

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL SULFATO Y DEL CLORURO DE BERBERINA

Edward J. Acero M., Amador Avila T., Luis Granobles P.*, Stella Torres de Young**.

*Universidad Distrital "Francisco José de Caldas". Departamento de Biología. Laboratorio de Histología.

**Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Santafé de Bogotá.

Keywords : Berberine; Toxicity.

RESUMEN

Se realizaron ensayos para determinar la Toxicidad Aguda (LD50) del Sulfato de Berberina en Hamster dorado administrado tópicamente, y del Cloruro de Berberina administrado vía subcutánea. No se halló LD 50 para el Sulfato de Berberina, y la evaluación hemática de Colesterol, Urea y transaminasas ALAT y ASAT no presentó modificaciones. El Cloruro de Berberina manifestó una LD 50/24 horas de 640 mg/kg.; también acción hipoglicémica y a nivel de SNC hubo acción depresora. La evaluación histológica de hígado y piel para cada una de las presentaciones permitió establecer normalidad.

ABSTRACT

Different assays were made in order to investigate the acute toxicity (LD 50) of Berberine. The substance was evaluated in two different presentations, Berberine Sulfate in topic administration and Berberine chloride in subcutaneous administration. No toxic effect was found with Berberine Sulfate, the hematic evaluation of Cholesterol, Urea, transaminasas ALAT and ASAT did not show modifications. The Berberine Chloride shows a LD 50/24 hours of 640 mg/kg., also has hypoglycemic action and a depressive action. The histologic evaluation of liver and skin, was normal for both salts.

INTRODUCCIÓN

La Berberina [5,6-Dihydro-9,10-dimethoxybenzo [g] - 1,3 - benzodioxolo [5,6 - a] quinolizinium; 7, 8,13, 13a - tetrahydro - 9, 10 - dimethoxy-2, 3-(methylenedioxy)] berbinium, es un alcaloide cuaternario (1) que manifiesta actividad antiprotozoaria "In Vitro" contra *P. falciparum*, *E. histolitica* (2) *G. lamblia*, *T. vaginalis* (3) y *L. donovani* en fase promastigote (4) como amastigote (5) e "In Vivo" contra *L. braziliensis panamensis*, *L. donovani* (6) y *L. mexicana mexicana* (7). Antecedentes toxicológicos "In Vivo" y únicos a la fecha datan de 1945 donde se determina que el Cloruro de Berberina intraperitonealmente en cobayos tiene una dosis mínima letal 0.15 g/kg., y mínima tóxica de 0.10 g/kg. manifestando adinamia y pérdida total del apetito; en conejos la dosis mínima letal es de 0.08 g/kg. por vía subcutánea y de 0.06 a 0.08 g/kg. por vía intravenosa, cualitativamente hay miosis, hipotermia excitabilidad de los reflejos luego disminuida; en perros para la sal Sulfato de Berberina la dosis mínima letal es de 0.03 g/kg. cualitativamente hay lagrimeo, salivación, miosis, temblor, hiperapnea (8). No se reporta significancia estadística ni pureza de las sales y con estos perfiles toxicológicos se hicieron búsquedas terapéuticas en leishmaniasis humanas usando subcutáneamente Cloruro de Berberina y tópicamente Sulfato de Berberina (9). En este trabajo se pretendió hacer estudios preliminares de Toxicidad Aguda -Dosis Letal 50- (LD 50) con evaluaciones histológicas de Hígado y Piel, así como de las modificaciones hemáticas de Glucosa, Urea, Colesterol, Transaminasas ALAT y ASAT resultantes de la administración Subcutánea de Cloruro de Berberina y Tópica del Sulfato de Berberina de acuerdo a técnicas toxicológicas contemporáneas de la OMS y la Sociedad Británica de Toxicología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos para el establecimiento de la Toxicidad Aguda (LD 50), fueron seguidos según lo establecido por las normas técnicas de la Organización Mundial de la Salud O.M.S. (10), Sociedad Británica de Toxicología (11) y principios expuestos por Loomis (1982), (12) con las normas de ampliación metodológica establecida por Reed & Muench (1955) e Irwing (1964) (13). El Sulfato de Berberina y Cloruro de Berberina purificados mediante las técnicas cromatográficas de Columna y Capa Delgada fueron suministrados por la Dra. Stella Torres de Young, Investigadora Principal del proyecto «Estudios de los Alcaloides de Especies Nativas del Género *Berberis*» llevado a cabo en el Departamento de Química de la Universidad Nacional. El modelo biológico usado, Hámster dorado macho *Mesocricetus auratus* Cepa (AURA/BINS) de entre 85 y 90

gramos procedente del Bioterio de Experimentación del INS fue manejado en condiciones de Bioterio, de $(60 \pm 5\%)$ humedad relativa, $(22 \pm 2^\circ\text{C})$ de temperatura, con fotoperíodos alternados estrictos de 12 horas luz y oscuridad. Luego de previos ensayos preliminares la evaluación de la LD 50 se hizo suministrando a grupos experimentales de 9 unidades una única dosis fija (Tabla 1) propuesta por la Sociedad Británica de Toxicología (11) así;

Tabla 1. Dosis fijas de Sulfato de Berberina administradas tópicamente y Cloruro de Berberina administradas subcutáneamente a Hámsters dorados *Mesocricetus auratus* en la búsqueda de Dosis Letal 50.

	Sulfato de Berberina por vía Tópica	Cloruro de Berberina por vía Subcutánea
Grupo Experimental 1 -	Dosis I :200 mg/kg.	Dosis I :700 mg /kg.
Grupo Experimental 2 -	Dosis II :400 mg/kg.	Dosis II :1400 mg/kg.
Grupo Experimental 3 -	Dosis III:800 mg/kg.	Dosis III :2800 mg/kg.
Grupo Experimental 4 -	Vehículo Lanolina	Dosis IV :5600 mg/kg.
Grupo Experimental 5 -		Vehículo Propylenglycol

Los animales se observaron durante 24 horas continuas, al cabo de las cuales se hizo una valoración del SNC por el método Test de Irwing. Se determinó la concentración hemática de Glucosa, Urea, Colesterol, Transaminasas ALAT y ASAT usando reactivos línea diagnóstica BOEHRINGER MANNHEIM, con lectura en un espectrofotómetro espectral monorayo digital SPEKOLL 11 Carl Zeiss Jena; debido a los volúmenes manejados en sangre obtenida por punción intracardiaca estas mediciones se hicieron de acuerdo con las modificaciones establecidas por Sarmiento y Col. (1992). (13). Posterior a las 24 horas de dosificación se observaron cada 6 horas y tras sumar 48 horas, se realizó una nueva evaluación del SNC por Test de Irwing. Esta valoración se repitió a los 7 días adjuntándose un nuevo diagnóstico química sanguínea. El análisis numérico de estas variables hemáticas se hizo con métodos de estadística paramétrica ANOVA Y COVARIANZA. Los resultados de mortalidad se reportaron de acuerdo con el método REED-MUENCH (1955) según lo sugerido por Sarmiento y Col. (13). Se sometieron al proceso de disección los animales que durante el periodo de observación murieron, así como los sacrificados al final del ensayo (7 días); se evaluó el estado anatómico macroscópico de todos los órganos con procesamiento histológico particular de piel e hígado; en este, se procedió con la fijación de los órganos en Formaldehído Bufferizado de Fosfatos. La deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina así como la obten-

ción de las láminas con coloración Hematoxilina & Eosina y su respectivo montaje, se hicieron según los protocolos de McManus & Mowry (1964), y Luna (1968) seguidos por Sarmiento y Col. (1992) (13) y el Laboratorio de Histología y Embriología de la Universidad Distrital.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La administración aguda de Sulfato de Berberina por vía tópica, en las dosis experimentadas no presentó Dosis Letal (Tabla 2); según la prueba de "Dosis Fijas" de la Sociedad Británica de Toxicología correspondería al Item -No clasificado.

Por su parte la administración aguda de Cloruro de Berberina por vía subcutánea presentó en un lapso de 24 horas una LD 50 de 640 mg/kg. según su representación por el método Reed - Muench, (figura 1). En la prueba "Dosis Fijas" de la Sociedad Británica de Toxicología correspondería a la clasificación -Moderadamente Tóxico (10).

Las valoraciones de química sanguínea manifiestan para el Sulfato de Berberina (Tabla 3) un descenso de la Glucosa (estadísticamente no

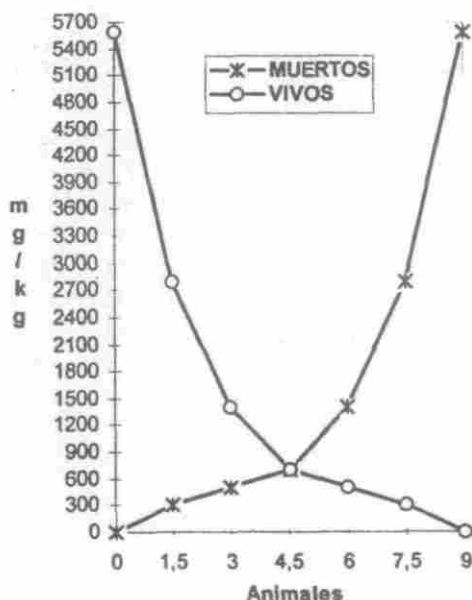


Figura 1. Método Reed Muench en la representación de la LD 50 para el Cloruro de Berberina con administración subcutánea en Hamster dorado *Mesocricetus auratus* = 640 mg/24 horas

significativo $p \leq 0.1$) y en lo que respecta a la concentración hemática de Urea, ALAT, ASAT no hay alteración.

En cuanto a los niveles de Colesterol el Sulfato Berberina no causa variación, pero su incremento (Tabla 4) probablemente es debido a las características propias del Vehículo "Lanolina" que por su constitución química (del tipo Colesterol (14)), contribuye a formar parte del stock de Colesterol hemático por absorción cutánea o por ingesta vía oral en el proceso de acicalamiento de los animales.

El Cloruro de Berberina, manifiesta una actividad hipoglicemiante (Figura 2) estadísticamente representativa ($p \leq 0.05$); se debe probablemente a la vía de administración usada, que garantiza farmacocinéticamente mayor biodisponibilidad que la vía de tópica. En cuanto a la evaluación del Colesterol no sucede nada en particular, (con lo que se asevera que el incremento de colesterol manifestado con la administración tópica del

Tabla 2. Reporte Mortalidad LD 50. Sulfato de Berberina con administración tópica.

DOSIS mg/kg.	VIVOS	MUERTOS	TOTAL % MORTALIDAD
200	9	0	0.0
400	9	0	0.0
800	9	0	0.0
Vehículo	9	0	0.0

Tabla 3. Efecto del Sulfato de Berberina con administración tópica sobre la Glucosa hemática. Valores antes de la Dosificación; Valores 24 horas postdosificación; y Valores 7 Días postdosificación.

Dosis	200 mg/kg.	400 mg/kg.	800 mg/kg.	Vehículo
Antes de la dosificación	132,5	126,38	131,58	128,59
24 Horas postdosificación	116,93	111,87	104,44	129,07
7 Días postdosificación	135,04	132,71	131,37	128,71

Tabla 4. Efecto del Sulfato de Berberina con administración subcutánea sobre el Colesterol hemático. Valores antes de la Dosificación; Valores 24 horas postdosificación y Valores 7 Días postdosificación.

Dosis	200 mg/kg.	400 mg/kg.	800 mg/kg.	Vehículo
Antes de la dosificación	113,7	118,82	111,23	112,13
24 Horas postdosificación	135,63	130,81	144,14	140,84
7 Días postdosificación	112,25	118,43	118,29	120,12

Sulfato de Berberina si se debió al vehículo usado); en la concentración de Urea no hay cambio alguno, esto nos permite extrapolar y apuntar, que la función renal se mantiene en los parámetros de la normalidad; también nos sugiere, que la tasa de formación de Urea es mantenida. El seguimiento de las Transaminasas (Figuras 3 y 4), a las 24 horas postdosificación no tiene modificaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$); la elevación temporal de la Transaminasa ALAT se debe probablemente a una anomalía funcional y de corta duración que no incluye en hígado alteraciones parenquimatosas activas; ya que a los 7 días postdosificación por lo menos en la dosis mas baja experimentada -700 mg/kg.- el nivel de la transaminasa es normal. Para las dosis mayores, no fue posible evaluar su concentración hemática a los 7 días postdosificación debido a la muerte de todos los animales de experimentación. En cuanto al análisis histológico, se sugiere el mismo perfil "no hepatotóxico" mostrado por las Transaminasas ya que en los hígados no hubo ninguna malformación o cambio a nivel anatómico; el análisis microscópico detalló la correcta arquitectura y disposición del lobulillo hepático (Foto 1). No hay alteración o malformación en los cordones hepáticos y además dichos hepatocitos no manifiestan alteraciones en su forma, no hay lisis ni deformaciones al compararlos con las estructuras control. En la vena central se observa con clara disposición, la estructura intacta de su endotelio; de igual forma no se observan anomalías en la estructura y disposición de los sinusoides (Foto 2). En la triada hepática se mantuvo la conformación, en el conductillo hepático hubo normalidad de su epitelio conformante. En la valoración de la piel en cada presentación hay normalidad; correcta disposición en la arquitectura del epitelio en la epidermis, (Foto 3) y en la dermis se destacan las fibras elásticas y colágenas de manera normal inmersas en un formes uniforme, bien irrigado por arterias y venas que preservan su integridad estructural (Foto 4); se observó normalidad en las formas celulares de los fibrocitos.

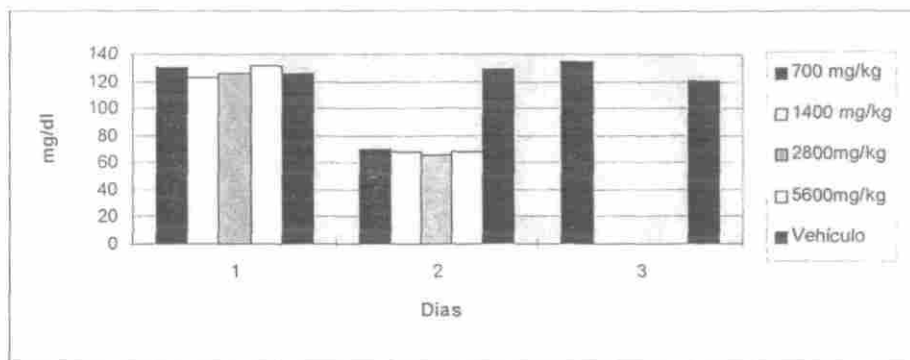


Figura 2. Efecto del Cloruro de Berberina administrado subcutáneamente sobre la Glicemia. Día 1=Valores antes de la Dosificación; Día 2=Valores 24 horas postdosificación; Día 3=Valores 7 Días postdosificación para 700mg/kg y Vehículo. No hay valores de glicemia (Día 3) para las dosis siguientes por muerte de los animales.

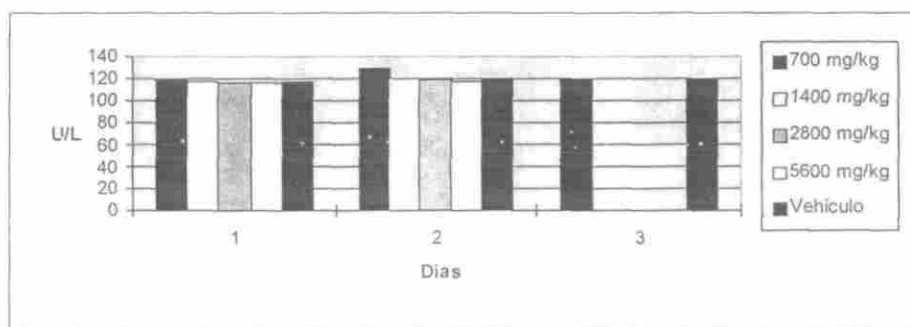


Figura 3. Efecto del Cloruro de Berberina administrado subcutáneamente sobre la Transaminasa ASAT. Día 1=Valores antes de la Dosificación; Día 2=Valores 24 horas postdosificación y Día 3=Valores 7 Días postdosificación para 700 mg/kg. y Vehículo. No hay valores de ASAT (Día 3) para las dosis siguientes por muerte de los animales.

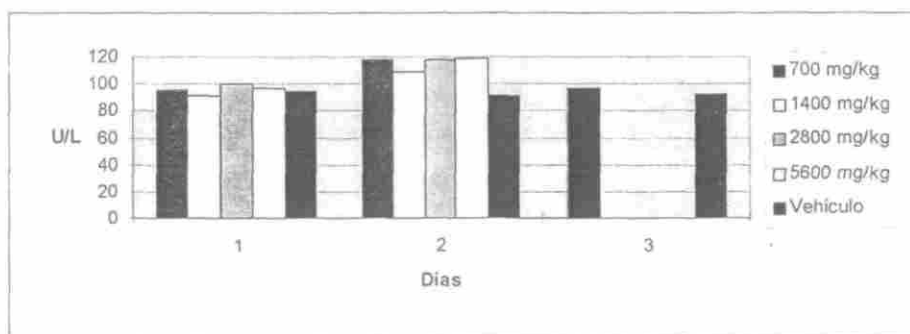


Figura 4. Efecto del Cloruro de Berberina con administración subcutánea sobre la Transaminasa ALAT. Día 1=Valores antes de la Dosificación; Día 2=Valores 24 horas postdosificación; Día 3=Valores 7 Días postdosificación, para 700 mg/kg. y Vehículo. No hay valores de ALAT (Día 3) para las dosis siguientes muerte de los animales.

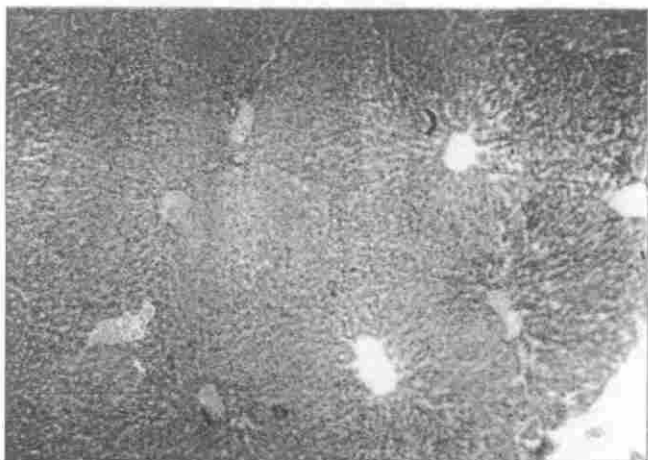


Foto 1. H. & E. 63 X

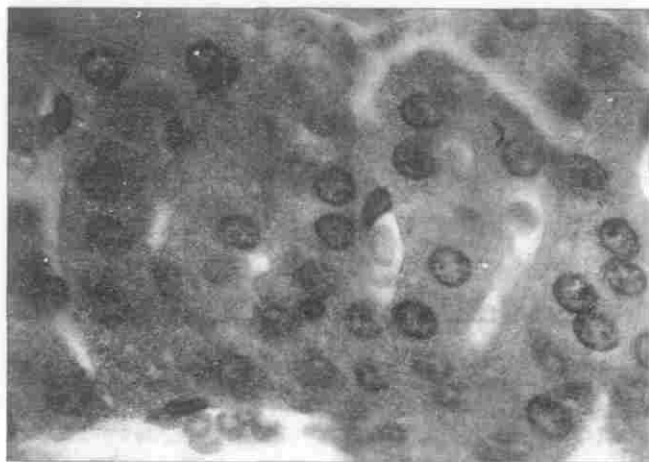


Foto 2. H. & E. 63 X

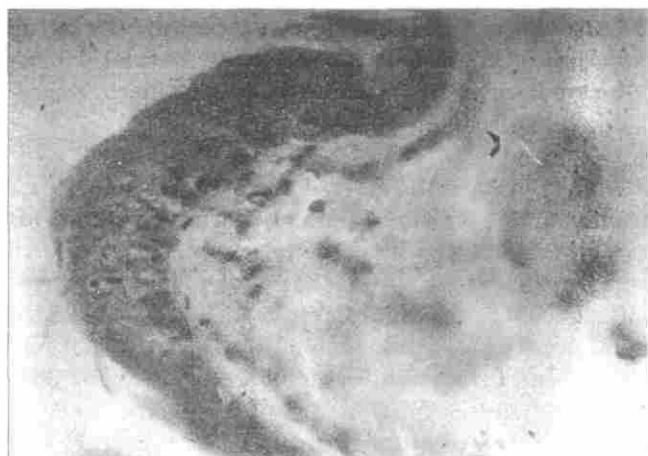


Foto 3. H. & E. 63 X

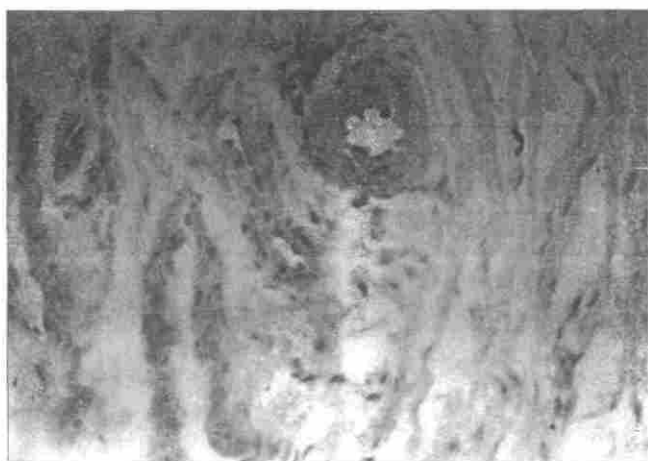


Foto 4. H&E. 635 X

En las valoraciones del Sistema Nervioso Central por Test de Irwing, el Sulfato de Berberina no demuestra actividad en el transcurso del experimento (Tabla 5) y el Cloruro de Berberina manifiesta una fuerte depresión solo a las 24 horas postdosificación (Tabla 6).

Al descartar en estos ensayos preliminares que no se manifiesta hepatotoxicidad, destacamos que la letalidad para el Cloruro de Berberina posiblemente radica en el sinergismo resultante de la acción hipoglicémica y la fuerte acción depresora sobre el sistema nervioso central. En el aspecto del Cloruro de Berberina como hipoglicémico nuestros resultados pueden ser correlacionados con su efecto farmacológico Alfa-2 Adrenérgico Parcial reportado por Hui y Col. (15); como es conocido, las Células Beta del Islote de Langerhans (productoras de insulina) poseen estos receptores Alfa-2 para el agonista fisiológico Norepinefrina (16); así, probablemente al haber una mayor biodisponibilidad del Cloruro de Berberina por su administración subcutánea a diferencia del Sulfato de Berberina en presentación tópica, este podría alcanzar a interactuar con el receptor desencadenando eventos que lleven al resultado hipoglicémico. Con respecto a los efectos depresores de la Berberina, independientes de un efecto potenciador del vehículo, nuestros resultados cualitativos coinciden con Mezey (1945) quien en curies, conejos y perros determinó que la Berberina inyectada por vía intravenosa produce adinamia y abstinencia (signos depresores). Las dosis no letales causaron ligera hipotermia y miosis (signos de actividad depresora sobre el Autónomo). En perros, dosis de 0.0102 g/kg. de peso por vía intravenosa, causa miosis, salivación, temblor del tren posterior, el pulso disminuye y luego se mantiene constante (6).

CONCLUSIONES

1- El Sulfato de Berberina administrado por vía tópica en una dosis máxima de 800 mg/kg. a Hámsters machos *Mesocricetus auratus* no manifiesta Dosis Letal 50 (LD 50). El Cloruro de Berberina administrado por vía subcutánea tiene una Dosis Letal 50 (LD 50/24 horas) de 640 mg/kg. manifestándose así como Moderadamente Tóxico. 2- En Hamster dorado machos *Mesocricetus auratus*, el Sulfato de Berberina vía tópica en dosis de 200 mg/kg., 400 mg/kg. y 800 mg/kg. no demuestra modificaciones estadísticamente significativas de Glucosa hemática y en lo que respecta a la concentración de Colesterol, Urea, ALAT, ASAT no tiene ninguna alteración. El Cloruro de Berberina vía subcutánea en dosis 700 mg/kg., 1400 mg/kg., 2800 mg/kg. y 5600 mg/kg. presenta a las 24 Horas postdosificación fuerte descenso de la glucosa hemática estadísticamente significativo y una temporal variación de aumento de la transaminasa

Tabla 6. Test de Irwing 24 Horas postdosificación para Vehículo y dosis experimentadas en la Toxicidad Aguda (LD50) de Cloruro de Berberina administrado por vía subcutánea en *Mesocricetus auratus*.

DOSIS	Cta. Norm.	CONCIEN	CARACTER	POS	AUTONOMIA			MISC	TONO MUSCULAR	ACT MOT	SNC MOT	INCOR MOT	RFL
					PH	HC	RI						
		4 0 4	0 0 0	0 4 4	0 4 4	0 0 0	4 4 0	0 4 4	0 4 4	0 4 4	0 0 0	0 4 4	
700 mg/kg		3 0 3	0 4 0	0 4 4	0 3 3	0 0 0	4 3 3	0 0 0	4 4 0	4 4 0	0 0 0	1 0 4	4
1400 mg/kg		2 0 2	0 3 0	0 3 4	0 3 3	0 0 1	3 3 3	0 0 0	3 3 0	3 4 3	0 0 0	0 2 0	3 3
2800 mg/kg		1 0 1	0 1 0	0 2 4	0 2 2	0 0 0	2 3 2	0 0 0	2 2 0	2 4 2	0 0 0	0 0 0	2 3
5600 mg/kg		0 0 0	0 0 0	0 4 0	1 1 0	0 0 3	2 2 0	0 0 0	2 1 0	1 4 1	0 0 0	0 0 0	2 2
Vehículo		3 0 4	0 4 0	0 4 4	0 3 4	0 0 0	4 4 0	0 4 4	0 4 4	0 4 4	0 0 0	1 0 4	4

T e s t d e I r w i n g

ALAT; en cuanto a los niveles de Urea y Colesterol no se produce alteración. 3- La administración tópica de Sulfato de Berberina con dosis 200 mg/kg., 400 mg/kg. y 800 mg/kg. y de Cloruro de Berberina con administración subcutánea en dosis 700 mg/kg., 1400 mg/kg., 2800 mg/kg. y 5600 mg/kg. en Hámsters machos *Mesocricetus auratus* no manifiestan anomalías histológicas en hígado y piel.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen la especial colaboración del Dr. José Julian López. Universidad Nacional. Departamento de Farmacia ; Dra. Carmenza Murillo y Dr. Francisco Ruiz. Area de Inmunogenética - INS.; Dr. Luis Eduardo Sarmiento. Departamento de Biología. Universidad Distrital y Dr. Jaime Muñoz . Bioterio de Experimentación - BINS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Merck Index, Ninth Ed., 1976, p.152.
2. Patridge, P. F.; Russel, P. F.; Anderson, M. M.; Wrigth, C. W.; Phillipson, J. D.; Firby, C. Warhust, D. C.; Schiff., P. L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1990, 44,97.
3. Kaneda, Y.; Tanaka, T.; Saw, T. *Journal of Experimental Clinical Medicine*. 1990, 15, 417.
4. Ghosh, A. K.; Rakshit, M. M.; Ghosh, D. K. *Indian Journal of Medical Research*. 1983, 78, 407.
5. Ghosh, A. K.; Battacharyya, F. F; Ghosh, D. K. *Experimental Parasitology*. 1985, 60, 404.
6. Vennestrom, J. L.; Lovelace, J. K.; Waits, V. B.; Hanson, W. L.; Claiman, D. L. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1990, 34, 5.
7. Acero, M. E. J.; Avila, A. T.; Granobles, P. L.; Young , S. T. de.; Nicholls, R. S. *Revista Colombiana de Química*. 1995, 2, 24.
8. K. Mezey. *Anales de la Academia de Medicina de Medellin*. 1945, 1, 385.

9. Hartman, P. C. *Determinación de la Berberina en Berberis rigidifolia H.B.K. y sus aplicaciones en Leishmaniasis*. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Bogotá. 1946. p .23.
10. Organización Mundial de la Salud. (OMS). Tech. Rep. Ser. España. 1975. 413.
11. British Toxicology Society. *Human Toxicology*, 1984, 3, 85.
12. Loomis, T. *Fundamentos de Toxicología*. Ed. Acribia. España. 1982. p . 211.
13. Sarmiento, L. E.; Ramirez, S. P.; Morales, M. S.; Barrera G. S.; Castro, D. C.; Parrado. V. M. *Estudios Preliminares de la Toxicidad Aguda y Subagada del Compuesto L.C .4509*. Universidad Distrital "Francisco José de Caldas". Departamento de Biología. Bogotá. 1991. p. 58.
14. Litter, M. *Farmacología*. Ed. Ateneo. Buenos Aires. 1980. p.879.
15. Hui, K. K.; Yu, L. J.; Chan, A. F. W. *Life Sciences*. 1994, 49, 315.
16. Goodman, A. and Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Ed. Panamericana. Mexico. 1991. p. 133.