 19) que concuerda con el volumen de sangre de una rata de 236 g de masa corporal promedio 7,4% de la masa corporal (Brown, 1997). En cambio, el volumen del compartimento periférico de 62,5 mL indica una predominante extravasación hacia el compartimento periférico con una constante k_{12} cinco veces superior a la constante k_{21} , de la misma forma el aclaramiento intercompartimental es 2,7 veces el aclaramiento del compartimento central (tabla 12).

Tabla 12. Estimados poblacionales de los parámetros farmacocinéticos y criterios de información aportados por los modelos del Monolix en la administración endovenosa.

Parámetro	Estimado	DE	CV
V (mL)	17,6	3,3	22
CL(mL/min)	81,2	23	29
K(min ⁻¹)	6,18	1,6	25
K ₁₂	17,3	5,5	31
K ₂₁	7,22	1,7	23
Q(mL/min)	221	59	27
V ₂ (mL)	62,5	24	38
AIC	507,05		
BIC	514.01		

V y V₂: volumen de distribución y del segundo compartimento, CL: aclaramiento, K: constante de eliminación, K₁₂ y K₂₁: constantes intercompartimentales, Q: aclaramiento intercompartimental, AIC y BIC: criterios de información Akaike y Bayesiano, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Se puede comentar que la aplicación de varios modelos con este sistema no está dirigida solo a la búsqueda del mejor ajuste, sino también a la obtención de los parámetros farmacocinéticos necesarios. Otros modelos contenidos en este sistema también pudieran resultar en un buen ajuste y parametrización. Se escogieron estos

porque aportan datos acerca de la contribución de un segundo compartimento de interés (eritrocitos) en el caso de la acción farmacológica de la vainillina.

III.4.4 Resultados de la biodistribución después de la administración endovenosa

Los tejidos seleccionados representan órganos importantes en el proceso de absorción (estómago e intestino delgado) y órganos asociados con la eliminación (riñón, hígado e intestino grueso). Otros órganos (corazón, pulmón, bazo y cerebro) fueron seleccionados debido a su alta irrigación sanguínea, lo que puede provocar que gran cantidad del fármaco llegue a los mismos. El tejido adiposo se analizó tomando en consideración las características poco polares del producto bajo investigación, que puede tener una marcada acumulación en este tejido.

Como se puede apreciar en la tabla 13, no existe captación de vainillina apreciable en ninguno de los órganos o tejidos muestreados. Únicamente se aprecia captación en intestino delgado debido presumiblemente al metabolismo hepático de la molécula. La poca captación en tiroides y estómago demuestra la elevada estabilidad radioquímica de la molécula puesto que son los sitios de más probable acumulación del yodo libre. La excreción es predominantemente renal, como se aprecia en el acumulado en orina.

Tabla 13. Resultados de biodistribución a diferentes tiempos después de la administración endovenosa.

Muestra		1h		4h		12h		24h	
		Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E
Hígado	%D/g	0,15	0,02	0,07	0,02	0,04	0,01	0,04	0,02
Bazo	%D/g	0,06	0,01	0,03	0,01	0,04	0,01	0,04	0,02
Riñones	%D/g	0,64	0,23	0,19	0,13	0,07	0,01	0,07	0,03
Corazón	%D/g	0,07	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03	0,02
Pulmones	%D/g	0,09	0,03	0,06	0,04	0,03	0,01	0,05	0,03
Cerebro	%D/g	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Músculo	%D/g	0,03	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,02	0,01
Tejido adiposo	%D/g	0,11	0,03	0,05	0,01	0,04	0,02	0,05	0,03
Estómago	%D/g	1,02	1,01	0,56	0,20	0,61	0,46	0,49	0,31
Intestinodegado	%D/g	10,73	4,85	4,88	2,84	1,05	0,68	0,97	0,54
Intestino grueso	%D/g	0,26	0,08	1,81	2,57	0,91	1,02	0,62	0,58
Tiroides	%D/g	0,04	0,02	0,08	0,05	0,08	0,11	0,50	0,17
Orina	%D/g			19,57	12,30	13,57	7,02	8,15	8,10
Orina acumulativa	%D/g			19,57		33,13		41,29	
Heces fecales	%D/g					0,03	0,05	0,24	0,31

III.4.5 Incorporación en eritrocitos después de la administración oral

En la figura 12 se observan las concentraciones de vainillina en sangre, plasma y eritrocitos hasta las 24 horas en las cuales se pueden apreciar las diferencias fundamentales. El primer máximo ocurre a solo 5 minutos de la administración y puede estar ocasionado por una rápida absorción, consistente con el resultado de la biodistribución en el que se aprecia una radiactividad en estómago de solo 13,8 % al cabo de una hora. Los máximos de concentración posteriores pudieran deberse a un proceso de circulación enterohepática de la vainillina o algún producto de su metabolismo. En un estudio cinético realizado a la vainillina se sugirió que el segundo pico observado en los perfiles de concentración plasmática puede ser explicado por una posible recirculación enterohepática (Beaudry *et al.*, 2010). Además, fue demostrado previamente que el resveratrol y otros compuesto fenólicos tienen una recirculación enterohepática importante, debido a que experimentan conjugación con glucurónidos y sulfatos (Marier *et al.*, 2002), al igual que la vainillina (Strand y Scheline, 1975). Se puede inferir que de acuerdo al perfil farmacocinético de la

vainillina, descrito en los modelos empleados, de las posibles rutas metabólicas, en las que si bien la mayoría de la vainillina se excreta como ácido vainillínico, también se ha detectado la presencia de glucurónidos y sulfatos de vainillina en la orina de ratas tratadas con dosis de 100 mg/Kg (Kirwin y Galvin, 1993 y Yu, 2005). Otros compuestos fenólicos como el eugenol presentan en estudios cinéticos perfiles de concentración plasmática muy similares a los observados en nuestro estudio, con máximos de concentración secundario (Guenette, 2007).

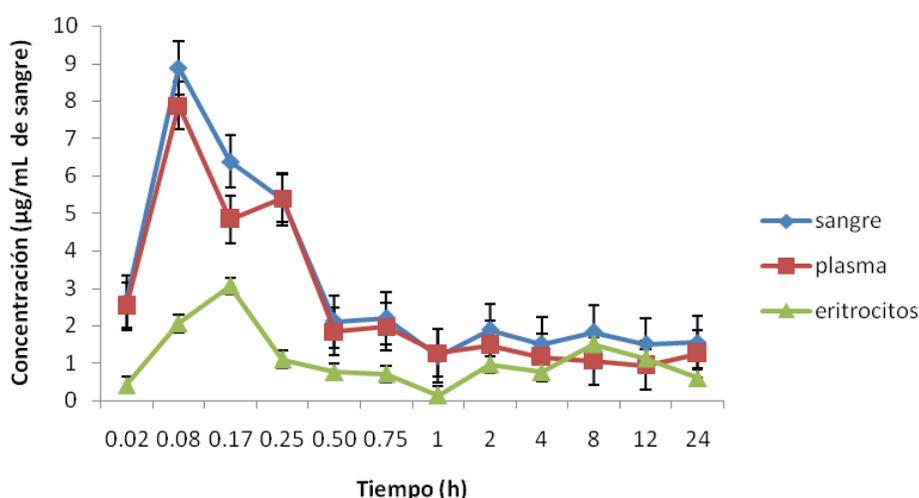


Figura12. Concentraciones de vainillina en sangre, plasma y eritrocitos por mL de sangre después de la administración oral. Se obvian las dispersiones para una mejor apreciación gráfica.

Los dobles picos observados en la farmacocinética son indicios de una posible recirculación entero hepática. La recirculación enterohepática es dependiente de varios factores asociados a la absorción del tracto gastrointestinal, a la respuesta hepática, al metabolismo y a la excreción biliar. Cada uno de estos procesos es dependiente de la especie, edad, enfermedad, fármaco, genética, fisiología y coadministración de compuestos. Un efecto sobre estos procesos puede interrumpir o realzar el ciclo enterohepático. Por otra parte, es también posible que los picos secundarios en la concentración del plasma de un ciclo enterohepático pueden conducir o podría dar lugar a toxicidad. Muchos de los determinantes que afectan estos procesos todavía se están definiendo (Roberts et al., 2002).

Los fármacos que experimentan circulación enterohepática se asocian a características farmacocinéticas típicas, tales como el fenómeno de múltiples picos en el perfil de concentración contra tiempo del plasma y la prolongación del tiempo de vida media de eliminación (Lehr *et al.*, 2009). En este estudio se encontraron estos hallazgos, pero estos deben ser posteriormente evaluados en un estudio farmacocinético de la bilis, más específico.

En comparación con la vía endovenosa se pueden apreciar valores de concentración inferiores tanto en sangre como en plasma y eritrocitos. También debemos tener en cuenta que la dosis oral fue el doble de la dosis intravenosa. No obstante, se puede afirmar que, proporcionalmente, se obtienen menores concentraciones en eritrocitos por vía oral (máximo de 42% a las dos horas y promedio de 19%) que por vía EV (máximo de 64% a las dos horas y promedio de 47%).

III.4.6 Resultados de la modelación farmacocinética después de la administración oral

Al igual que para la administración endovenosa en aras de reportar la mayor cantidad de parámetros para poder caracterizar el perfil farmacocinético se empleó más de un modelo resultando, siempre el modelo bicompartimental, el que mejor ajuste da, tomando en consideración, los criterios de información AIC y BIC. De los seis modelos evaluados estos criterios son menores en los modelos bicompartimentales, indicativo de un mejor ajuste a los datos experimentales y por consiguiente se tomaron los valores de los modelos 29 y 30.

Como se observa en la tabla 14, la calidad de los datos obtenidos después de la administración oral se destaca por su dispersión, de aquí que el procesamiento haya sido más complejo. De todas formas se conserva la tendencia al mejor ajuste con los modelos bicompartimentales y aunque las magnitudes varían sucede lo mismo que en la vía endovenosa, un volumen del compartimento periférico de 1620 mL mayor que el volumen del compartimento central, una constante k_{12} de 9.01 superior a la k_{21} que fue de 0.697 y un aclaramiento intercompartimental de 1150 mL/min mayor que el

del compartimento central. El comportamiento por la vía oral es similar al de la vía endovenosa se mantiene el mismo comportamiento cinético una vez que la molécula es absorbida.

Tabla 14. Estimados poblacionales de los parámetros farmacocinéticos y criterios de información aportados por los modelos del Monolix en la administración oral.

Parámetro	Estimado	DE	CV (%)
Ka	9.46	2.4	26
V _(mL)	128	29	23
CL _(mL/min)	43	22	52
K _(min-1)	0.342	0.15	45
K ₁₂	9.01	2.3	25
K ₂₁	0.697	0.13	18
Q _(mL/min)	1150	140	12
V _{2(mL)}	1620	250	15
AIC	665.97		
BIC	671.31		

V: volumen de distribución del compartimento central, k: constante de eliminación, k₁₂ y k₂₁: constantes intercompartimentales, k_a: constante de absorción, V₂: volumen de distribución del segundo compartimento, Q: aclaramiento intercompartimental, AIC y BIC: criterios de información de Akaike y bayesiano, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

III.4.7 Resultados de la biodistribución después de la administración oral

Como sucede en el caso de la administración intravenosa no existe acumulación apreciable en ninguno de los órganos o tejidos muestreados tabla 17. De la misma forma que en la vía intravenosa no existe captación apreciable en tiroides, indicador de la estabilidad radioquímica de la vainillina radio marcada. Al cabo de una hora queda un residuo del 13.85 % de la administración en el estomago, al intestino pasa un 5.38 % a las cuatro horas, resultados que son lógicos ya que la administración fue por vía oral. No aparece en heces fecales por lo que, al igual que en la administración intravenosa la vainillina se reabsorbe para finalmente excretarse en la orina.

Como se observa en la tabla 15 la mayor parte de la radioactividad fue eliminada por la orina, y se produce fundamentalmente durante las primeras cuatro horas.

Tabla 15. Resultados de la biodistribución a diferentes tiempos después de la administración oral.

Muestra		1h		4h		12h		24h	
		Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E	Media	D.E
Hígado	%D/g	0,05	0,011	0,044	0,015	0,028	0,007	0,023	0,012
Bazo	%D/g	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01
Riñones	%D/g	0,31	0,15	0,21	0,18	0,08	0,06	0,06	0,06
Corazón	%D/g	0,02	0,01	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01
Pulmones	%D/g	0,23	0,19	0,06	0,04	0,06	0,06	0,03	0,02
Cerebro	%D/g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Músculo	%D/g	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
Tejido adiposo	%D/g	0,50	0,92	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02	0,01
Estómago	%D/g	13,85	7,38	7,60	5,58	9,09	9,61	2,91	2,42
Intestinodelgado	%D/g	2,46	1,28	5,38	1,97	3,30	1,26	3,60	5,25
Intestino grueso	%D/g	2,46	3,57	1,77	2,96	1,02	0,50	0,32	0,04
Tiroides	%D/g	0,09	0,13	0,07	0,02	0,15	0,01	0,21	0,04
Orina	%D/g			40,54	11,02	13,48	5,10	14,78	7,61
Orina acumulativa	%D/g			40,54		54,02		68,80	
Heces fecales	%D/g					0,03	0,08	0,35	0,69

Los resultados del presente trabajo sugieren que el fenómeno farmacocinético se describe de manera similar tanto para los estudios por vía endovenosa como por vía oral. Ambos presentan una cinética bicompartimental, donde hay una distribución rápida del compartimento central al periférico con una constante K_{12} mucho mayor que la K_{21} . Con un volumen del compartimento central menor que el volumen en estado estacionario. Existe una distribución hacia lugares más profundos, en este caso los eritrocitos.

Es destacable que los estudios farmacocinéticos intraeritrocitarios y de biodistribución confirman que la vainillina entra al eritrocito donde realiza su acción y no se distribuye en ningún órgano, por lo que se encuentra confinada al compartimento vascular, favoreciendo su uso como agente antidrepanocítico.

III.4.8 Biodisponibilidad de la vainillina

Para el cálculo de la biodisponibilidad se utilizaron los valores de concentración plasmática promedio obtenidos, por la determinación de los niveles en sangre con el contador automático (Berthold, LB 2104, Alemania), del estudio de la vainillina

marcada. En la tabla 16 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos analizados a través de un análisis no compartimental, utilizando el programa de farmacocinética WinNonlin profesional, versión 5.1 A; Pharsight Co., 2005, tanto para la vía oral y endovenosa.

Tabla 16. Parámetros calculados por el análisis no compartimental para la administración oral y endovenosa.

Parámetros	Vía Oral	Vía Endovenosa
AUC _{0-t} (µg-h/mL)	15.54	42.75
AUC _{0-∞} (µg-h/mL)	28.01	52.07
Ke (h ⁻¹)	0.02	0.10
t _{1/2} (h)	28.01	6.46
Vd/F (mL)	3553.82	422.46
Vss (mL)	-	631.06
CL (mL/h)	87.92	45.31
MRT (h)	38.66	13.92
F (%)	51	-

AUC_{0-t}: área bajo la curva de 0 al tiempo T; AUC_{0-∞}: área bajo la curva de 0 al infinito; t_{1/2}: tiempo de vida media; Ke: constante de eliminación; Vd: volumen de distribución del compartimento central; Vss: volumen de distribución estacionario; CL: aclaramiento; MRT: tiempo de residencia media; F: biodisponibilidad.

La biodisponibilidad se considera uno de los parámetros farmacocinéticos más importantes de cualquier fármaco desarrollado para la administración extravascular. La biodisponibilidad oral es un término relativo usado para describir el índice y el grado de la absorción después de la administración oral de un fármaco comparada con otra vía de administración de referencia, por lo general la vía endovenosa. La biodisponibilidad calculada de la vainillina fue de un 51 %. Este valor puede estar dado por los posibles procesos de biotransformación de esta sustancia tanto a nivel de la pared gastrointestinal así como a un efecto de primer paso hepático. También a los procesos de degradación de la vainillina en el tracto gastrointestinal o a los dobles picos encontrados en la curvas de concentración contra tiempo.

Los demás parámetros farmacocinéticos a pesar de ser calculados a través de un modelo no compartimental guardan una correspondencia lógica con el estudio de la vainillina marcada.

III.5 Estudios toxicológicos

Después de caracterizar el perfil farmacocinético de la vainillina, se puede obtener una garantía de que los resultados de los estudios toxicológicos son robustos y se corresponden con el comportamiento de esta molécula como futuro candidato terapéutico ya que los resultados anteriores de toxicidad lo evalúan para su uso como aditivo alimenticio.

La evaluación toxicológica preclínica en el desarrollo de un fármaco comprende la realización de una serie de estudios que van desde los estudios a corto plazo hasta los especiales. Los estudios preclínicos incluyen entre otros a los estudios de toxicidad aguda, los que indican los efectos probables de una sobredosificación aguda en el hombre, son útiles para el diseño de estudios más específicos (segunda barrera), determinan las especies más susceptibles y los órganos más afectados.

III.5.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral. Método de clase tóxica aguda (CTA)

Aunque durante el estudio no se produjo la muerte de ningún animal, durante el ensayo se presentaron los signos y síntomas tóxicos siguientes:

Observación del primer día

Los resultados obtenidos inmediatamente, a la hora y a las tres horas después de la administración se muestran en la tabla 17.

Seis horas después de la administración los animales recuperaron totalmente sus hábitos y conductas normales aunque persisten algunos síntomas como el acicalamiento.

Tabla 17. Signos clínicos observados en las ratas inmediatamente, a la hora y a las tres horas después de la administración.

Signos y síntomas clínicos inmediatamente después de la administración	
Grupos experimentales	Observaciones
Grupo tratado hembras	Sedación, disnea, decremento de la actividad motora espontánea, tren posterior caído, disminución del reflejo pupilar y la capacidad de incorporarse, no hay respuesta a estímulos del sobresalto, piloerección y lagrimeo.
Grupo tratado machos	Sedación, disnea, decremento de la actividad motora espontánea, tren posterior caído, disminución del reflejo pupilar, no hay respuesta a estímulos del sobresalto, piloerección.
Grupo control hembras	Quietud.
Grupo control machos	Quietud.
Signos y síntomas clínicos una hora después de la administración	
Grupo tratado hembras	Ligero aumento de la actividad motora con desplazamientos lentos tambaleantes.
Grupo tratado machos	Ligero aumento de la actividad motora con desplazamientos lentos tambaleantes, inquietud, comienzo de signos de recuperación.
Grupo control hembras	Comportamiento normal
Grupo control machos	Comportamiento normal
Signos y síntomas clínicos tres horas después de la administración	
Grupo tratado hembras	Incremento de la actividad motora, respuesta a estímulos exteriores, acicalamiento, presentan signos de recuperación.
Grupo tratado machos	Incremento de la actividad motora, respuesta a estímulos exteriores, acicalamiento, presentan signos de recuperación.
Grupo control hembras	Comportamiento normal
Grupo control machos	Comportamiento normal

Segundo día (Observaciones)

En las tres observaciones realizadas en el segundo día los animales presentaron tendencia al comportamiento normal.

Desde el tercer día hasta el último. (Observaciones)

A partir del tercer día, no se apreciaron signos ni síntomas de toxicidad. La respuesta a estímulos exteriores, actividad motora espontánea, hábitos de aseo y avidez por el agua y la comida, se comportaron de forma normal. En los días posteriores, hasta el

día final del estudio, los animales continuaron mostrando las mismas características normales en su comportamiento y hábitos de vida.

Entre los signos y síntomas observados se encuentran la sedación, la cual se atribuyó a la vainillina debido a sus características depresoras del sistema nervioso central. Es conocido que esta sustancia mimetiza los efectos de tranquilizantes convencionales, como los de la familia de las benzodiazepinas. La acción tranquilizante ocurre por relajación de los músculos esqueléticos y acción directa en el cerebro al ser administrada a mamíferos, pero no provoca los efectos adversos de las benzodiazepinas (Abraham *et al.*, 1997). Otros signos encontrados como la disminución de la actividad motora espontánea, el tren posterior caído y la disminución de los reflejos, pueden estar justificados también por la acción depresora del sistema nervioso central. La piloerección encontrada evidencia la estimulación del sistema nervioso autónomo, las terminaciones nerviosas simpáticas secretan norepinefrina, y esta produce una excitación de los receptores α , y una de las funciones de estos receptores es la contracción de los músculos piloerectores (Guyton *et al.*, 2010). Se puede resumir que los signos y síntomas aparecidos después de la administración del producto están relacionados con la toxicidad inherente a la sustancia. Sin embargo, la pronta recuperación observada en los grupos experimentales y la no aparición de muerte demuestran que el efecto lesivo asociado a la sustancia es bajo.

En el grupo control no se observó ninguno de los síntomas y signos clínicos observados en los animales tratados, solo un estado de quietud después de administrado el vehículo (CMC) siendo esto debido a la manipulación y la cantidad de sustancia administrada.

Estimación de las variaciones de peso

El peso de los animales durante el estudio mantuvo una tendencia ascendente como se muestra en la figura 13, este comportamiento resulta normal para los animales en estas edades. Los machos tuvieron un crecimiento superior al de las hembras durante todos los días del experimento.

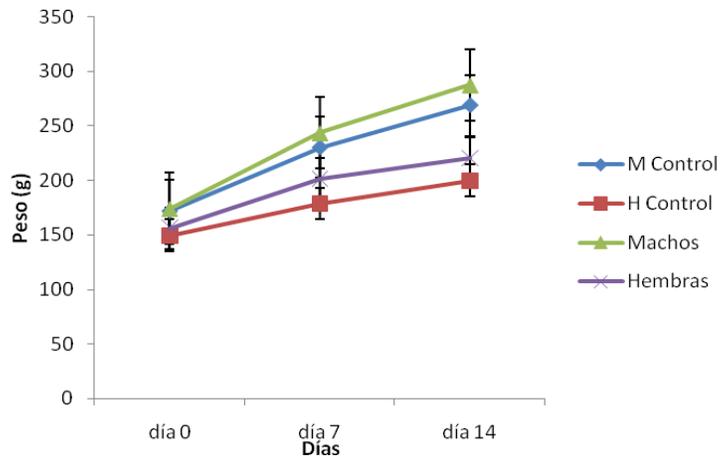


Figura 13. Comportamiento promedio del peso de las ratas Wistar, los días 0, 7 y 14 del estudio. Cada valor es la media de 3.

En el análisis estadístico de estos resultados, donde se comparan los pesos de los animales del grupo tratado con respecto a los intervalos de siete días en el estudio y los valores para el grupo control, se observó un incremento significativo del peso con respecto a los días en todos los casos, menos en las hembras del grupo tratado en el intervalo de 7 a 14 días.

De los resultados relacionados con el peso se infirió, que la vainillina no provocó afectaciones del metabolismo de los alimentos como es normal en estos animales en correspondencia con su edad.

En la figura 14 se muestra que no existen diferencias significativas de las medias del peso en las ratas de los grupos tratados (G1) y el control (G2) durante los días del experimento. En uno y otro grupo se observó un similar incremento significativo de los pesos de las ratas.

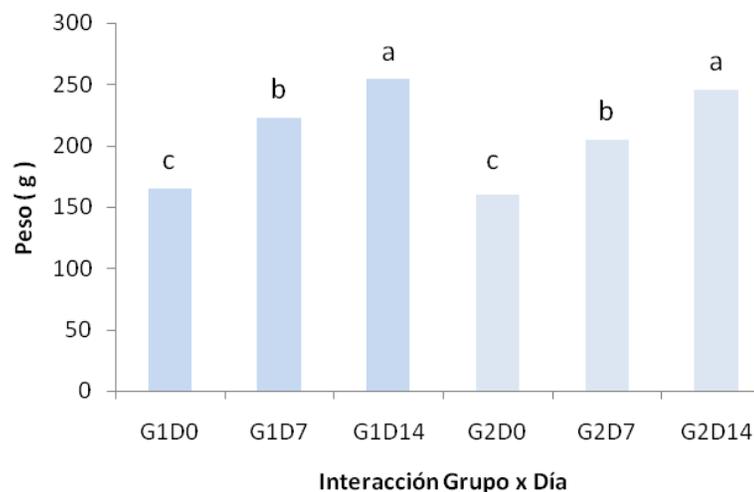


Figura 14. Resultados estadísticos de la Comparación de Medias del peso de las ratas Wistar en los Diferentes Grupos y Días. Dócima de Tukey $p < 0.01$.

El resultado del análisis de la comparación de medias del peso de las ratas, por sexo en uno y otro grupo (tratado y control) con respecto a los días del experimento, se muestra en la figura 15. En los días del pesaje de los animales, los machos presentaron incrementos significativos, mientras que en las hembras no hubo incrementos significativos entre los días 7 y 14.

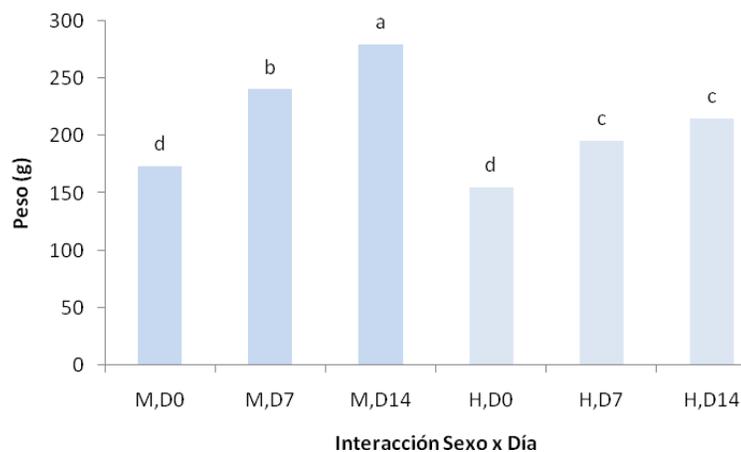


Figura 15. Comparación de medias del peso de las ratas Wistar con respecto al sexo y los días del experimento. Dócima de Tukey $p < 0.01$. M: machos, H: hembras

Determinación de parámetros de hematología clínica

Los valores promedios de las diferentes variables hematológicas, así como la desviación estándar de los mismos del grupo tratado y el control al inicio y al final del estudio se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Valores de las diferentes variables hematológicas del grupo tratado y el control.

Grupo	Sexo	Parámetro/día					
		Hb (g/dL)		HTC (%)		ETO ($10^6/\text{mm}^3$)	
		0	14	0	14	0	14
Tratado	M	14.71±0.50	15.17±0.81	46.83±0.76	47.66±0.57	5.56±2.97	3.88±4.02
	H	13.68±0.35	14.91±1.48	45.50±0.50	46.50±1.32	5.79±6.71	2.81±9.50
Control	M	14.67±0.49	16.88±0.60	46.50±0.50	48.20±0.91	6.29±2.48	3.94±0.81
	H	13.70±0.30	15.55±0.22	45.90±0.36	46.43±0.51	6.47±3.26	4.43±1.39

Grupo	Sexo	Parámetro/día					
		LEUC ($10^6/\text{mm}^3$)		N (%)		L(%)	
		0	14	0	14	0	14
Tratado	M	4.26±1.12	8.66±1.70*	34.33±3.51	40.67±9.07	65.00±2.64	59.33±9.07
	H	3.46±3.75	1.20±6.12	36.33±7.505	33.33±7.505	63.33±8.02	66.00±8.54
Control	M	4.92±1.00	8.62±0.12	21.76±1.25	29.46±0.83	59.20±1.15	71.56±1.97
	H	6.72±2.00	9.65±1.09	17.93±1.90	25.50±0.65	69.36±1.30	78.46±0.70

Hb: hemoglobina, HTC: hematocrito, ETO: eritrocitos, LEUC: leucocitos, N: neutrófilos, L: linfocitos;
 $p < 0.05$ *

Al comparar los valores medios de la hemoglobina y hematocrito con los del grupo control (tabla 18) y el rango de valores normales para la colonia, y la Iffa Credo (Anexo 9) puede apreciarse que en el grupo experimental independientemente del sexo, se observó un comportamiento normal en el valor de dichos parámetros (Iffa Credo, 1980 y Tillan, 1994).

En el análisis estadístico se encontró que el valor de los leucocitos de los machos del último día resultó significativamente mayor que el del día 0 lo cual puede estar dado a consecuencia de la dilatación de los túbulos renales y los focos de nefrosis encontrados en el análisis histopatológico (Tabla 20).

Determinación de parámetros de bioquímica clínica

Los valores promedios de las diferentes variables de bioquímica clínica, así como la desviación estándar de los mismos en el grupo tratado y el control al inicio y al final del estudio, se presentan en la tabla 19.

Tabla 19. Valores de las diferentes variables bioquímicas del grupo tratado y el control.

Grupo	Sexo	Parámetro/día									
		ALT(U/L)		AST(U/L)		GLUC(mmol/L)		CHOL(mmol/L)		BUN(mmol/L)	
		0	14	0	14	0	14	0	14	0	14
Tratado	M	18.14± 8.19	22.96± 5.45	31.97± 1.47	29.25± 24.14	1.39± 0.12	7.07± 1.16	2.07± 0.52	1.96± 0.54	12.00± 0.63	15.32± 3.13
	H	18.63± 7.81	26.28± 13.39	34.19± 9.47	33.45± 9.86	2.28± 0.77	8.47± 1.64	3.06± 1.06	1.87± 0.66	10.33± 5.11	17.34± 2.28
Control	M	24.55± 1.45	28.52± 0.64	29.38± 1.30	27.81± 1.01	2.63± 0.36	6.08± 0.10	2.23± .10	1.92± 0.06	12.27± 0.34	15.07± 0.22
	H	23.32± 1.56	29.66± 0.66	31.31± 1.01	31.49± 1.61	2.74± 0.38	6.45± 0.42	2.61± 0.29	1.63± 0.04	13.59± 0.50	17.48± 0.36

ALT: alanina amino transferasa AST: Aspartato amino transferasa GLUC: glucosa CHOL: colesterol BUN: urea. Cada valor es la media de 3 ± la desviación estándar

Los valores de las variables bioquímicas, durante los días del experimento, se comportaron dentro del rango normal respecto a los valores del grupo control y a los reportados en la colonia, y la Iffa Credo (Anexo 9). No obstante, los valores de ALT y AST manifestaron una tendencia al límite inferior de los valores reportados como normales para los animales de la colonia, aunque no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control, esto puede estar dado a que en muchas especies, (ratas y perros) la proporción de ALT en el tejido hepático es mayor que en cualquier otro órgano. La ALT está presente en muchos tejidos de ciertas especies incluyendo la rata. Existen varios ejemplos donde los niveles de ALT y AST están disminuidos en el plasma después de la administración de xenobióticos debido a los efectos sobre el fosfato de piridoxal, que es un cofactor necesario para la acción de las aminotransferasas AST y ALT (Rhodes *et al.*, 1987; Waner *et al.*, 1990; Waner y Nyska 1991), y puede alterar las diferencias estadísticas observadas en medio de grupos de tratamiento en estudios de la rata (Evans, 2009). Ambos grupos presentaron un aumento en los niveles de glucosa, en la mayoría de las especies la

concentración de glucosa es uno de los parámetros más sensibles a las variaciones en el manejo y colección de muestras (Gad, 2007). Este aumento pudo estar dado a la excitación y el estrés ocasionado en los animales después de la manipulación experimental, que pueden haber acentuado los efectos sobre los datos de laboratorio. La excitación está asociada con la liberación endógena de catecolaminas y el estrés con la de corticoesteroides, liberados en los procesos de glicolisis y glucogénesis, los cuales provocan cambios que afectan la concentración de glucosa y leucocitos (Evans, 2009).

Resultados histopatológicos

En la observación macroscópica no se evidenció ningún signo de toxicidad, sin embargo, si algunas alteraciones histopatológicas que se observan en la tabla 20 por órgano afectado.

En los animales del grupo control no se observaron daños en órganos. Las alteraciones más evidentes que se presentaron tanto en las hembras como en los machos del grupo experimental, fueron ligeras hiperqueratosis de las regiones no glandulares del estómago, (figura 16). Estas se encuentran relacionadas con agentes irritantes al igual que algunas erosiones e hiperplasia del epitelio (pliegue o plica) que divide el estómago en glandular y no glandular.

La hiperplasia escamosa difusa o focal es muy común en la administración de químicos por "gavage" aunque puede observarse también cuando se administra el producto en el alimento y el agua. La hiperplasia focal se caracteriza por un hinchamiento de la capa del epitelio que a menudo forma una lesión con marcada hiperqueratosis e infiltración, o células inflamatorias. Las lesiones de hiperplasia focal a menudo se desarrollan con una lesión crateriforme con un foco central de células inflamatorias. Cuando la hiperplasia consiste en un hinchamiento difuso del epitelio, la hiperqueratosis es a menudo un componente de la lesión (Roger, 1990). Ambas formas de hiperplasia se desarrollan con frecuencia directamente antes de la plica, que divide las partes no glandular y glandular del estómago. La hiperplasia es inducible y hay formas que se encuentran relacionadas con ciertas combinaciones. La

Tabla 20. Daños en órganos observados en el análisis histopatológico realizado a los animales del grupo tratado.

Órgano	Observaciones	Animales	
		Hembras	Machos
Riñón	Dilatación de los túbulos renales.	2,3	1,2
	Focos de nefrosis.	3	1,3
Estómago	Región glandular: pequeña erosión en la mucosa.	1	
	Región no glandular: ligera hiperqueratosis.	1,2,3	1,3
	Región glandular: erosiones e hiperplasia del epitelio.		3

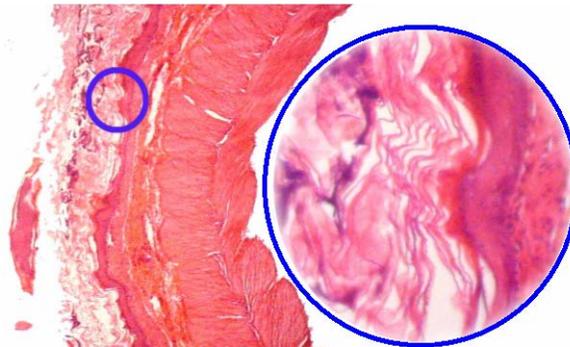


Figura 16. Ligera hiperqueratosis observada en el estómago de las ratas del grupo experimental. Hematoxilina-eosina, 100x

hiperplasia escamosa en roedores se manifiesta a través de efectos toxicológicos y no es rara (Weber, 1998).

En un estudio de toxicidad oral en ratas realizado al acetaldehído y al formaldehído se observó hiperqueratosis en estómago no glandular por el acetaldehído a la dosis de 675 mg/Kg y en el formaldehído a la dosis de 125 mg/Kg, presentando este último otros daños en estómago como gastritis focal en estómago glandular (Woutersen, 1988). Otros estudios en ratas, donde se administró formaldehído en el agua de tomar por dos años, se observaron, en los animales del grupo de dosis alta, cambios gástricos relacionados con el tratamiento, como hiperplasia epitelial acompañada de queratosis, ulceración focal en estómago no glandular y en estómago glandular, gastritis atrófica crónica focal ocasionalmente acompañada por ulceración y/o hiperplasia glandular (Til *et al.*, 1989). En un estudio crónico en ratas Wistar con formaldehído fueron evidentes las erosiones y úlceras en estómago glandular y no glandular. En el no glandular se observó hiperplasia escamosa celular con o sin queratosis y un crecimiento descendente de las células basales (Tobe *et al.*, 1989).

El daño observado en el estómago de las ratas en esta investigación con vainillina, se corresponde con las observaciones realizadas en los reportes anteriores, cuando utilizaron compuestos que tenían en su molécula el grupo aldehído, esto sugiere que este grupo puede ser el responsable de estos daños.

Las lesiones inflamatorias (aguda y crónica) inducidas en el riñón de las ratas en estudios de toxicidad y carcinogénesis pueden ser secundarias al daño primario en túbulos o papilas. Si la concentración de un químico en el filtrado excede su solubilidad, puede precipitar como cristales. Estos cristales obstruyen los túbulos mecánicamente conduciendo a la dilatación y el aumento de la presión intraluminal. Esto puede disminuir la proporción de filtración glomerular y el flujo de sangre renal y puede llevar a isquemia y pérdida subsecuente de tejido renal. Los cristales precipitados pueden provocar una respuesta inflamatoria típica granulomatosa y fibrosis. Se han visto tales efectos con sulfonamidas, oxalatos y otros químicos (Montgomery y Curtis, 1990).

En este ensayo se observaron además dilataciones de los túbulos renales que pudieran estar asociadas a un efecto tóxico. Las características de baja solubilidad de la vainillina en soluciones acuosas y la fácil formación de cristales, pueden ser la causa de la dilatación de los túbulos renales encontrados en este estudio.

III.5.2 Evaluación de la toxicidad a dosis repetida 90 días.

Se realizó un estudio de toxicidad subcrónico de la vainillina con el fin de garantizar la seguridad de esta sustancia como candidato farmacéutico, puesto que se propone un régimen de administración diaria para el humano. Se suministraron dosis de vainillina por vía oral de 160, 400 y 800 mg/kg de peso corporal a ratas Sprague-Dawley, durante 13 semanas.

La administración de las diferentes dosis de vainillina no afectó la vitalidad de los animales de experimentación. Las alteraciones clínicas más representativas durante el ensayo fueron: somnolencia, sedación, respuesta disminuida al estímulo del sobresalto, acicalamiento, caída del pelo. Se detectaron heces de consistencia blanda en los tres grupos de dosis siendo superior en la dosis alta.

La sedación se atribuyó a la vainillina debido a las características depresoras sobre el sistema nervioso central (Abraham et al., 1997). Este síntoma, el cual también fue observado en el estudio de toxicidad agudo, reafirma los resultados, de la acción tranquilizante de la vainillina, manifestada por la relajación de los músculos esqueléticos y la acción directa sobre el cerebro. Aunque también pudiera estar en la relación estructura actividad que se presenta, pues es conocido que el núcleo aromático confiere potentes propiedades narcóticas (<http://www.Pharmaportal.dom.ar>). Se puede considerar en nuestro caso un grupo toxóforo responsable del evento tóxico (sedación marcada), evidenciada en los niveles de dosis alta. Existe un estudio de toxicidad donde se observó períodos cortos de inconsciencia en ratas administradas con vainillina (Ketli Ho et al., 2011). La somnolencia, signo en el cual se ve afectado el centro del sueño del sistema nervioso, puede ser referido a la molécula en estudio, debido a la acción directa en el cerebro comentada anteriormente.

Las heces blandas también se relacionó con la sustancia administrada pues se ha reportado la acción irritante de la vainillina al tracto gastrointestinal (Yu, 2005), la cual puede estimular la porción inferior de los intestinos provocando la evacuación por vía rectal de heces blandas o diarrea (Repetto, 2002).

El ensayo culminó con una supervivencia del 97,1 %, tomando como total los animales pertenecientes a los grupos Control, Dosis Baja, Dosis Media y Dosis Alta. Los tres animales que murieron pertenecían al grupo Dosis Alta, una hembra y dos machos.

Las circunstancias de la muerte de los animales y el análisis anátomo-patológico de estos permiten asegurar que estas no guardan relación con efectos ocasionados por la sustancia de ensayo. Se comprobó que las muertes fueron causadas por el depósito accidental de la sustancia de ensayo fuera del sitio de aplicación.

En el anexo 10 se describen las observaciones clínico-patológicas de los animales muertos antes de finalizar el estudio. El resto de los tejidos, órganos y sistemas no mostraron efectos tóxicos relacionados con la sustancia de ensayo. En los animales muertos antes de finalizar el estudio se pudo, comprobar microscópicamente lesiones a diferentes niveles de la tráquea y músculos del cuello y tórax de carácter inflamatorio y necrótico (anexo11).

La administración por gavage es un método preciso de administración de sustancias usado ampliamente en la farmacología, toxicología, y otros estudios relacionados. No obstante, varios reportes documentan casos en animales y humanos de perforación gástrica y esofágica (Hecker *et al.*, 1990; Schauer *et al.*, 1996), fístulas traqueo-esofágicas (Pelc *et al.*, 2001), neumonía por aspiración (LeFrock *et al.*, 1979), necrosis nasal (Lai *et al.*, 2001), incremento del estrés (Brown *et al.*, 2000), y muerte debido a colocación incorrecta de la cánula de administración (Germann y Ockert, 1994; Murphy *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 1995). Debe tenerse además en cuenta el tamaño de los animales, pues las muertes, ocurridas entre los días 64 y 74, ocurrieron en animales con elevado peso, lo cual se conoce implica dificultades para una restricción efectiva por parte del técnico para administrar el animal (Wheatley,

2002). Las posibilidades de fallo en la administración también aumentan en casos como los de este ensayo, de administraciones reiteradas a grandes grupos de animales durante tres meses dos veces por día (Huang-Brown y Guhad, 2002).

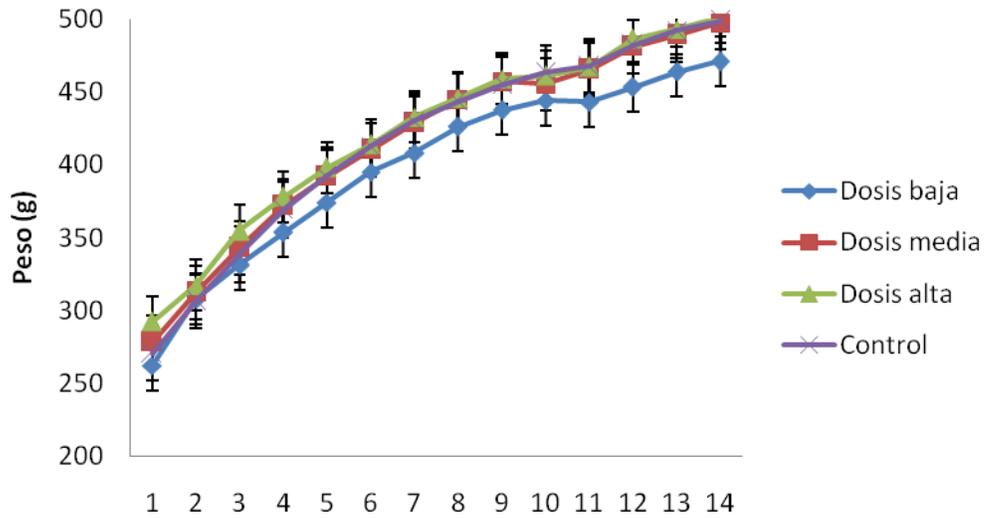
Se determinaron los cambios en el peso corporal de las ratas H y M durante las semanas de experimentación mostrándose los resultados en la figura 17, A y B respectivamente. Durante el estudio, los animales de ambos sexos tuvieron un crecimiento ascendente característico de la especie y no se encontró diferencias entre los tratados y los controles. La diferencia entre las curvas de peso de hembras y machos es característica de la especie. Estos resultados sugieren la no toxicidad de la vainillina a las dosis evaluadas, los cambios en el peso corporal son indicadores sensibles de toxicidad general o específica, pues los animales consumen menos alimentos después de la exposición a un compuesto tóxico (Timbrell, 2000). La estimación adecuada de las variaciones del peso corporal en animales de experimentación aporta información valiosa sobre la influencia de este, en el crecimiento del animal, que debe estar ajustado a la curva de crecimiento reportada por las agencias productoras de animales. Siendo el peso corporal un indicador de gran sensibilidad y valor diagnóstico en el estudio de compuestos de baja toxicidad (Clayton, 1993).

Paralelo a la determinación del peso corporal se controló el consumo de agua tablas 21 y 22 y de alimentos cuyos valores se relacionan en las tablas 23 y 24.

Los datos relacionados con el peso corporal, así como el consumo de agua y alimentos son de gran importancia, ya que posibilitan estimar una serie de cambios orgánicos en los individuos, por ello, una variación significativa en el comportamiento de alguno de ellos, sugiere la presencia de alteraciones que atentan contra el normal funcionamiento del organismo.

Como muestran los resultados, al finalizar el estudio se halló que existieron diferencias significativas en el consumo de agua, entre grupos en algunas semanas para ambos sexos, sin un patrón definido asociado a algún grupo, por lo que no parece existir una relación dosis respuesta. Los valores obtenidos se hayan dentro de

A.



B.

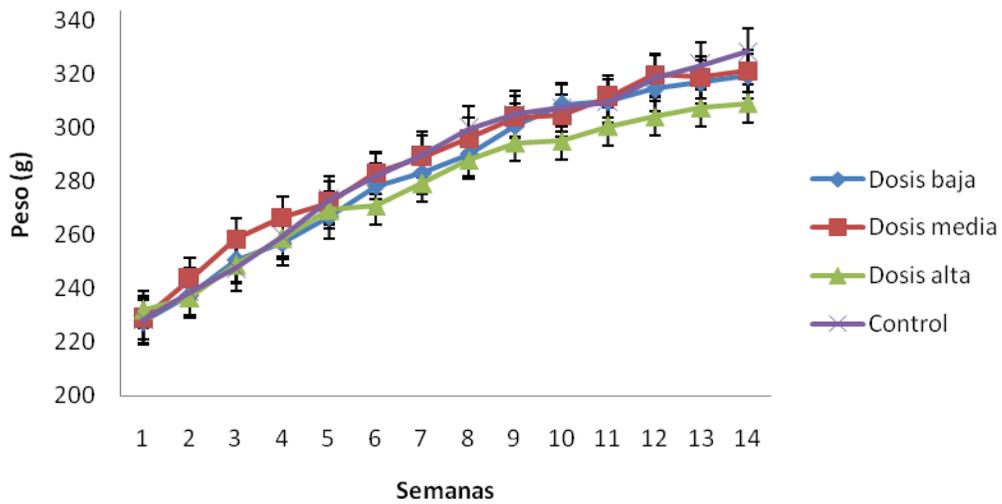


Figura 17. Comportamiento del peso corporal de ratas Sprague-Dawley administradas con tres dosis de vainillina por vía oral durante 13 semanas. Cada valor es la media de 12 determinaciones \pm desviación estándar. A: ratas hembras. B: ratas machos. Control: ratas tratadas solamente con el vehículo.

Tabla 21. Comportamiento del consumo de agua (mL) de las ratas hembras durante el ensayo de 90 días.

Consumo de agua (hembras) Dosis (mg/Kg)				
Semanas	Control	160	400	800
1	39.29 ± 4.05	36.07±5.27	32.50±8.96	35.27±5.29
2	40.63 ±5.12a	32.86±2.40b	28.21±8.41b	31.25±5.57b
3	26.56±6.50	31.07±2.71	34.29±7.72	29.02±5.29
4	30.80 ±4.75	28.93±0.80	30.71±8.69	38.17±9.25
5	31.92±4.10	31.79±2.65	37.86±7.82	36.16±7.56
6	41.96±1.65a	30.71±3.87b	38.57±6.26a	37.95±8.36a
7	35.04±5.80	30.36±5.21	32.14±7.68	34.60±7.63
8	34.15±4.42	32.14±4.89	34.64±9.07	38.84±10.58
9	32.81±5.31	37.14±7.62	41.43±8.87	41.29±9.03
10	38.08±2.66a	32.71±3.15a	38.36±6.53a	40.89±9.13b
11	38.08±3.12	32.86±4.48	38.43±6.79	36.25±9.13
12	35.36±3.32	33.07±4.50	37.50±9.02	38.17±10.12
13	35.67±5.21	26.50±2.35	35.71±5.05	35.27±8.79

Cada valor indica la media ± la desviación estándar. Letras iguales: no hay diferencias; letras diferentes: diferencias significativas $p < 0.05$

Tabla 22. Comportamiento del consumo de agua (mL) de las ratas machos durante el ensayo de 90 días.

Consumo de agua (machos) Dosis (mg/Kg)				
Semanas	Control	160	400	800
1	47.1± 4.86	45.36±9.16	40.0±2.04	41.52±11.28
2	42.86±3.70	32.5±9.65	37.5±5.65	38.17±11.69
3	40.85 ±5.76a,c	35.36±3.19a	43.21±6.36c	27.9±3.16b
4	39.33±3.36	36.43±6.51	38.21±5.14	42.86±6.19
5	41.52±5.71	42.14±5.30	43.93±10.30	43.97±8.10
6	40.18±3.31	41.07±7.99	43.21±8.60	39.29±7.87
7	33.93±7.33	36.79±4.48	41.79±8.53	38.84±6.73
8	40.18±6.11	42.86±7.68	33.93±7.99	43.97±7.81
9	41.74±7.81	37.5±4.89	36.79±8.34	35.71±6.40
10	38.75±2.65	43.57±2.99	35.14±8.51	46.92±14.71
11	41.52±5.01	35.93±3.03	37.14±7.30	35.85±5.77
12	37.81±6.99	40.29±1.56	40.71±6.36	39.51±11.07
13	38.39±4.64	31.57±2.12	35.36±5.84	36.83±5.56

Cada valor indica la media ± la desviación estándar. Letras iguales: no hay diferencias; letras diferentes: diferencias significativas $p < 0.05$

Tabla 23. Comportamiento del consumo de alimento (g) de las hembras durante el ensayo de 90 días.

Consumo de alimentos (g) (hembras) Dosis (mg/Kg)				
Semanas	Control	160	400	800
1	23.30± 3.91	22.17±1.78	22.36±1.31	20.63±0.98
2	21.89±2.50a	20.72±0.77a,b	20.15±0.51a,b	18.86±1.97b
3	21.21±2.25	20.21±0.38	21.23±1.09	20.09±2.66
4	22.07±2.43	19.40±0.96	19.55±2.71	20.14±3.73
5	21.33±1.16	21.81±0.34	22.20±0.24	21.76±2.95
6	23.43±1.65	22.42±1.63	22.10±0.54	22.18±2.15
7	23.34±2.87	23.32±1.49	22.77±0.81	23.18±2.47
8	24.14±2.24a	24.98±1.24a	20.32±0.23b	23.46±1.38a
9	25.29±1.82a,c	26.28±1.27a	29.25±1.06b	24.44±1.42c
10	25.39±2.16	25.07±1.71	25.44±0.26	25.31±2.21
11	26.56±2.94a	25.20±1.32a	24.68±0.96a	22.04±1.98b
12	23.06±1.80	22.92±1.32	22.65±0.82	21.86±1.75
13	22.32±2.07	21.38±1.26	20.57±0.94	19.79±2.05

Cada valor indica la media ± la desviación estándar. Letras iguales: no hay diferencias; letras diferentes: diferencias significativas $p < 0.05$

Tabla 24. Comportamiento del consumo de alimento (g) de los machos durante el ensayo de 90 días.

Consumo de alimentos (machos) Dosis (mg/Kg)				
Semanas	Control	160	400	800
1	31.04± 8.33	35.86±1.78	30.85±3.18	34.84±3.88
2	34.50±4.02a	29.60±0.77b,c	27.14±3.16b	31.18±2.06a,c
3	28.36±3.40	28.26±0.38	27.83±2.14	29.60±2.68
4	28.90±2.48a	25.62±0.96b	26.79±2.40a,b	29.61±2.43a
5	29.03±2.54	29.07±0.34	29.23±2.15	31.10±2.55
6	30.29±1.64	29.70±1.63	29.44±2.15	32.22±2.33
7	29.17±4.70	31.38±1.49	31.40±4.00	33.57±2.57
8	31.96±3.28a	30.09±1.24a,b	26.15±3.27b	33.45±2.55a
9	31.96±2.34	31.53±1.27	34.69±1.47	31.69±3.13
10	31.76±2.67	30.97±1.71	31.92±3.58	35.14±3.48
11	33.59±3.20	31.46±1.32	31.30±4.55	33.73±3.56
12	32.54±3.20	31.82±1.32	31.60±3.77	35.66±6.12
13	29.36±2.84	28.66±1.26	23.72±2.71	33.48±6.11

Cada valor indica la media ± la desviación estándar. Letras iguales: no hay diferencias; letras diferentes: diferencias significativas $p < 0.05$

lo reportado para esta especie, siendo ligeramente superior en los machos, en correspondencia con su más rápido crecimiento en comparación a las hembras (ICLAS, 1998).

La disminución o aumento significativo en el consumo de agua para las dosis ensayadas; se refleja en los valores de las medias, de este parámetro. Esto puede estar vinculado a factores relativos a la exposición con la sustancia de ensayo como: dosis, vía de administración propuesta (oral), la duración y frecuencia de la administración, que pueden generar condiciones de estrés que repercutan sobre el consumo de agua por los animales de este grupo. Lo anterior ha sido observado en otros estudios toxicológicos preclínicos, siendo una posible explicación al resultado obtenido (Casaret y Doulls, 2008).

En el consumo de alimento se halló que existieron diferencias significativas entre grupos en algunas semanas para ambos sexos, sin un patrón definido asociado a algún grupo, por lo que no parece existir una relación dosis-respuesta. La oscilación entre los 20 a 30 g/animal/día para las hembras, y entre los 30 a 35 g para los machos, coincide en general con lo reportado por la literatura (10g/100g/día) (Hubrecht y Kirkwood, 2010), teniendo en cuenta el comportamiento del peso corporal. El consumo relativamente mayor de los machos se corresponde con su más rápido crecimiento en comparación a las hembras. La curva de consumo también se ajusta a la bibliografía consultada, según la cual en las primeras semanas de vida de las ratas el consumo aumenta hasta llegar a estabilizarse. La ligera disminución a partir de semana 15 del ensayo puede ser explicada porque el requerimiento de alimento para el mantenimiento en relación al peso corporal del animal declina según el animal se introduce en la madurez (Gettys *et al.*, 1988).

Este resultado es lógico si se tiene en cuenta la duración del estudio y la variabilidad que supone desde el punto de vista del metabolismo de los alimentos, la administración repetida de un xenobiótico por vía oral y considerando los posibles efectos irritantes sobre la mucosa gastrointestinal.

Estas diferencias estadísticas no deben tener consecuencia biológica pues los valores se encuentran dentro del rango normal de los consumos de agua y de alimentos reportados para esta especie (Derelanko y Hollinge, 2002). Por tanto, estos resultados tampoco muestran ningún indicio de toxicidad de la molécula en estudio.

Posteriormente se realizó el análisis hematológico y bioquímico clínico de todos los animales involucrados en el estudio. Los resultados de las determinaciones hematológicas se exponen en la tabla 25.

En sentido general, se pudo observar que ningún parámetro hematológico mostró un comportamiento que pudiera corresponderse con efectos causados por la sustancia de ensayo, reflejando las diferencias significativas en su mayoría variaciones dentro del rango normal establecido a partir de los controles.

En los machos de todos los grupos se produjo una disminución del primer al segundo muestreo del volumen corpuscular medio (VCM), este es el volumen calculado del eritrocito promedio, producto de la relación entre el conteo de eritrocitos y el hematocrito. Esta disminución podría explicarse por evidencia científica que plantea que los animales jóvenes tienen niveles más altos dado a la inmadurez de los eritrocitos, que los nuevos eritrocitos aún no han asumido el prototipo de forma bicóncava, y debido también a la presencia de hemoglobina fetal y de otros tipos en la célula (Suber, 1989). En cambio, las hembras no mostraron esta tendencia del primer al segundo muestreo, y solo comenzaron a disminuir a partir de terminadas las 13 semanas de administraciones repetidas de las sustancias.

Los datos originales de los parámetros bioquímicos se encuentran reflejados en la tabla 26 y 27. Las alteraciones bioquímicas encontradas estuvieron en su mayoría dentro del rango de referencia establecido a partir de los controles, con excepción del índice A/G en las hembras del grupo dosis alta, la creatinina en los machos del grupo de dosis alta en el muestreo II y la fosfatasa alcalina (ALP) de las hembras donde hubo diferencias entre muestreos y en los machos de dosis alta no hubo diferencias pero el valor está por encima de lo reportado para el rango histórico del CENPALAB.

Tabla 25. Principales parámetros hematológicos del segundo muestreo (13 semanas), de ratas administradas con diferentes dosis de vainillina por vía oral.

Parámetro	Dosis de Vainillina				Rango histórico CENPALAB
	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta	
Hembras					
Hb (g/dL)	10.86±2.04	10.20±1.67	10.23±1.63	10.97 ± 1.61	10,9-15,9
ETO (10 ⁶ /μL)	6.31± 1.08	5.96 ± 0,96	5.98 ± 0.90	6.32± 0.92	5,8-8,1
HTC (%)	37.42 ± 6.69	35.30 ± 5.71	35.31±5.76	38.51 ± 5.64	29,6-47,1
VCM (fL)	59.12 ±1.17	59.33 ± 1.12	58.90 ± 2.08	60.03 ± 1.75	51,9-60,3
HCM (pg)	17.15±0.48	17.13 ± 0.39	17.10 ± 0.43	17.37 ± 0.46	16,2-22,0
CHCM (g/dL)	28.97±0.62	28,92± 0.41	28.98±0.55	28.50±0.34	
PLT (10 ³ /μL)	295.35±85.63	336.44±101.69	349.10 ± 86.90	304.87 ± 83.21	362-939
LEUC (10 ³ /μL)	4.58±1.34	4.68 ± 1,17	3.98 ± 1.11	4.06± 1.06	2,7-11,3
N %	9.88±5.68	9.44±4.53	10.70±4.97	9.00±3.74	
L %	89.76±5.62	89.78±4.44	89.10±5.02	90.53±3.80	
M %	0.29±0.59	0.67±0.71	0.10±0.32	0.40±0.63	
E %	0.06±0.24	0.11±0.33	0.10±0.32	0.07±0.26	
Machos					
Hb (g/dL)	12.40±1.26	11.29 ± 1.89	11.21 ± 1.23	11.74 ± 1.49	11,22-16,15
ETO (x10 ⁶ /μL)	7.57±0.64	7.02 ± 1.14	6.72 ± 0.63	7.17 ± 0.84	5,70-8,49
HTC (%)	43.49±4.22	39.74 ± 6.10	39.19 ± 4.25	41.09 ± 5.00	30,61-49,01
VCM (fL)	57.27±1.22	56.60 ± 1.17	58.30 ± 1.83	57.21 ± 1.76	51,0-64,08
HCM (pg)	16.31±0.41	16.11±0.31	16.67± 0.56	16.33 ± 0.47	16,2-22,2
CHCM (g/dL)	28.50±0.35	28.37±0.58	28.64±0.50	28.52±0.41	
PLT (10 ³ /μL)	255.87±93.23	303.30±120.98	406.60 ± 65.00	228.64 ± 49.15	377-934
LEUC (10 ³ /μL)	6.23±1.75	5.63 ± 1.63	5.75±1.84	6.07 ± 0.99	3,55-13,73
N %	13.20±5.03	12.50±5.58	15.70±6.02	13.50±4.91	
L %	85.87±5.18	87.10±5.70	83.60±5.99	85.79±4.81	
M %	0.67±0.72	0.40±0.52	0.40±0.52	0.57±0.65	
E %	0.27±0.46	0.00±0.00	0.30±0.48	0.14±0.36	

Los valores representan la media de 12 determinaciones ± desviación estándar. Letras iguales: no hay diferencias; letras diferentes: diferencias significativas p<0,05; Hb: hemoglobina; ETO: conteo de eritrocitos; HTC: hematocrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración hemoglobina corpuscular media PLT: conteo de plaquetas; LEUC: conteo diferencial de leucocitos, N: neutrófilos, L: linfocitos, M: monocitos, E: eosinófilos

Tabla 26. Principales parámetros bioquímicos al cabo de 13 semanas, de ratas (hembras) administradas con diferentes dosis de vainillina por vía oral.

Parámetro	Dosis de Vainillina				Rango histórico CENPALAB
	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta	
Hembras					
ALP (U/L)	370.06±143.50*	358.60±120.04*	360.0± 72.81*	431.80 ± 131.70*	32-310
AST (U/L)	141.03 ±18.95	141.18 ± 18.53	141.98 ± 19.62	142.44 ± 15.84	43-276
ALT (U/L)	36.27 ±7.26	37.50 ± 10.86	33.81 ± 6.99	37.93 ± 7.12	16-83
ALB (g/L)	39.78±3.79	40.60±2.34	39.72±1.77	41.76±3.24	
PT (g/L)	68.49 ±6.93	69.18 ± 5.79	66.89 ± 4.27	65.89 ± 5.60	
Bil-T (µmol/L)	4.90±1.40	4.38±0.96	4.69±1.12	5.35±1.04	
GLUC (mg/dL)	6.50 ±1.25	6.19 ± 1.36	5.46 ± 1.06	6.09 ± 1.09	
BUN (mmol/L)	6.35±1.16	6.08±0.97	6.49±0.78	6.09±0.80	
AU (mg/dL)	119.19 ± 29.47	118.10± 27.08	102.40 ± 23.71	118.13 ± 16.35	
CHOL-T (mmol/L)	2.05±0.34	2.40 ± 0.28	2.02 ± 0.17	2.25 ± 0.27	
GGT (U/L)	1.56±0.63	1.60±0.70	1.20±0.63	1.47±0.64	
TG (mmol/L)	0.49 ± 0.38	0.80 ± 0.24	0.62 ± 0.30	0.56 ± 0.27	
CREA (umol/L)	30.63 ± 5.57	33.70 ± 4.92	30.80 ± 3.77	34.73 ± 6.08	
PHOS (mmol/L)	4.78±0.54	4.53±0.51	4.00±0.29	4.70±0.49	
Ca (mmol/L)	2.42±0.38	2.30±0.33	2.30±0.27	2.36±0.28	
Na (mmol/L)	148.75±3.55	149.8±3.28	149.83±5.58	151.66±9.41	
K (mmol/L)	6.37±0.73	6.52±0.64	5.99±0.43	6.31±0.71	
A/G	1.42±0.26a*	1.44±0.16a	1.49±0.24a	1.95±0.81b	

Los valores representan la media de 18 determinaciones ± desviación estándar. * p<0,05: diferencias significativas entre muestreo. Letras iguales: no hay diferencias; letras diferentes: diferencias significativas p<0,05; ALP: fosfatasa alcalina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT; alanino aminotransferasa , ALB: albúmina; PT: proteínas totales; GLUC: glucosa; CHOL-T: colesterol total; TG: triglicéridos; Bil-T: bilirrubina total; AU: ácido úrico; BUN: urea nitrogenada; CREA: creatinina; Ca: calcio; K: potasio; Na: sodio; PHOS: fósforo; índice A/G

Tabla 27. Principales parámetros bioquímicos al cabo de 13 semanas, de ratas (machos) administrados con diferentes dosis de vainillina por vía oral.

Parámetro	Dosis de Vainillina				Rango histórico CENPALAB
	Control	Dosis baja	Dosis media	Dosis alta	
Machos					
ALP (U/L)	371.25 ±161.83	338.60 ±86.89	367.50±136.57	403.71 ± 160.67	66-382
AST (U/L)	137.73±20.73	142.38 ±39.33	155.96±23.82	139.40±21.70	39-283
ALT (U/L)	37.55 ± 6.95	28.04 ± 5.63	40.52 ± 6.16	44.84 ±3.79	21-84
ALB (g/L)	41.78±4.38	40.61±0.96	42.07±3.70	39.57±3.56	
PT (g/L)	69.88 ± 6.90	67.01 ± 3.12	69.94 ± 2.32	69.20 ± 3.68	
Bil-T (µmol/L)	5.32±1.26	4.63±0.94	4.41±0.56	5.54±0.70	
GLUC (mmol/L)	6.41 ± 1.55	5.46 ± 1.31	5.28 ± 1.12	5.87 ± 0.95	
BUN (mmol/L)	5.54±0.82	6.03±0.80	6.66±1.01	6.13±0.40	
AU (mg/dL)	140.0 ± 34.28	119.50 ±24.65	107.40±22.1	131.36±20.03	
CHOL-T (mmol/L)	2.12 ± 0.35	1.96 ± 0.45	2.12± 0.23	2.14 ± 0.16	
GGT (U/L)	1.31±0.70	0.70±0.82	1.40±0.70	1.14±0.66	
TG (mmol/L)	0.46 ± 0.25	0.41 ± 0.15	0.58 ± 0.23	0.60 ± 0.27	
CREA (umol/L)	31.0 ± 4.69	29.90 ± 5.74	29.50 ± 4.03	35.21 ±5.70*	
PHOS (mmol/L)	4.68±0.54	4.27±0.34	4.05±0.27	4.62±0.63	
Ca (mmol/L)	2.41±0.34	2.17±0.28	2.34±0.31	2.42±0.37	
Na (mmol/L)	149.89±4.74	153.29±20.89	148.95±5.75	152.41±13.67	
K (mmol/L)	6.52±0.69	6.58±0.97	6.63±0.81	6.53±0.65	
A/G	1.61±0.62	1.55±0.11	1.54±0.31	1.39±0.35	

Los valores representan la media de 18 determinaciones ± desviación estándar. * p<0,05: diferencias significativas respecto al grupo control. ALP: fosfatasa alcalina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa , ALB: albúmina; PT: proteínas totales; GLUC: glucosa; CHOL-T: colesterol total; TG: triglicéridos; Bil-T: bilirrubina total; AU: ácido úrico; BUN: urea nitrogenada; CREA: creatinina; Ca: calcio; K: potasio; Na: sodio; PHOS: fósforo; índice A/G

La albúmina es la proteína más abundante en sangre y es responsable de buena parte del mantenimiento de la presión osmótica intravascular. Esta sirve como reservorio de almacenamiento de aminoácidos y como transportador de proteínas para los constituyentes del plasma. Las globulinas son una población heterogénea de las proteínas que incluyen la proteína específica del transporte (lipoproteínas para lípidos, haptoglobinas para Hb, etc) mediadores de inflamación, proteínas en fase aguda, enzimas e inmunoglobulinas (Wallace, 2008). El índice de A/G incrementado más un ligero aumento en los valores de ALB para los machos y las hembras del grupo de dosis alta podría tener alguna significación biológica.

En estudios toxicológicos la razón más frecuente para que la concentración de proteínas totales aumente es una baja hidratación de los animales tratados con respecto a los controles. El estado de hidratación se debe considerar para la interpretación apropiada de cambios en concentraciones de la proteína en el plasma (Wallace, 2008).

Las concentraciones de albúminas y globulinas aumentan proporcionalmente cuando ocurre una simple deshidratación, esto puede confirmarse con un aumento de la hemoglobina y el hematocrito (Evans, 2009). El efecto del estado de hidratación en los animales tratados puede o no, ser detectable como deshidratación clínica. Posibles correlaciones clínicas incluye pérdida de fluidos gastrointestinal (vómito, diarrea, excesiva salivación), poliuria y reducción del consumo de agua. El consumo de agua en roedores está estrechamente asociado con el consumo de alimentos, cualquier causa de disminución del consumo de alimentos en roedores es una potencial causa de deshidratación (Wallace, 2008). En el estudio se encontraron heces blandas, diferencias significativas en el consumo de agua y alimentos en varias semanas y el incremento de estas variables bioquímicas comentadas, que nos llevan a pensar que estos hallazgos pudieran estar relacionados con la vainillina.

La determinación de la concentración en sangre de CREA y BUN junto con las mediciones de concentración y volumen de orina, son los ensayos más comunes para evaluar la función renal de un producto, (Wallace, 2008) en el estudio, los valores de CREA están aumentados con respecto a los controles, esto puede estar relacionado

con la sustancia de ensayo, ya que valores de CREA elevado en plasma es un indicador confiable de alteraciones en la filtración glomerular y de un deterioro en el flujo de sangre renal, también un aumento de CREA puede estar influenciado por la disfunción tubular severa (Evans, 2009). Esto se corresponde con los resultados del estudio de toxicidad aguda donde se observó dilatación de los túbulos renales y focos de nefrosis.

La fosfatasa alcalina (ALP) es de las enzimas que reflejan reducciones patológicas en el flujo biliar. En la rata, esta enzima se encuentra en el hígado y el intestino. La fosfatasa alcalina ejerce un papel en la regulación de las actividades secretoras del epitelio biliar intrahepático. El nivel normal de ALP en el suero en la rata es excepcionalmente alto, independiente del crecimiento, y es inusualmente susceptible a las variaciones en la dieta (Wallace, 2008). Por lo que los valores aumentados de ALP no tienen significación biológica en el estudio.

Estos resultados se corresponden con lo encontrado en la literatura científica con ratas administradas con dosis de vainillina de 500 mg/kg de peso corporal/día, mezclada en los alimentos durante 16 semanas, las cuales no manifestaron efectos sobre los parámetros hematológicos. La administración durante un año de esta sustancia en la dieta de ratas, a dosis de 1000 y 2500 mg/kg/día; y durante dos años de dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg diarios, tampoco arrojaron resultados adversos en los parámetros hematológicos y bioquímicos de los animales ensayados (Kirwin y Galvin, 1993).

La tabla 28 describe los cambios macroscópicos que se observaron en el momento de la necropsia para todos los grupos y las lesiones microscópicas descritas al finalizar las observaciones después del periodo de recuperación se encuentran en la tabla 29.

La afección de la mucosa del estómago descrita fue relacionada con estados de gastritis catarral, hemorrágica y fibrinosa que en algunos casos se hicieron acompañar de erosiones, histológicamente las erosiones se clasificaron como superficiales (Anexo 12). Estas erosiones se enmascararon entre la descamación

Tabla 28. Alteraciones macroscópicas descritas durante la necropsia a los 90 días y a los animales del grupo de recuperación.

Sistemas, tejidos y órganos	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Sistema Digestivo								
Estómago glandular								
Mucosa hiperémica, depósito de sangre digerida, enteritis catarral, exudado fibrinoso y erosiones	1	1	1	3	4	1	2	3
Pelos y erosión de la mucosa			1			1		
Sistema respiratorio								
Tráquea								
Edema							1	1
Sistema renal								
Riñones								
Hidronefrosis bilateral						1		1

♀: Machos; ♂: Hembras

Tabla 29. Lesiones microscópicas descritas a los 90 días y al finalizar las observaciones del grupo de recuperación.

Sistemas, tejidos y órganos	Grupo 1		Grupo 4	
	♀	♂	♀	♂
Tráquea				
Hemorragia, congestión de la mucosa y submucosa			1	1
Estómagos				
Descamación epitelial, hemorragia, infiltrada la submucosa de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en la unión del estómago no glandular y glandular	1	1	5	3
Erosión superficial en el estómago glandular			3	1
Hiperplasia glandular		1	1	2
Riñones				
Nefrocalcinosis	1	1	2	1
Hidronefrosis bilateral				1

♀: Machos; ♂: Hembras

epitelial de la mucosa gástrica al parecer causadas por los efectos de la sustancia de ensayo (Anexo 13). En adición a estos cambios hubo una cantidad limitada de células inflamatorias en la mucosa y submucosa de los estómagos.

Los cambios anatomopatológicos macroscópicos y microscópicos observados en el estómago de las ratas parecen estar relacionados con las características físico-químicas de la sustancia de ensayo y las condiciones de temperatura empleada para lograr su disolución. No es el primer estudio con vainillina donde se encuentran daños en el estómago lo que nos lleva a pensar que la vainillina puede tener efecto en el sistema digestivo por su acción irritante (Yu, 2005), y en el estudio de toxicidad aguda se observó ligera hiperqueratosis en la región no glandular y erosión en la mucosa con hiperplasia del epitelio en la región glandular, corroborando los hallazgos encontrados.

Otro hallazgo encontrado fue lo relacionado con la hidronefrosis bilateral y la nefrocalcinosis, los cuales pudieran ser consecuencia de la administración de vainillina. Esto se corresponde con los valores de CREA aumentados en el II muestreo en los machos de dosis alta y la dilatación de los túbulos renales y focos de nefrosis observado en el estudio de toxicidad aguda.

Las lesiones restantes descritas en sistemas y órganos se asumieron como hallazgos de necropsia y no como efectos relacionados con la sustancia de ensayo.

En las tablas 30 y 31 se recogen los pesos relativos de órganos, la media (X) y desviación estándar (DE) por grupos para las hembras y los machos respectivamente. En las hembras como los machos no se observó diferencias significativas ni del peso absoluto ni relativo de órganos.

En las figuras 18 y 19 se observa el comportamiento del peso corporal para las ratas hembras y machos respectivamente, durante la etapa del estudio y después de transcurrido el período de recuperación (17 semanas).

La disminución en los grupos Control y Dosis Alta entre las semanas 13 y 14, observada en la figura 19, es sólo aparente, pues la media del peso corporal de la semana 14 se calculó solo a partir de los animales con los que se conformó el periodo

Tabla 30. Resultados del peso relativo de los órganos de las hembras (g).

Grupos	Bazo	Adrenales	Riñones	Hígado	Ovarios	Timo	Corazón	Pulmón	Encéfalo
Control	0.19	0.021	0.62	2.83	0.040	0.08	0.33	0.38	0.63
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03	0.004	0.03	0.14	0.004	0.03	0.03	0.03	0.06
Dosis baja	0.18	0.021	0.62	2.81	0.041	0.07	0.33	0.38	0.64
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03	0.002	0.03	0.19	0.007	0.02	0.04	0.04	0.06
Dosis media	0.18	0.020	0.63	2.84	0.045	0.08	0.33	0.38	0.65
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.02	0.003	0.03	0.22	0.007	0.02	0.02	0.04	0.06
Dosis alta	0.18	0.023	0.66	2.89	0.044	0.06	0.34	0.42	0.69
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03	0.005	0.08	0.32	0.006	0.02	0.03	0.04	0.06

Letras iguales: no hay diferencias

Letras diferentes: diferencias significativas $p < 0.05$

Tabla 31. Resultados del peso relativo de los órganos de los machos (g).

Animal	Bazo	Adrenales	Riñones	Hígado	Testículo	Timo	Corazón	Pulmón	Encéfalo
Control	0.16	0.012	0.66	2.81	0.34	0.05	0.32	0.31	0.45
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03	0.002	0.04	0.22	0.04	0.02	0.04	0.02	0.05
Dosis baja	0.16	0.011	0.65	2.79	0.33	0.04	0.34	0.33	0.46
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.02	0.002	0.05	0.19	0.03	0.01	0.05	0.04	0.05
Dosis media	0.17	0.012	0.64	2.79	0.34	0.05	0.31	0.33	0.46
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.02	0.001	0.04	0.11	0.04	0.02	0.03	0.03	0.06
Dosis alta	0.16	0.011	0.67	2.86	0.31	0.05	0.31	0.34	0.43
X ± DE	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.02	0.001	0.06	0.17	0.04	0.01	0.04	0.08	0.05

Letras iguales: no hay diferencias

Letras diferentes: diferencias significativas $p < 0.05$

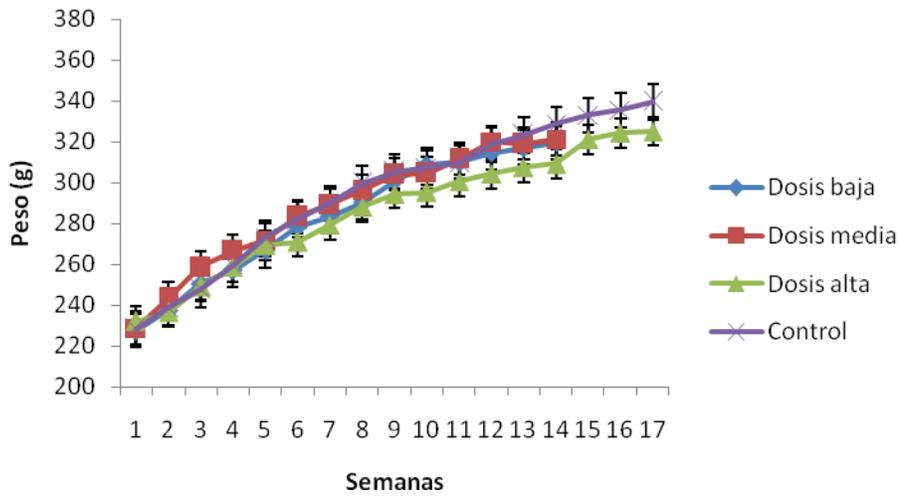


Figura 18. Comportamiento del peso corporal durante 17 semanas de ratas hembras Sprague-Dawley, pertenecientes al grupo satélite. Cada valor es la media de 10 determinaciones \pm desviación estándar.

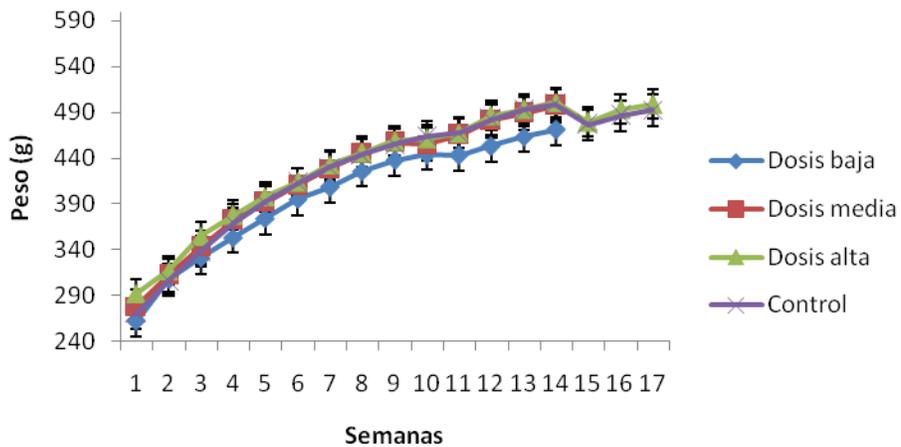


Figura 19. Comportamiento del peso corporal durante 17 semanas de ratas machos Sprague-Dawley, pertenecientes al grupo satélite. Cada valor es la media de 10 determinaciones \pm desviación estándar.

de recuperación, siendo superior a la mostrada por estos mismos animales en la semana 13 (471.23 para el grupo Control, 476.85 para el grupo Dosis Alta). Como se constata en las figuras, los animales tuvieron un crecimiento característico de la especie durante todo el estudio. Además, no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Este resultado sugiere que no hubo ningún efecto toxicológico retardado que afectara el peso corporal después del tratamiento con vainillina por vía oral.

El consumo de agua y de alimentos entre el grupo satélite y el grupo control, fueron similares durante el estudio así como durante el período de recuperación (tabla 32). Como muestran los resultados, al finalizar la etapa de recuperación los animales de uno y otro sexo no tuvieron diferencias significativas en cuanto al consumo de agua y de alimento. Además, estos valores se corresponden con los reportados durante el estudio para la dosis máxima. Las diferencias entre los animales hembras y machos son normales para la especie animal, pues es conocido que las ratas machos consumen más alimentos que las ratas hembras (Auletta, 2002).

Tabla 32. Consumo de agua y alimentos de ratas pertenecientes al grupo satélite tratadas por vía oral con 800 mg/kg de vainillina al cabo del periodo de recuperación.

Parámetro	SEXO			
	Hembras		Machos	
	Control	Satélite	Control	Satélite
Consumo de agua (mL/día)	33,48 ± 3,81	36,24 ± 4,15	44,76 ± 2,58	46,43 ± 5,04
Consumo de alimentos (g/día)	18,37 ± 1,26	17,29 ± 0,67	26,74 ± 1,56	24,62 ± 1,73

Los valores representan la media de 10 determinaciones ± la desviación estándar.

Con respecto a los principales parámetros hematológicos del grupo satélite y del grupo control al finalizar el periodo de recuperación, no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos y en todos los casos se mantuvieron dentro del rango establecido por el CENPALAB para la especie animal. Estos resultados señalan que el periodo post tratamiento de vainillina no produjo cambios en los parámetros hematológicos de los animales de experimentación; lo que también da

indicio de no efectos toxicológicos asociados al período de recuperación después del tratamiento con vainillina.

La CREA, AU y TG de los animales machos analizados luego del período de recuperación, en el grupo de Dosis Alta tomó valores por encima del límite superior del rango establecido a partir de los controles. Se considera que estas variaciones no tienen significación biológica, al no estar asociadas aparentemente a efectos de la sustancia, luego de tres semanas de terminada la administración de la vainillina. Aunque se debe prestar especial atención al aumento de CREA observado, dado que este parámetro es específico de daño renal. A pesar de no encontrarse lesiones renales que justifiquen este aumento, este resultado es interesante por lo que es necesario desarrollar un estudio de nefrotoxicidad para asegurar si la vainillina es causante de daño renal.

Terminado el periodo de recuperación, se sometió a eutanasia a los animales de ambos grupos con el objetivo de observar cambios estructurales en los diferentes órganos y tejidos. No se encontraron alteraciones macroscópicas relacionadas con la administración de la sustancia de ensayo. La comparación de los pesos relativos de los órganos de los animales del grupo satélite y el grupo control también dan indicio de la no toxicidad encontrada en la etapa post tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales al igual que lo referido para los órganos de las dosis experimentales. En el ensayo no se detectaron cambios estructurales ni desarrollo de tumoraciones en los animales de experimentación.

Los estudios toxicológicos de la vainillina demuestran que esta molécula presenta algunos signos y síntomas como la somnolencia y la sedación los cuales son importantes porque hay que referir que fueron encontrados en todos los animales que fueron expuesto a la vainillina, lo que confirma su actividad depresora del sistema nervioso central (Abraham, *et al.*,1997) por lo que recomendamos realizar un estudio de neurotoxicidad. Además de presentar daños en el sistema digestivo por su actividad irritante demostrada en otros estudios (Yu, 2005) y corroborada por nosotros.

Los hallazgos encontrados en las determinaciones hematológicas y bioquímicas en ambos ensayos no son efectos tóxicos significativos asociados a la administración de la sustancia; no obstante las ligeras fluctuaciones que aparecen en los resultados pudieran asociarla a la vainillina. Considerándose efectos reversibles, ya que en el estudio subcrónico no hay muerte asociada a la sustancia.

Esta investigación constituye un aporte para ratificar las cualidades de la vainillina como candidato farmacéutico. La estructura química y la farmacocinética de la vainillina son aspectos importantes que contribuyen a su inocuidad y por tanto, la hacen interesante como candidato farmacéutico, para un tratamiento de una patología que en la actualidad no tiene tratamiento farmacológico efectivo.

Los resultados del presente estudio indican el comportamiento farmacocinético y toxicológico de la vainillina, de la cual se necesita una gran cantidad, para interactuar con el elevado número de moléculas de Hb presentes en el organismo (Mehanna, 2001). Desde el punto de vista biofarmacéutico el diseño de una formulación constituye un reto. Esto obliga a seguir profundizando en futuras investigaciones sobre dicha molécula en relación a la vía de administración que se propone para estudiar su efecto clínico. No existe antagonismo, más bien una complementación de enfoques alternativos para dominar el uso racional de esta molécula. Ello debe además correlacionarse con la conducta observada en clínica en futuros estudios fase I.

CONCLUSIONES

1. Se demostró que la suspensión de CMC al 0,5 % garantiza el nivel de exposición adecuado para realizar los estudios toxicológicos, mientras que la solución hidroalcohólica al 15 % resultó la más efectiva para los estudios farmacocinéticos.
2. Los resultados farmacocinéticos demostraron una rápida distribución de la vainillina a los eritrocitos dada por una k_{12} mayor que la k_{21} , un volumen de distribución compatible con su biodistribución fundamentalmente al compartimento vascular, un tiempo de vida media relativamente pequeño con un rápido aclaramiento.
3. La absorción de la vainillina resulta escasa lo cual se corresponde con la biodisponibilidad obtenida de un 51 %.
4. La vainillina se distribuye en el eritrocito y permanece en el sistema vascular, lo cual denota una escasa internalización a tejidos periféricos.
5. A la dosis única de 2000 mg/Kg la vainillina no provocó muerte en ratas, y según la clasificación establecida por la OECD se considera “**sustancia sin clasificar**”. Aunque se observaron lesiones en estómago y riñón, la pronta recuperación y la ausencia de muertes sugieren que el efecto puede ser reversible a la dosis ensayada.
6. La administración oral repetida de vainillina durante 13 semanas, no produjo cambios significativos en los pesos, consumo de agua y de alimentos, ni indujo cambios en las variables bioquímicas y hematológicas evaluadas de los animales tratados. Evidenciando que la vainillina es segura en administración subcrónica, en las condiciones experimentales.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar en los estudios farmacocinéticos con vistas a confirmar si se produce recirculación enterohepática de la molécula de vainillina en modelos ensayados.
2. Establecer posibles correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de vainillina y los posibles efectos tóxicos.
3. Realizar los ensayos toxicológicos de segunda barrera que permitan contar con la evaluación completa de la molécula.
4. Realizar un estudio de neurotoxicidad *in vivo* por la acción depresora del sistema nervioso que presenta la vainillina.
5. Realizar un estudio de nefrotoxicidad *in vivo* para comprobar los daños observados en los estudios de toxicidad.
6. Completar con los estudios clínicos para que se apruebe el registro e introducción de la vainillina como fármaco antidrepanocítico en el Sistema Nacional de Salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarons L, Graham G (2001) Methodological approaches to the population analysis of toxicity data. *Toxicology Letters* 120: 405–410.
2. Abdala JC. Influence of the Vanillin in the Kinetics of Polymerization of HbS. *Proceedings 36th IUPAC International Congress, 1997, July, Suiza: IUPAC.*
3. 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.
4. Abraham DJ, Harris LS, Meade BJ, Munson AE, Swerdlow PS, Patrick GA, inventors; Virginia Commonwealth University, assignee. Method of calming or sedating an animal with a hydroxy benzaldehyde compound. United State patent 5668182. 1997 Sept 16.
5. Akagi K, Hirose M, Hoshiya T, Mizogushi Y, Ito N, Shirai T. Modulating effect of alligicacid, vanillin and quercetin in rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett*. 1995;(94):113-21.
6. Akihiro T, Takeshi S, Futoshi Y, Hideyuki I. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810. 2011; 170-177.
7. Aldana L. Ensayo de Toxicidad Aguda Oral del 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Vanillina) en ratas Sprague Dawley Cep:SPRD. Código: VAIN0100. 2000
8. Alonso YG, del Toro GG, Falcón JD, Valdés YR. Actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos. *Rev Cubana Farm* 2005; 39(1).
9. Álvarez E, Cabal C, Fernández A, Soler C, Lores M, Toro G del. IE-HPLC and NMR relaxometry demonstrate a potential role for Vanillin in Sickle Cell Disease. *Avances en Biotecnología Moderna* 1997; 4: 65-69.
10. Andersen A. Final report on the safety assessment of benzaldehyde. *Int J Toxicol*. 2006; 25 Suppl 1:11-27.
11. Anklam E, Gaglione S, Muller A. Oxidation behaviour of vanillin in dairy products. *Food Chemistry*. 1997; 60(1):43–51.
12. Arencibia NA, Quintero SY, San Román GE, Svarch E, Gutierrez DA, Machín GS, Gonzalez OA, Serrano MJ, Menéndez VA, Domínguez TM, Delgado VT. Índice hemolítico: una aproximación a los subfenotipos clínicos en niños con drepanocitosis. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2012; 29(1) Juli-Sep.

13. Auletta CS. Acute, Subchronic, and Chronic Toxicology. En: Derelanko MJ, Hollinger MA, editores. Handbook of Toxicology. 2nd edition. CRC press: Taylor & Francis group; 2002.
14. Ballas SK. Management of sickle pain. Current Opinion in Hematology 1997; 4: 104-111.
15. Barghini P, Gioia D, Fava F, Ruzzi M. Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. Microb Cell Fact. 2007;(6):13.
16. Beaudry F, Ross A, Lema P, Vachon P. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in rat model of neuropathic pain. Phytother. Res. (2010) 24: 525-530.
17. Beddell CR. The antisickling activity of a series of aromatic aldehydes. Br. J. Pharmacol 1979; 39: 66-70.
18. Bender G, Florian JA, Bramwell S, Field MJ, Tan KKC, Marshall S, DeJongh J, Bies RR, Danhof M (2010) Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the static allodynia response to pregabalin and sildenafil in a rat model of neuropathic pain. J Pharmacol Exp Ther. 334: 599-608.
19. Beshore G. Sickle Cell Anemia. New York: Oxford University Press; 1994.
20. Bjornson AB. Serotype-specific immunoglobulin G antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in children with sickle cell anemia: Effects of continued penicillin prophylaxis. The Journal of Pediatrics 1996; 129: 828-835.
21. Bloom M. Understanding Sickle cell disease. Mississippi: University Press of Mississippi; 1995.
22. Brenner D.E., Gescher A.J. Cancer chemoprevention: lessons learned and future directions. Br. J. Cancer, (2005) 93: 735–739.
23. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL. Physiological parameters values for physiologically based pharmacokinetic models. Toxicology and Industrial Health 1997; 13: 407-484.
24. Brown, A.P., Dinger, N. & Levine, B.S. Stress produced by gavage administration in the rat. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 39, 17–21 (2000).
25. Bruno R, Washington Carla B, Lu JF, Lieberman G, Banken L, Klein P. (2005) Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients With HER2+ metastatic breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol 56: 361–369.

26. Buchanan G, Vichinsky E, Krishnamurti L, Shenoy S. Severe sickle cell disease – pathophysiology and therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 January ; 16(1 Suppl): S64–S67.
27. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 762-769.
28. Campbell LC, Burton GV, Holcombe RF. Transfusion therapy in sickle cell disease patients. *Journal of the Louisiana State Medical Society* 1993; 5: 515-521.
29. Casaret and Doull's. *Toxicology. The Basic Science of Poison.* Seventh Edition, 2008. p 70-81.
30. Castan L, Del Toro G, Fernández A, González M, Ortiz E, Lobo D. Encapsulación del 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído en liposomas modificados con 1-O-alkilglicerol sintéticos: estudio de su reactividad con el radical DPPH. *Rev Cubana Quím* 2012; XXIV (1):83-90.
31. Charache S y col. Hydroxyurea: Effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* 1992; 79 (10): 2555-2565.
32. Charache S. y col. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Medic* 1995; 332: 1317-1322.
33. Charache S. *Experimental Therapy. Hematology/Oncology Clinics of North América.*1996; 10: 560-67.
34. Clayton GD, Clayton FE. 1993. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 4th ed. New York: John Wiley & Sons.
35. Colombo B, Guerchicoff E, Martínez G. *Genética Clínica de las HbS Humanas.* La Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1993.
36. Davies SC. Fortnightly review: Management of patients with sickle cell disease. *BMJ* 1997; 315: 656-660.
37. Davidson PM, Naidu AS. *Phyto-phenols, Natural Food Antimicrobial Systems.* CRC Press LLC: Washington, DC; 2000.
38. Deacqunita LH, Darryl BH, Aramandla R. Vehicle-Dependent Disposition kinetics of Fluoranthene in fisher-344 rats. *Int.J.Environ.Res. Public Health* 2008, 5(1), 41-48.
39. De Franceschi L, Corrocher R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematological.* 2004;89(3):348-56.
40. Deichmann W, Kitzmiller KV: Toxicity of vanillin and ethyl vanillin for rabbits and rats. *J Am Pharm Assoc.* 1940 (29):425.

41. De Jong K, Larkin SK, Styles LA, Bookchin RM, Kuypers FA. Characterization of the phosphatidylserine-exposing subpopulation of sickle cells. *Blood*. 2001; 98:860-6.
42. De la Iglesia FA. Integration of Toxicology and Pharmacokinetics in drug development; 1992.
43. Del Toro G. La Anemia Drepanocítica: Orígenes, distribución geográfica y fisiopatología. Inhibición de la polimerización de la hemoglobina S y la falciformación de los glóbulos rojos. CD-ROM: Monografías de Excelencia. ISBN: 959-207-012-1. Santiago de Cuba: Editorial Oriente; 2001.
44. Del Toro G. Influencia del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) en la polimerización de la hemoglobina S. *Rev Cubana de Química*. 2002; 14(1): 59-64.
45. Del Toro GG del, Valdés M, Graell R, Falcón JE, Cabal C. Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. *Bioquímica*. 2003; 28: 4-10.
46. Del Toro GG del, Valdés RY, De la Rosa G M, Falcon C V, Cabal M C Actividad antidrepanocítica de la vainillina sobre hematíes de un paciente con drepanocitemia por microscopía electrónica de transmisión. *Bioquímica*. 2004. 29 No 1:5-10
47. Dere E, Boverhof DR, Burgoon LD, Zacharewski TR. In vivo-in vitro toxicogenomic comparison of TCDD-elicited gene expression in Hepa1c1c7 mouse hepatoma cells and C57BL/6 hepatic tissue. *BMC Genomics*. 2006;7:80.
48. Derelanko MJ, Hollinger MA. Handbook of Toxicology. 2nd ed. By Taylor & Francis. 2002.
49. Dick M. Sickle cell disease in childhood. Standards and guidelines for clinical care. UK Forum on Haemoglobin Disorders; 2007.
50. Directive 81/852/EEC as amended (1992) Conduct of Pharmacokinetic Studies in Animals.
51. Dixit R, Riviere J, Krishnan K, Andersen ME. Toxicokinetics and physiologically based toxicokinetics in toxicology and risk assessment. *J Toxicol Environ Health Bm Crit Rev*. 2003;6(1):1-40.
52. Duran S, Karran P. Vainillins-a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acid Res*. 2003;(31):5501-12.
53. Eaton WA, Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Advances in protein chemistry* 1990; 40: 67-175.
54. Eddershaw PJ, Beresford AP, Bayliss MK. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *DDT*. 2000;5(9):409-14.

55. Elander J, Lusher J, Bevan D, Telfer P, Burton B. Understanding the causes of problematic pain management in sickle cell disease: Evidence that pseudoaddiction plays a more important role than genuine analgesic dependence. *J Pain Symptom Management*. 2004;27(2):156-69.
56. Espinosa EM. La anemia drepanocítica en Cuba. Experiencias de 30 años. *Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 1996; 12: 97-105.
57. Evans G.O. *Animal clinical chemistry. A practical guide for toxicologists and biomedical researchers. General Enzymology*, 2nd edition. Taylor & Francis Group, New York. 2009 : 21-22
58. Evertsen J, Johnsen G. In vivo and in vitro differences in chloroplast functionality in the two north Atlantic sacoglossans (Gastropoda, Opisthobranchia) *Placida dendritica* and *Elysia viridis*. *Marine Biology*. 2009; 156(5):847-859.
59. Farthing D, Sica D. High-Performance Liquid Chromatographic method for determination of Vanillin and vanillic acid in human plasma, red blood cells and urine. *Journal of Chromatography B* 1999; 726: 303-307.
60. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Population Pharmacokinetics*. Washington, DC: United States Food and Drug Administration; 1999.
61. Fernández A. Diagnóstico del estado del paciente con anemia de glóbulos rojos falciformes (AHF) por RMN. *Avances en Biotecnología Moderna* 1997; 4: D36.
62. Fernández AJ, Cabrera ZM, Álvarez FO, Prieto JL, Mediaceja VO, Villares AI. Comprehensive care for patients with sickle cell disease in Cuba. *Haematologica*. 2008;93:e20.
63. Feron VJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res*. 1991;(259):363-85.
64. Fraker, P.J. and Speck, J.C. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble Iodogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1978; 80(4), 849-857.
65. Gad SC, Cassidy C, Aubert N, Spainhour B, Heide R. Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species. *Int J Toxicol*. 2006;25(6):499-521.
66. Gad SC. Laws and regulations governing animal care and use in research. En: Gad SC, editor. *Animal Models in Toxicology*. 2nd ed. CRC press: Taylor and Francis group; 2007. p. 901- 17.

67. García Rodríguez F, Rodríguez-Romo LN, Gómez-Peña A, Martínez-González O. Anemias hemolíticas hereditarias desde la perspectiva de un laboratorio de referencia del Norte de México. *Rev Hematol Mex* 2010; 11 (3):136-140.
68. Garg A, Aggarwal BB Nuclear transcription factor- β as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 2002;(16):1053–68.
69. Gaviraghi, G, R.T. Burnaby, M. Pellegatti, Pharmacokinetic Challenges in Lead Optimization, in: B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, 2001, pp. 3–14.
70. Germann, P.G., Ockert, D. Granulomatous inflammation of the oropharyngeal cavity as a possible cause for the unexpected high mortality in a Fischer 344 rat carcinogenicity study. *Lab. Anim. Sci.* 44, 338–343 (1994).
71. Gettys, T.W., Mills, S., Henrickst, D.M. An evaluation of the relation between food consumption rate and equilibrium body-weight in male rats. *British Journal of Nutrition* 60, 151-160, 1988.
72. Goldberg MA. Treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea and erythropoietin. *N Engl J Medic* 1990; 323: 366-372.
73. González C, Olivera L, Trapero Y, Correa A. Estudio Farmacocinético del 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído en perros Beagles por vía oral. *Revista Cubana de Farmacia*. 2002. Volumen 36 ISSN 0034-7515.
74. Griffin T.C, McIntire D, Buchanan GR. High-dose intravenous methylprednisolone therapy for pain in children and adolescents with Sickle Cell Disease. *New Eng. J. Medicine* 1994; 330: 345-348.
75. Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2006; 29, 265–270.
76. Guenette SA, Ross A, Marier JF, Beaudry F, Vachon P. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2007; 562, 60–67.
77. Guideline for testing of chemicals OECD. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method 423 (2001)
78. Guideline for testing of chemicals OECD. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents 408 (1998)

79. Gustafson D.L, Franz H.R, Ueno A.M, Smith C.J, Doolittle D.J, Waldren C.A. Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, N-methyl-N-nitrosoguanidine and mitomycin C but not 137 Cs γ -radiation at the CD59 locus in human-hamster hybrid AL cells. *Mutagenesis*. 2000. 15 (3) 207-213.
80. Guyton A, Hall J. *Textbook of Medical Physiology*, 12th Edition; Pg.chm 2010: 750-54.
81. Hagan CE. Food flavourings and compounds of related structure. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol*. 1967; 5:141-57.
82. Hake CL, Rowe VK, Patty FA editors. *Industrial Hygiene and Toxicology*. 2nd ed. Interscience Publishers, New York (NY). 1963;2:1655-1718.
83. Harris DL, Hood DB, Ramesh A. Vehicle-dependent disposition kinetics of fluoranthene in fisher-344 rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2008; 5(1):41-48.
84. Hecker, R.B., Harris, S., Robert, J. & Otchy, D. Intra-abdominal palpation of a nasogastric tube in the stomach does not assure appropriate placement. *South. Med. J*. 83, 1223–1225 (1990).
85. Hinderling PH. Kinetics of Partitioning and Binding of Digoxin and its Analogues in the subcompartments of Blood. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984; 73(8) August.
86. Hinderling PH. Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacological Reviews*. 1997; 49(3).
87. Hocking MB. 1997. Vanillin: Synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *J Chem Educ* 74:1055_1059.
88. Huang-Brown, K.M, Guhad,F.A. Chocolate, An Effective Means of Oral Drug Delivery in Rats. *Lab Animal Magazine*, 31(10): 34-36, 2002.
89. Hubrecht, R, Kirkwood, J. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and other Research Animals*. Eighth Edition. Volume 1, Terrestrial vertebrates. Part 2, Species kept in the laboratory. John Wiley & Sons, Inc. 2010.
90. IFFACREDO. *Animaux de Laboratoires*. Rat Wistar. Paris.1980: 40-60.
91. Intoxicación por benzaldehídos/[http://www. Pharmaportal.dom.ar/tem_seguridad_08.htm](http://www.Pharmaportal.dom.ar/tem_seguridad_08.htm)./11/06/2007.
92. Jayashree PK, Arna G, Devasagayam TP. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol.Cel.Biochem*. 2000;209(1-2):47-53.

93. Jenner PM, Hagen EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG. Food flavorings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity. *Food Cosmet Toxicol.* 1964 (2):327.
94. Johnson DE, Wolfgang GH. Assessing the Potential Toxicity of New Pharmaceutical. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(4):233-45.
95. Johnson MD, Gad SC. The Rat. En: Gad SC, editor. *Animal Models in Toxicology.* 2nd ed. CRC press: Taylor and Francis group; 2007. p. 147- 275.
96. Jordan L, Swerdlow P, Coates DT. Systematic review of transition from adolescent to adult care in patients with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013; 35(3) April.
97. Kalinyak KA y col. Bone marrow transplantation in a young child with sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1995; 48: 256-261.
98. Kamat JP, Ghosh A, Devasagayam TP. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol Cell Biochem.* 2000; 209(1-2):47-53.
99. Keshava C. Inhibition of Metotrexate-induced chromosomal damage by Vanillin and Chlorophyllin in V79 cells. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis.* 1998;17: 313-326.
100. KetLi Ho, Latifah SY, Norsharina I, Maznah I. Toxicology study of vanillin on rats via oral and intra-peritoneal administration. *Food and chemical Toxicology.* 2011 49: 25-30.
101. Kirwin CJ, Galvin JB. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology.* 4ta ed. New York: London John Wiley & Sons 1993; 2 (A): 445-525.
102. Kim KB, Anand SS, Muralidhara S, Kim HJ, Bruckner JV. Formulation-dependent toxicokinetics explains differences in the GI absorption, bioavailability and acute neurotoxicity of deltamethrin in rats. *Toxicology.* 2007;234 (3):194-202.
103. Kim SJ, Kim MC, Um JY, Hong SH. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules.* 2010 Oct 19; 15(10):7208-17.
104. King A.A, Shaughnessy D.T, Mure K, Leszczynska J, Ward W.O, Umbach D.M, Xu Z, Ducharme D, Taylor J.A, DeMarini D.M, Klein C.B. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutation Research* 616 (2007) 60–69.

105. Korthou H, Verpoorte R. Vanilla. En: Berger RG, editors. *Flavours and Fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Berlin, 2007.
106. Kuhn, E., and Lavielle, M. Coupling a stochastic approximation version of EM with a MCMC procedure. *ESAIM P&S* (2004), 8, 115-131.
107. Kumar SS, Priyadarsini KI, Sainis KB. Inhibition of peroxynitrite-mediated reactions by vanillin. *J Agric Food Chem*. 2004;52(1):139-45.
108. Kumar R, Sharma P K, Mishra S. A Review on the Vanillin derivatives showing various Biological activities. *Int.J.PharmTech Res*. 2012; 4(1):266-279, Jan-Mar.
109. Kutzman RS, Meyer GJ, Wolf AP. Biodistribution and excretion of [11C] Benzaldehyde by the rat after two-minute inhalation exposures. *Xenobiotica*. 1980; (10):281-8.
110. Kwon Y. Nonlinear Pharmacokinetic. En: *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists*. Kluwer Academic Publishers, 2002:175-88.
111. Lai, P.B., Pang, P.C., Chan, S.K. & Lau, W.Y. Necrosis of the nasal ala after improper taping of a nasogastric tube. *Int. J. Clin. Pract*. 55, 145 (2001).
112. Lavielle M. MONOLIX, versión 3.1.0, 2009. Lixoft, Francia, www.lixoft.com.
113. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JN, Lukens JN. *Wintrobe Hematología Clínica*. Ed. Intermédica; 1994 p. 925-58.
114. Lee S-H, Ghim J-L, Song M-H, Choi H-G, Choi B-M, Lee H-M, Lee E-K, Roh Y-J, Noh G-J, (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new reformulated microemulsion and the long-chain triglyceride emulsion of propofol in beagle dog. *Brit J Pharm* 158: 1982-1995.
115. LeFrock, J.L., Clark, T.S., Davies, B. & Klainer, A.S. Aspiration pneumonia: a ten-year review. *Am. Surg*. 45, 305-313 (1979).
116. Lehr, T., Staab, A., Tillmann, C., Trommeshauser, D., Schaefer, H-G., Kloft, C. A quantitative enterohepatic circulation model development and evaluation with tesofensine and meloxicam. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48 (8): 529-542.
117. Liang JA, Wu SL, Lo HY, Hsiang CY, Yun T. Vanillin Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Expression through Down-Regulation of Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol*. 2009; (75):151-7.

118. Lirdprapamongkol K, Kramb JP, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap CH, Dannhardt G, Svasti J. Vanillin Suppresses Metastatic Potential of Human Cancer Cells through PI3K Inhibition and Decreases Angiogenesis in Vivo. *J Agric Food Chem.* 2009;57(8):3055–63.
119. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo, M-K, Saitoh Y, Aozuka Y. Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cell. *Eur J Pharm Sci.* 2005;(25):57-65.
120. Marier, JF Vachon, P, Gritsas A, Zhang J, Moreau, JP, Ducharme, MP. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;(302): 369–73.
121. Maas J, Kamm W, Hauck G. An integrated early formulation strategy – From hit evaluation to preclinical candidate profiling. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 66: 1–10.
122. Makkar HP, Beeker K, Isolation of tannins from leaves of some trees and shrubs and their properties. *J. Agric. Food Chem.* 1994; (42):731–34.
123. Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, Garoui E, Boudawara T, Zeghal N. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. *European Journal of Pharmacology.* 2011; 133-139.
124. Martín MR, Lemus MT, Marcheco BT. El programa cubano de prevención de Anemia Falciforme. Resultados del período 1990-2005. *Rev Cubana Genet Comunit* 2008; 2(2) 59-66.
125. Martínez RT, Martínez MR, Guerra CR, Machaco TA, machín SG, Espinosa EM. Cuestionario para evaluar la calidad de vida relacionada con la salud de adultos con drepanocitosis. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2012; 28 (4) 385-397.
126. Mc Cavit TL. Sickle Cell Disease. *Pediatrics in Review.* 2012; 33(5) May1:195-206
127. Mehanna AS. Sickle Cell Anemia and Antisickling Agents Then and Now. *Curr Med Chem.* 2001; 8(2):79-88.
128. Mentzer WC y col. Availability of related donors for bone marrow transplantation in sickle cell anemia. *Am J Pediatric Hematol/Oncol* 1994; 16 (1): 27-29.
129. MINSAP (2004) Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, Regulación 39/2004.

130. Monolix, versión 3.1, septiembre 2009. INRIA (Institut National de Recherche en Informatique et Automatique) and by the ANR (Agence Nationale de la Recherche), Paris, Francia.
131. Montgomery CH, Curtis J. Pathology of the Fischer Rat. Reference and atlas. Kidney San Diego: Ed Academic Press, Inc. 1990; p151.
132. Morrison B. Organic Chemistry. 2da.ed. La Habana. Ed Revolucionaria; 1987.
133. Mourtzinou I, Konteles S, Kalogeropoulos N, Karathanos VT. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. Food Chem. 2009;114(3):791-7.
134. Muñiz A, Puig A, Cabrera M, Fernández J, Martínez G. Marcadores genéticos en pacientes con anemia drepanocítica de la provincia de Cienfuegos: haplotipos del bloque β y α -talasemia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot 2000; 16 (2): 142-144.
135. Murakami Y, Hirata A, Ito S, Shoji M, Tanaka S, Yasui T, Machino M, Fujisawa S. Reevaluation of cyclooxygenase-2-inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Anticancer Res. 2007;(27): 801–807.
136. Murphy, S.J., Smith, P., Shaivitz, A.B., Rossberg, M.I. & Hurn, P.D. The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 40, 9–12 (2001).
137. Nagel RL, Platt OS. General pathophysiology of sickle cell anemia. En: Steinberg H, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of Hemoglobin. Cambridge University Press; 2001. p. 494-526.
138. O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. Crit Rev Toxicol. 2005; (35):609–62.
139. Olfert, E.D., Cross Brenda M. and McWilliam A. Ann. Canadian Council on Animals Care. Guide to the Care and Use of Experimental animals. 2nd.Ed. Volumen 1. p 173. 1993.
140. Okpala I. Assessment of severity and hydroxyurea therapy in sickle cell disease. En: Okpala I, editor. Practical management of haemoglobinopathies. Oxford: Blackwell; 2004. p. 203-217.

141. Olivera L, González C, Trapero Y, Correa A. Determinación de los niveles de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en plasma. *Revista Cubana de Farmacia*. CUBA FARMACIA 2002 SM (Publicación Soporte Magnético).
142. Opdyke DL. Fragrance raw materials monographs. Vanillin. *Food Cosmetic Toxicol*. 1977; 15:633-38.
143. Pelc, P., Prigogine, T., Bisschop, P. & Jortay, A. Tracheoesophageal fistula: case report and review of literature. *Acta Otorhinolaryngologica Belg*. 55, 273–278 (2001).
144. Persons, D, Nienhuis A. Gene therapy for the hemoglobin disorders: Past, present and future. *PNAS* 2000; 97 (10): 5022-5024.
145. Quinn ChT, Rogers ZR, Mc Cavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood*. 2010; 115 (17): 3447-3452.
146. Reddy PV, Beyaz A, Perry G, Cooke MS, Sayre LM, Smith MA. The Role of Oxidative Damage to Nucleic Acids in the Pathogenesis of Neurological Disease. *Eurekah Bioscience*. 2005; 1(6):535-44.
147. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle cell disease. *Lancet*. 2010; 376 (9757):2018-2031.
148. Reik, A, Milner J, Ryan T, Gregory P, Townes T, Case C. Transactivation of fetal hemoglobin genes by engineered zinc-finger protein transcription factors for the treatment of sickle cell disease. *Mol Therapy* 2004; 9 (Suppl 1): S344.
149. Repetto M. *Toxicología Fundamental*. 3ra ed. Diaz de Santos; 2002.
150. Rhodes, D. C., H. N. Dring, S. A. Blackmer, and H. B. Lewis. 1987. Drug-induced decreases in serum alanine aminotransferase (ALT). *Veterinary Clinical Pathology* 16:12.
151. River Ch. Technical Bulletin. Basic Husbandry and Production Information for Charles River Animals: Sprague Dawley CrI: CD. Vol.1, # 1. Charles River Lab. Inc.Pub. 1992.
152. Roa, D, Kopsombut P, Aguinaga MdP and Turner EA. Hydroxyurea-induced denaturation of normal and sickle hemoglobins in vitro. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 208-213.
153. Roberts I, De Montalembert M. Sickle cell disease as a paradigm of immigration hematology: New challenges for hematologists in Europe. *Haematologica* 2007;92:865-79.

154. Roberts, R.A., Soames, A.R., James, N.H., Gill, J.H. & Wheeldon, E.B. Dosing-induced stress causes hepatocyte apoptosis in rats primed by the rodent nongenotoxic hepatocarcinogen cyproterone acetate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 192–199 (1995).
155. Robert, M.S., Magnusson, B.M., Burczynski, F.J., Weiss, M. Enterohepatic Circulation Physiological, Pharmacokinetic and Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(10): 751-790.
156. Rodríguez WE, Sáenz GF y Cháves MA. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica, *Am J Public Health* 1998; 3 (1): 32-36.
157. Roger H, Hardisty J. Pathology of the Fischer Rat. Reference and atlas. Oral cavity, esofagus and stomach. San Diego: Ed Academis Press, Inc. 1990; p-21.
158. Rogers Z, Buchanan R. Bacteremia in children with sickle hemoglobin C disease and sickle beta⁺-thalassemia: Is prophylactic penicillin necessary?. *The Journal of Pediatrics* 1995; 127: 348-354.
159. Roy A, Ette EI. A Pragmatic Approach to the Design of Population Pharmacokinetic Studies. *The AAPS Journal* (2005) 7: E408-E420.
160. Rupasinghe VHP. Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Research International*. 2006 Jun;39 (5):575-80.
161. Salacinski P R P, McLean C, Sykes J E C, Clement-Jones V V, Lowry P J. *Anal Biochem* 1981, 117: 136-146.
162. Saleh AW, Hillen HFP and Duits AJ. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta haematol* 1999; 102: 31-37.
163. Samson, A., Lavielle, M., and Mentr_e, F. The SAEM algorithm for non-linear mixed models with left-censored data and di_ifferential systems: application to the joint modeling of hiv viral load and cd4 dynamics under treatment (oral presentation). PAGE, Brugge (2006).
164. Samson, A., Lavielle, M., and Mentr_e, F. The SAEM algorithm for group comparison tests in longitudinal data analysis based on nonlinear mixed-effects model. *Stat. in Med.* (2007), 26, 4860-4875.

165. Sans-Sabrafren J, Raebel CB, Corrons JL. Hematología Clínica. 4ta ed. Harcourt; 2001.
166. Savic R M, Mentré F, Lavielle M. Implementation and Evaluation of the SAEM Algorithm for Longitudinal Ordered Categorical Data with an Illustration in Pharmacokinetics–Pharmacodynamics. The AAPS Journal (2011), 13, 45-53.
167. Schauer, P.R., Meyers, W.C., Eubanks, S., Norem, R.F., Franklin, L. & Pappas, T.N. Mechanisms of gastric and esophageal perforations during laparoscopic Nissen fundoplication. Ann. Surg. 223, 43–52 (1996).
168. Schlede E, Mischke U, Diener W, Kayser D. The international validation study of the acute-toxic-class method (oral). Archive of Toxicology 1995;69: 729-734.
169. Serjeant GR. Sickle Cell Disease. 2nd ed. Great Britain: Oxford Medical Publications; 1992.
170. Shaughnessy DT, Setzer RW, DeMarini DM. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA 104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. Mutat Res. 2001;(480-481):55-69.
171. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of population pharmacokinetic parameters from routine clinical data. J Pharmacokinetic Biopharm. 1997;5:445-479.
172. Singh SS. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. Curr Drug Metab. 2006; 7(2):165-82.
173. Sinha AK, Sharma UK, Sharma N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. Int J Food Sci Nut. 2007; 59(4):299-326.
174. Skinner MH, Kuan HY, Skerjanec A, Seger MA, Heathman M, O'Brien L, Reddy S, Knadler MP (2003) Effect of age on the pharmacokinetics of duloxetine in women. Br J Clin Pharmacol 57: 54–61.
175. Slaviero KA, Clarke SJ, McLachlan AJ, Blair EYL, Rivory LP (2003) Population pharmacokinetics of weekly docetaxel in patients with advanced cancer Br J Clin Pharmacol 57: 44–53.

176. Smith DA, Waterbeemd H van, Walker DK. Pharmacokinetics. Mannhold R, Kubinyi Timmerman H, editores. Wiley-VCH Verlag GmbH. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design; 2001.
177. Smith DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in toxicology. *Xenobiotica*. 1997; 27(5):513-25.
178. Spivak JL. The blood in systemic disorders. *Lancet* 2000; 355 (9216): 1707-1712.
179. SPSS Inc. (2002) Statistical Package Scientific System. SPSS 11.5.1 para Windows.
180. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1999; 340 (13): 1021-1030.
181. Strand LP, Scheline RR. The metabolism of vanillin and isovanillin in the rat. *Xenobiotica* 1975; 5, (1): 49-63.
182. Streetly A. Sickle Cell Disease: the case for coordinated information. *Br Med J* 1993; 306: 1490-1491.
183. Suardíaz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio Clínico. La Habana; Editorial Ciencias Médicas: 2004.
184. Suber RL. Clinical Pathology for toxicologist. En: Principles and Methods of Toxicology. Segunda edición, editado por Hayes AW. Raven Press Ltd., New York, 1989.
185. Svarch E. Fisiopatología de la drepanocitosis. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2009; 25 (1) ene-abr.
186. Svarch E, Marcheco BT, Machín SG, Menéndez AV, Nordet IC, Arencibia AN. La drepanocitosis en Cuba. Estudio en niños. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2011; 27 (1) ene-mar.
187. Svarch E. Avances en el estudio integral de la drepanocitosis en el Instituto de Hematología e Inmunología. Resúmenes de la Jornada Científica 45° Aniversario del Instituto de Hematología e Inmunología. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2012; 28 (1) ene-mar.
188. Taylor JM, Jenner PM, Jones WI: A comparison of the toxicity of some allyl, propenyl, and propyl compounds in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1964 (6):378.
189. Tierney Jr, Lawrence MD, Stephen J, Papadakis M. Current medical diagnosis & treatment. New Jersey: Prentice-Hall; 1999. p.435-437.

190. Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VH, Falke HE. Two year drinking-water study of formaldehder in rats. *Food Chem Toxicol* 1989 Feb; 27: 77-87.
191. Tillan J, Cabrera Y. Valores químicos hematológicos de ratas Wistar del CENPALAB y Departamento Control Biológico. Trabajo presentado X Forum de Ciencia y Técnica. 1994.
192. Timbrell J. Principles of Biochemical Toxicology. 3era ed. Taylor & Francis; 2000.
193. Tobe M, Naito K, Kurokawa Y. Chronic toxicity study on formaldehyde administred orally to rats. *Toxicology* 1989 May 31; 56: 79-86.
194. Transporte En Biomembras De Eritrocitos. (2012, July 02). BuenasTareas.com. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Transporte-En-Biomembras-De-Eritrocitos/4696567.html>
195. Troutman, K. Sickle Cell Anemia. Disponible en: <http://w.w.w.chuckiii.com/reports/sickle cell anemia>. [Acuso el 28 de abril del 2003].
196. Tsuda H, Uehara N, Iwahori Y, Asamoto M, Ligo M, Nagao M y *et al.* Chemopreventive effect of carotene, tocoferol and five naturally current antioxidant on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat. *Jpn J Cancer Res.* 1994;(85):1214- 19.
197. Wallace HA. Principles and Methods of Toxicology. 2008. Taylor & Francis; 5th ed.
198. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad, A. Vanillin. *Phytochemistry.* 2003; 63(5):505-15.
199. Walker DK. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;58(6):601-8.
200. Waner, T, and A. Nyska. 1991. The toxicological significance of decreased activities of blood alanine and aspartate aminotransferase. *Veterinary Research Communications* 15:73–78.
201. Waner, T., A. Nyska, E. Bogin, R. Levy, and A. Galiano. 1990. Drug-induced decrease of serum alanine and aspartate aminotransferase activity in the rat, as a result of treatment with oxodipine, a new calcium channel blocker. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 28:25–30.
202. Ware R.E. How I Treat. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood.* 2010 July 1; 115(26): 5300–5311.

203. Weatherall DJ. ABC of clinical haematology: The hereditary anaemias. *Br M J* 1997; 314: 492-498.
204. Weber K, Chevalier H, Honrad D, Allen T. Significado de las lesiones patológicas espontáneas en animales de Laboratorio. Formación continuada. Barcelona 12/13 mayo 1998; p 13-14,78.
205. Wheatley, J.L. A gavage dosing apparatus with flexible catheter provides a less stressful gavage technique in the rat. *Lab Animal Europe*, 2(8):31-34, 2002.
206. Wilburn M. Orthomolecular method of treating Sickle Cell Disease. United States Patent.; 1991.
207. Wilding IR, Bell JA. Improved early clinical development through human microdosing studies. *DDT*. 2005;10 (13):890–894.
208. Woutersen RA, Til HP, Feron VJ, Clary JJ. Evaluation of the oral toxicity of acetaldehyde and formaldehyde in a 4-week drinking-water study in rats. *Food Chem Toxicol* 1988 May;26 : 447-452.
209. Wu SL, Chen JC, Li CC, Lo HY, Ho TY, Hsiang CY. Vanillin improves and prevents trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(2):370-6.
210. Yu L. Vanillin. En: Wexler P, editor-in-chief. *Encyclopedia of toxicology*. 2nd ed. Elsevier Ltd; 2005. p. 418-20.
211. Yu J, Han J-Ch, Hua L-M, Gao Y-J. In Vitro Characterization of Glucuronidation of Vanillin: Identification of Human UDP-Glucuronosyltransferases and Species Differences. *Phytother. Res*. 2012. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ptr.4885.
212. Zaugg RH, Walder JA, Klotz IM. Schiff base adducts of hemoglobin. Modifications that inhibit erythrocyte sickling. *J Biol Chem*. 1977;252(23):8542-8548.
213. Zhang C, Li X, Lian L, Chen Q, Abdulmalik O, Vassilev V, Lai C-S, Asakura T. 2004. Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: An in vivo study using rodents. *Br J Haematol* 125:788_795.
214. Zhu X, Shin WG. Gender differences in pharmacokinetics of oral warfarin in rats. *Biopharm & Drug Dispos*. 2005; 26(4):147-50.

GLOSARIO

AD	Anemia drepanocítica	EV	Endovenosa
ADME	Absorción, distribución, metabolismo, y excreción	FAD	Dinucleotido de flavina-adenina
A/G	Índice A/G	FEMA	Asociación manufacturera de extractos y sabores
ALB	Albúmina	FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
ALP	Fosfatasa alcalina	F _{REL}	Biodisponibilidad relativa
ALT	Alanina amino transferasa	g	Gramo
AOX	Aldehído oxidasa	G1	Grupo tratado
AST	Aspartato amino transferasa	G2	Grupo control
AU	Ácido úrico	H	Hembras
AUC	Área bajo la curva	Hb	Hemoglobina
Bil-T	Bilirrubina total	Hb F	Hemoglobina fetal
BUN	Urea nitrogenada	Hb SS	Hemoglobina S
CCl ₄	Tetracloruro de carbono	HC	Hembras control
CENATOX	Centro Nacional de Toxicología	HCM	Hemoglobina corpuscular media
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio	HTC	Hematocrito
CETEX	Centro de Toxicología Experimental	HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media	HU	Hidroxiurea
CHOL-T	Colesterol total	IBD	Enfermedades inflamatorias del intestino grueso
CIDEM	Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos	IFA	Ingrediente farmacéuticamente activo
C _{máx}	Concentración máxima	Ke	Constante de eliminación
CMC	Carboximetilcelulosa	Kg	Kilogramo
CREA	Creatinina	LC ₅₀	Concentración letal media
CTA	Clases tóxica aguda	LD ₅₀	Dosis letal media o dosis aguda media
CVO	Crisis vasoclusivas	L	Linfocitos
DE	Desviación estándar	MBq	Megabecquerel
dHbS	Desoxihemoglobina S	M	Machos
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético	MC	Machos control
EE.UU	Estados unidos	mg	Miligramo
ETO	Eritrocitos	min	Minutos
ERO	Especies reactivas de oxígeno	mL	Mililitro
E	Eosinófilos	M	Monocitos
		MRT	Tiempo medio de residencia
		N	Neutrófilo

NAD+	Dinucleótido de nicotinamida-adenina oxidada
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organización Mundial de la Salud
PD	Farmacodinamia
PK	Farmacocinética
PLT	Conteo de plaquetas
PNT	Procedimientos normalizados de trabajo
POT	Procedimiento operacional de trabajo
PPM	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
SPSS	Statistical Package Scientific System
$T_{1/2}$	Tiempo de vida media
td	Tiempo de demora
TK	Toxicocinética
T lag	Tiempo de latencia
T_{max}	Tiempo máximo
TMO	Trasplante de médula ósea
TNBS	Trinitrobenzeno sulfónico
X	Media
XO	Xantina oxidasa
%	Por ciento
μCi	Microcurie
μL	Microlitro
UV	Ultravioletas
VCM	Volumen corpuscular medio
Vd	Volumen de distribución
$^{\circ}\text{C}$	Grados celsius
^{125}I	Iodo 125

Anexo 1 Producción científica del autor

1. **Y. Trapero**, G. del Toro. Estudio bibliográfico sobre los principales estudios toxicológicos realizados a diversos agentes antisickling. Anuario científico del Centro de Biofísica Médica, 2001, pág. 34-51, ISBN: 959-207-013-X.
2. **Y. Trapero**, O Arbezun, M. García. Toxicidad Aguda Oral del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en ratas Sprague Dawley. Revista Cubana de Farmacia. Volumen 36 Año 2002. ISSN 0034-7515.
3. **Y. Trapero**, A. Mancebo, Y. González. Toxicidad Aguda Oral del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (4HMB) en conejos albinos Nueva Zelanda. Revista Cubana de Farmacia. Volumen 36, Año 2002. ISSN 0034-7515.
4. C. Gonzalez, L. Olivera, **Y. Trapero**, A. Correa. Estudio Farmacocinético del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en perros Beagles por vía oral y endovenosa. Revista Cubana de Farmacia. Volumen 36 Año 2002. ISSN 0034-7515.
5. **Y. Trapero**, A. Mancebo, Y. González, M. García. Estudio de Toxicidad Aguda oral del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (4HMB) en dos especies. Anuario Científico del Centro de Biofísica Médica, 2003.
6. A. Mancebo, **Y. Trapero**, Y. González et al. Repeated Dose Oral Toxicity (13 weeks) of 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (vanillin) to Sprague Dawley rats. Toxicology Letters. Elsevier. Vol 144 Suppl 1. september 2003
7. **Y. Trapero**, M. Torres, C. Gonzáles, L. Olivera. Evaluación toxicológica aguda en ratas Wistar del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído candidato terapéutico para la Anemia Drepanocítica. Revista Española de Toxicología Volumen 22 Número 2 (2005) pág 99
8. **Y. Trapero**, C. González, L. Olivera, A. Correa. Influencia de vehículos en la farmacocinética a dosis única de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído). Bioquímica Volumen 32, Enero-Marzo 2007
9. **Trapero YM**. Torres MA. Infante JF. Durruthy M. Prado Y. Ensayo Toxicológico a Dosis Repetida (28 días) del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. Revista Cubana de Farmacia Vol 41 (Suplemento especial No.2), Año 2007. Proceedings of III International Congress of Pharmacology and Therapeutics. ISSN 0034-7515

10. **Y. Trapero Quintana**, A. Mancebo Rodriguez, Y. Gonzales Torres, M.A. Torres Alemán, J.F. Infante, M. Durruthy, A. Curbelo Valiente, Y. Prado, A. Remigio Montero. Toxicology and safety of the 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido: Acute, subchronic and reproductive toxicity studies. Toxicology Letters. Volume 196, Supplement 1, Pages S1-S352, S250 (17 July 2010)

11. **Yoagne Trapero Quintana**, Martha Garcia, Lizet Aldana, Maria Antonia Torres Alemán. Influencia del vehículo en la toxicidad aguda oral de la vainillina en ratas Sprague Dawley. Rev Cubana de Toxicología. 2012; 1(2) Julio-Diciembre.

Eventos científicos relacionados con el tema de tesis

1. Jornada de Resultados de investigaciones "Dr. Varan Von Smith in memoriam "Instituto Ciencias Médicas Santiago de Cuba (enero 2002)

2. IV Jornada de toxicología de la Sociedad Cubana de toxicología Filial Oriente. TOXIMED. Santiago de Cuba (septiembre 2002.)

3. XIII Jornada Científico Técnica del Hospital Militar Central Dr. Carlos J. Finlay (septiembre 2002).

4. VIII Congreso de la Sociedad Cubana de Farmacia. V Encuentro Iberoamericano sobre las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. V Seminario Internacional del Profesional Farmacéutico. (15-17 octubre 2002)

5. 17^{ma} Conferencia de Química Universidad de Oriente. Centro de Convenciones Heredia. (4-6 diciembre 2002)

6. 41st Congreso of the European Societies of Toxicology. EUROTOX 2003.Florence. Italy. (September 28-October 1, 2003)

7. XVIII Congreso de la Federación Panamericana de Ciencias Farmacéuticas. XXVIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Ciencias Farmacéuticas Santo Domingo, República Dominicana (25-29noviembre2003)

8. CUBA FARMACIA-ALIMENTOS 2004. VI Encuentro Iberoamericano de las Ciencias farmacéuticas y alimenticias. Palacio de Convenciones Ciudad Habana. Cuba. (21-23 junio 2004)

9. Toxicología 2004. Centro Latinoamericano de eventos médicos CIMEQ. La Habana. Cuba. (23-25 junio 2004).

10. II Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica. V Congreso Nacional de la Sociedad Cubana de Farmacología. II Taller de Farmacovigilancia Habana Vieja (12-15 octubre 2004)
11. II Taller sobre Métodos Alternativos a la Experimentación Animal en América Latina y el Caribe. (Santiago de Cuba 2004)
12. Congreso Internacional Hematología Habana 2005.
13. XVI Congreso Español de Toxicología. Cáceres, España 2005.
14. I Conferencia Internacional de toxicología. III Congreso Nacional de Toxicología TOXICUBA TOXIMED. Santiago de Cuba 2005.
15. Pharmacology 2005: 3^{er} Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica. 6to Congreso Nacional de la Sociedad Cubana de Farmacología. 3^{er} Taller Nacional de Farmacovigilancia. Santiago de Cuba 2005.
16. XI International Congress of Toxicology, Montreal, Canada July 15-19, 2007
17. IX Latin American Symposium of Chronobiology. Ciudad Habana 26-30 Noviembre 2007
18. Toxicología 2007. IV Congreso Internacional de la Sociedad Cubana de Toxicología. Palacio de Convenciones de la Habana, Cuba 5-7 diciembre de 2007.
19. Pharmacology Havana 2007. 3rd Internacional Congreso of Pharmacology and Therapeutics, 7th National Congreso of Cuban Society of Pharmacology, 5th National Workshop of Pharmacoepidemiology, 1st Symposium of Pharmacology Teaching, 1st National Symposium of Pharmacotherapeutics Updatin in Oncology, Ophthalmology and Endocrinology and 1st Symposium Cuba-Canada (Quebec) of Homeopathy. National Hotel of Cuba, Havana, Cuba, 11-14 december, 2007
20. TOXICUBA 2009. II Conferencia Internacional de Toxicología. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) del ISCM de Santiago de Cuba. 18-20 de noviembre 2009.
21. Segunda Jornada Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas CIMEQ. La Habana, Cuba 22-24 Noviembre 2010.
23. CUBAFARMACIA 2012. XI Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas. La Habana. Cuba. Junio 2012

22. Taller Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias 2012. La Habana. Cuba. Julio 2012

23. VII Congreso y la IX Jornada Hematología 2013, III Conferencia del Caribe sobre Drepanocitosis. La Habana. Cuba. Mayo 2013.

Tesis dirigidas

Grado

- “Evaluación de la Toxicidad Oral Aguda del 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehido” Universidad de Oriente. Julio 2000
- “Toxicidad Oral Aguda de agentes antisickling” Universidad de Oriente. Julio 2004
- “Linealidad Farmacocinética del 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehido en perros Beagle.” Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. Julio 2006
- “Toxicidad oral de la vainillina a dosis repetidas: Alteraciones clínicas e histopatológicas en ratas” Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. Julio 2007
- “Evaluación toxicológica a dosis única del 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehido en ratas” Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. Julio 2007

Maestría

- Máster en Toxicología Experimental “Estudios farmacocinéticos y toxicológicos de la vainillina.” Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. Marzo 2010
- Máster en Biotecnología Industrial “Estudios preclínicos de la ortovainillina como agente antidrepanocítico.” Universidad de Oriente. Junio 2012

Anexo 2 Características de la sustancia de prueba

Nombre producto: Vainillina

Nombre químico: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído

Firma: SIGMA

Número CAS: 121-33-5

Lote: 027K0129

Fórmula molecular: 4-(OH)C₆H₃-3-(OCH₃)CHO

Peso molecular: 152.15

Especificaciones organolépticas: polvo blanco

olor característico

Solubilidad: 50 mg/mL en etanol

Pureza: 100%

Metales pesados (en Pb),	no más de 10 ppm
Perdida por desecación,	no más de 0.5%
Residuo de ignición,	no más de 0.05%
Intervalo de fusión	81-83 ° C

Anexo 3. Resultados de la validación del método analítico para la determinación de vainillina en plasma por HPLC.

Los resultados obtenidos en la validación del método analítico muestran:

Coeficiente de determinación (r^2) igual a 0,999, demostrando una alta linealidad en el rango de concentración estudiado. De igual forma los coeficientes de variación para la repetibilidad (3,82 a 7,97 %) y la reproducibilidad (6,18 a 9,35 %) se encuentran dentro del rango establecido (≤ 15 %). El recobrado del método fue alto con un 96,00 y 97,65 % para las concentraciones inferior y superior respectivamente. El límite de cuantificación obtenido fue de 0,08 $\mu\text{g/mL}$ lo que garantiza una buena sensibilidad del método (**Olivera, 2002**).

Anexo 4 Datos originales del peso corporal de los animales del estudio de toxicidad aguda.

Datos originales del peso corporal grupo tratado.

Grupo tratado				
Animales No	Día 0 Peso (g)	Día 7 Peso (g)	Día 14 Peso (g)	Sexo
1	173.4	237.0	278.0	M
2	174.8	243.0	287.2	M
3	174.4	251.0	297.3	M
1	151.0	189.0	206.0	H
2	169.0	211.0	223.0	H
3	149.0	204.0	233.0	H

Datos originales del peso corporal del grupo control

Grupo control				
Animales No	Día 0 Peso (g)	Día 7 Peso (g)	Día 14 Peso (g)	Sexo
1	172.4	231.0	268.0	M
2	172.4	230.0	268.0	M
3	171.0	229.0	270.0	M
1	149.4	179.0	198.9	H
2	148.8	178.8	200.0	H
3	150.0	178.3	201.2	H

Anexo 5. Signos y síntomas clínicos más representativos (Wallace, 2008).

Órganos, tejidos, sistemas o alteraciones más directamente involucradas.	Signos clínicos
Autónomo	Salivación, descarga nasal, diarrea, urinación, piloerección, exoftalmo, membranas nictitantes relajadas, rinorrea.
<u>Comportamiento</u>	Sedación, cabeza caída, posición sentada con cabeza erguida, depresión severa, confusión, inquietud, acicalamiento excesivo, hostilidad excesiva, irritabilidad, actividad bizarra, fiebre.
Sensorial	Reflejo derecho, sensibilidad al dolor, reflejo al dolor, reflejo corneal, reflejo de los miembros posteriores, sensibilidad al sonido y al tacto.
Neuromuscular	Actividad disminuida o incrementada, fasciculaciones, temores, debilidad, reflejo de los miembros posteriores, ataxia, convulsiones, postración, debilidad de los miembros posteriores.
Cardiovascular	Alteración de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción, vasodilatación, hemorragia.
Ocular	Lagrimeo, ptosis, nistagmo, midriasis, miosis, cicloplejía, reflejo pupilar luminoso.
Gastrointestinal	Salivación, náuseas, diarrea, emesis, defecación, evacuaciones sanguinolentas, constipación.
Cutáneas	Piloerección, alopecia, sacudidas, eritemas, edemas, hinchazón, necrosis.

(Wallace, 2008)

Anexo 6 Procedimiento para la preparación de la sustancia de ensayo para el estudio de dosis repetida.

Dosis Baja: 160 mg/Kg de peso corporal

Para la administración de esta dosis se partirá de una solución de 8 mg de vainillina/mL de solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 %.

Tomando como peso promedio de los animales al inicio del ensayo 200 g, y según la fórmula

Volumen = Peso * Dosis / Concentración, el volumen a administrar sería el siguiente:

$$\text{Volumen} = 0.2 \text{ Kg} * 160 \text{ mg/Kg} / 8 \text{ mg/mL} = 4 \text{ mL}$$

Dosis Media: 400 mg/Kg de peso corporal

Para la administración de esta dosis se partirá de una solución de 20 mg de vainillina/mL de solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 %.

Tomando como peso promedio de los animales al inicio del ensayo 200 g, y según la fórmula

Volumen = Peso * Dosis / Concentración, el volumen a administrar sería el siguiente:

$$\text{Volumen} = 0.2 \text{ Kg} * 400 \text{ mg/Kg} / 20 \text{ mg/mL} = 4 \text{ mL}$$

Dosis Alta: 800 mg/Kg de peso corporal

Para la administración de esta dosis se partirá de una solución de 40 mg de vainillina/mL de solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 %.

Tomando como peso promedio de los animales al inicio del ensayo 200 g, y según la fórmula

Volumen = Peso * Dosis / Concentración, el volumen a administrar sería el siguiente:

$$\text{Volumen} = 0.2 \text{ Kg} * 800 \text{ mg/Kg} / 40 \text{ mg/mL} = 4 \text{ mL}$$

En todos los casos se logra uniformidad de volumen, y dentro del margen establecido (1 mL/100 g de peso corporal), ya que la dosis total se administrará fraccionada en dos administraciones, una en la mañana y la otra en la tarde (en este ejemplo, 2 mL en la mañana y 2 mL en la tarde). En los diferentes niveles de dosis, para el cálculo del volumen a administrar, este se ajustará según el peso promedio del grupo de animales, según la fórmula antes mencionada (Volumen = Peso * Dosis / Concentración).

Anexo 7. Valores de concentración plasmática a los diferentes tiempos después de la administración endovenosa en ratas.

Niveles plasmáticos a los diferentes tiempos post-administración endovenosa en ratas; dosis 100 mg/kg.

Tiempo (min)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	DE
0	0	0
1	113.89	34.67
3	40.02	21.17
5	10.88	8.26
10	4.67	3.43
15	0	0

Anexo 8 Datos de concentración plasmática individual de cada animal para cada nivel de dosis del estudio de linealidad cinética.

Parámetros farmacocinéticos de vainillina, en perros Beagle, administración en bolo endovenoso a una dosis de 15 mg /Kg. Análisis no compartimental.

Animal	R ²	Cmax (µg/ml)	Cmax D	AUC _{0-∞} (µg-min/mL)	t _{1/2} (min)	CL (ml/min)	Vz (ml)	Vss (ml)	MRT (min)	AUC D
1	0.9755	50.73	3.38	191.02	2.35	78.52	266.52	281.68	3.58	12.7
2	0.9434	77.2	5.14	238.77	1.76	62.82	160.38	136.05	2.16	15.9
3	0.9944	24.82	1.65	61.38	1.27	244.34	450.13	545.34	2.23	4.1
4	0.9897	23.28	1.58	110.67	2.73	135.52	535.25	571.57	4.21	7.4
5	0.9889	31.12	2.07	68.85	2.39	217.86	752.62	518.13	2.37	4.6
6	0.958	21.71	1.44	91.63	2.93	163.69	693.35	734.70	4.48	6.1
Media	0.975	38.14	2.54	127.05	2.24	150.46	476.38	464.58	3.17	8.5
SD	0.0204	21.91	1.45	71.82	0.61	72.95	232.99	216.88	1.05	4.8
CV %	2.0887	57.45	57.27	56.53	27.58	48.48	48.90	46.68	33.07	56.53

Parámetros farmacocinéticos de vainillina, en perros Beagle, administración en bolo endovenoso a una dosis de 30 mg /Kg. Análisis no compartimental.

Animal	R ²	Cmax (µg/ml)	Cmax D	AUC _{0-∞} (µg-min/mL)	t _{1/2} (min)	CL (ml/min)	Vz (ml)	Vss (ml)	MRT (min)	AUC D
1	0.9885	73.52	2.45	230.67	2.86	130.05	538.36	463.02	3.56	7.7
2	0.9969	68.08	2.26	198.47	2.01	151.15	439.93	548.36	3.62	6.6
3	0.9986	102.12	3.40	376.46	2.50	79.68	288.43	287.71	3.61	12.5
4	0.9779	60.96	2.03	374.14	3.75	80.18	434.03	429.47	5.35	12.5
5	0.9652	65.96	2.19	254.90	4.71	117.69	800.94	677.75	5.75	8.5
6	0.9029	163.32	5.44	613.88	3.93	48.86	277.77	225.09	4.60	20.5
Media	0.9717	88.99	2.96	341.42	3.30	101.27	463.24	438.57	4.41	11.4
SD	0.0359	39.21	1.30	152.78	1.00	38.06	192.89	166.29	0.97	5.10
CV %	3.6978	44.06	44.15	44.75	30.53	41.63	37.58	37.91	21.99	44.75

Cont.

Parámetros farmacocinéticos de vainillina, en perros Beagle, administración en bolo endovenoso a una dosis de 60 mg /Kg. Análisis no compartimental.

Animal	R ²	Cmax (µg/ml)	$\frac{Cmax}{D}$	AUC _{0-∞} (µg-min/mL)	t _{1/2} (min)	CL (ml/min)	Vz (ml)	Vss (ml)	MRT (min)	$\frac{AUC}{D}$
1	0.9999	102.6	1.71	603.27	11.39	99.46	1633.82	804.57	8.09	10.1
2	0.9995	156.2	2.60	794.7	14.07	75.5	1532.68	691.21	9.16	13.2
3	1	113.44	1.89	469.6	2.88	127.77	531.42	600.55	4.7	7.8
4	0.9916	116.6	3.88	905.1	5.17	66.29	494.66	500.71	7.55	15.1
5	0.9758	117.84	1.96	751.78	4.99	79.81	575.09	557.67	6.99	12.5
6	0.855	81.52	1.35	671.85	6.37	89.31	820.17	903.07	10.11	11.2
Media	0.9703	114.7	2.23	699.38	7.48	89.69	931.30	676.3	7.77	11.7
SD	0.06	24.43	0.90	152.93	4.3	21.87	518.65	154.11	1.88	2.54
CV %	5.90	21.3	40.54	21.87	57.54	24.39	55.69	22.79	24.15	21.87

Parámetros farmacocinéticos de vainillina, en perros Beagle, administración en bolo endovenoso a una dosis de 120 mg /Kg. Análisis no compartimental

Animal	R ²	Cmax (µg/ml)	$\frac{Cmax}{D}$	AUC _{0-∞} (µg-min/mL)	t _{1/2} (min)	CL (ml/min)	Vz (ml)	Vss (ml)	MRT (min)	$\frac{AUC}{D}$
1	0.9033	295.67	2.46	2059.68	9.34	58.26	784.78	610.25	10.47	17.2
2	0.9922	223.6	1.86	2489.49	8.37	48.2	581.73	594.11	12.33	20.7
3	0.9760	240.3	2	2802.69	9.48	42.82	585.82	587.75	13.73	23.4
4	0.9720	273.2	2.27	1798.45	8.81	66.72	848.15	715.7	10.73	15.0
5	0.9974	288.3	2.4	2672.3	7.59	44.91	491.44	395.76	8.81	22.3
6	0.9974	191.1	1.59	2087.61	9.74	57.48	807.46	764.41	13.3	17.4
Media	0.9731	252.03	2.09	2318.37	8.89	53.07	683.23	611.33	11.56	19.3
SD	0.04	40.81	0.33	394.87	0.81	9.26	148	127.79	1.88	3.29
CV%	3.68	16.19	16.19	17.03	9.08	17.44	21.66	20.9	16.29	17.03

Anexo 9 Rango de valores normales para el Lab. Control biológico del CIDEM e IFFA

CREDO

Intervalo de valores normales de los indicadores hematológicos.

MACHOS	HEMOGLOBINA (g/dL)	HEMATOCRITO (%)	LINFOCITO S (%)	NEUTRÓFILO S (%)	EOSINÓFILO S (%)	MONOCITOS (%)
Grupo control Lab. C. Biológico (x ± 1.3 DS)	13.7 – 16.8	45 – 48	70 – 83	19 – 30	0.2 – 3.0	0.1 – 2.0
Intervalo normal reportado por Iffa Credo.	14.4 – 16.2	45 – 48	72 – 86	13 – 28	0 - 2	0 – 1
Hembras	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Monocitos (%)
Grupo control Lab. C. Biológico (x ± 1.3 DS)	13.3 – 16.5	42 – 48	72 – 88	18 – 29	0.2 – 2.7	0.1 – 1.7
Intervalo normal reportado por Iffa Credo	14.5 – 16.8	48 – 52	67 – 89	11 – 32	0 – 3	0 – 1

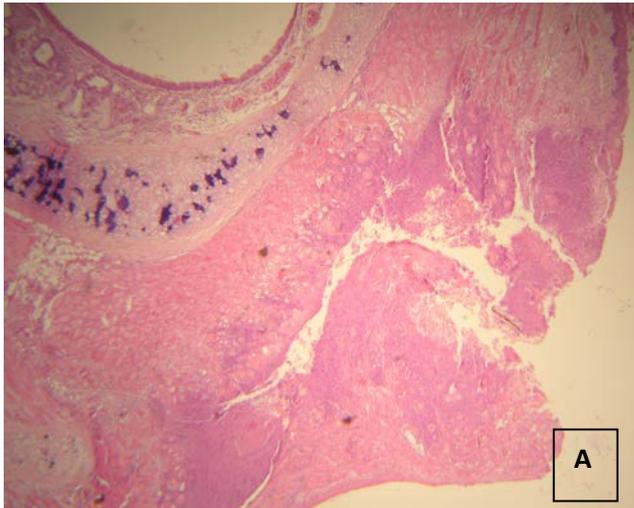
Intervalo de valores normales de los indicadores bioquímicos.

Machos	Glucosa (mmol/L)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	Urea (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)
Grupo control Lab. C. Biológico (x ± 1.3 DS)	3.6 – 5.8	35 – 96	55 – 199	6.0 - 9.1	1.1 – 2.1
Intervalo normal reportado por Iffa Credo.	5.0 – 7.4	38 – 61	128 – 216	4.6 – 6.6	2.2 – 2.8
Hembras	Glucosa (mmol/L)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	Urea (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)
Grupo control Lab. C. Biológico (x ± 1.3 DS)	3.3 – 5.6	24 – 65	46 – 78	5.0 – 9.3	1.1 – 1.9
Intervalo normal reportado por Iffa Credo	5.7 – 6.8	33 – 60	124 – 174	7.1 – 9.6	1.7 – 2.8

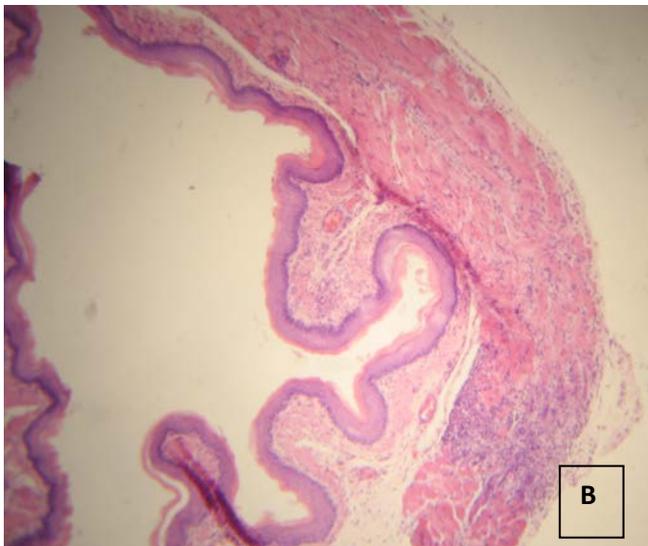
Anexo 10 Observaciones clínico-patológicas de los animales muertos antes de finalizar el estudio de dosis repetida (90 días)

Grupo	No del animal	Fecha de la muerte/ Día del ensayo	Observaciones clínico patológicas
Dosis alta	0704	29/11/2008 Día 64	Muere inmediatamente después de la administración de la sustancia de ensayo, presentando convulsiones y expulsión de líquido espumoso blanquecino por los ollares y la boca. Al cortar los pulmones resumieron abundante líquido espumoso. Edema y enfisema. Hígado: degeneración turbia. Riñones: hemorragias, necrosis de los túbulos proximales. Causa de muerte: Bronco-aspiración de la sustancia de ensayo.
Dosis alta	0803	28/11/2008 Día 61	Animal hallado muerto. Perforación de la faringe. Depósito de la sustancia de ensayo en tejido celular subcutáneo desde la región axilar hasta la 5ta costilla con necrosis. Inflamación hemorrágica y necrosis en la muscular de la tráquea. Pulmones: necrosis y vasos trombosados. Hígado: tumefacción turbia, degeneración vacuolar y hematopoyesis extramedular esplénica. Bazo: congestión aguda de la pulpa roja. Riñón: degeneración turbia. Causa de muerte: Depósito de la sustancia de ensayo fuera del sistema digestivo causante de inflamación, necrosis y proceso septicémico.
Dosis alta	0814	9/12/2008 Día 74	Animal hallado muerto. Perforación de la pared del esófago, reacción inflamatoria de carácter crónico. Pulmón hemorrágico, bronquios mayores con exceso de células descamadas. Estómago distendido con contenido hemorrágico descamación epitelial e infiltrado focal a linfocitos. Hígado: degeneración turbia. Riñones: degeneración turbia y necrosis de los túbulos proximales. Causa de muerte: Depósito de la sustancia de ensayo fuera del sistema digestivo.

Anexo 11. Lesiones traumáticas causadas por la sonda esofágica a los animales muertos en el estudio. Hematoxilina-Eosina, 5X.

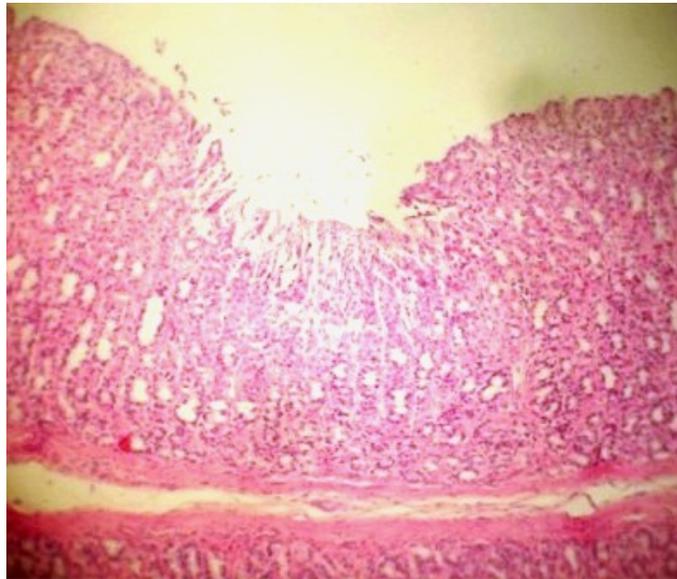


A) Inflamación y necrosis en la tráquea a nivel de la muscular.



B) Inflamación localizada en la muscular del esófago.

Anexo 12. Erosiones observadas en los animales del grupo de dosis alta Hematoxilina-Eosina, 5X.



Anexo 13. Descamación epitelial de la mucosa gástrica. Hematoxilina-Eosina, 5X.

