



## Dosis letal 50 de lorazepam en ratón (*Mus musculus*) Albino, cepa suizo-icr

*Francisco Alejandro Múnera G, Profesor Asistente, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Miguel Eduardo Martínez S, Profesor Asistente, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Manuel Joaquín Rojas B, Médico Veterinario, Ana Janeth Mora C, Química Farmacéutica, Universidad Nacional de Colombia, Carlos Moreno B, Profesor Titular, Departamento Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.*

### SUMMARY

**Objective:** The lethal dose 50 (LD50) of lorazepam in albino mice (*Mus musculus*), swiss ICR strain, was determined as a first step in the study of the conjoint toxicity of admixtures of scopolamine and benzodiazepines ("new burundanga"). **Method:** Sixty adult male mice were randomly assigned to five experimental groups and to a control one. The dose of lorazepam administered intraperitoneally to each group was: group I, 10 mg kg<sup>-1</sup>; group II, 20 mg kg<sup>-1</sup>; group III, 40 mg kg<sup>-1</sup>; group IV, 80 mg kg<sup>-1</sup>; group V, 160 mg kg<sup>-1</sup>. The control group received only the vehicle solution. Mortality was recorded during 15 days after injection. Necropsies were performed to all the mice dead during the assay and to the survivors. Data were processed using probit analysis and survival analysis. **Results:** Estimated LD50 were 90.71 mg kg<sup>-1</sup>, with 95% confidence range of 65,02 to 150,13 mg kg<sup>-1</sup>. Deaths occurred within the first six days after injection of doses higher than 80 mg kg<sup>-1</sup>, mostly during the first 48 hours. **Conclusions:** The estimated LD50 of lorazepam in this experiment almost doubles the reported one, this finding suggests a higher resistance of the mice strain used in this experiment. The critic period for lorazepam poisoning spans the first 48 hours.

### RESUMEN

**Objetivo:** Como un primer paso para estudiar la toxicidad conjunta de mezclas de escopolamina y benzodiacepinas

("nueva burundanga") se determinó la dosis letal 50 (DL50) del lorazepam en ratones (*Mus musculus*) albinos, cepa suizo ICR. **Método:** Se utilizaron 60 ratones machos adultos, asignados aleatoriamente a cinco grupos experimentales y uno de control. La dosis de lorazepam administrada por vía intraperitoneal a cada grupo fue: 10 mg kg<sup>-1</sup> al grupo I, 20 mg kg<sup>-1</sup> al grupo II, 40 mg kg<sup>-1</sup> al grupo III, 80 mg kg<sup>-1</sup> al grupo IV, y 160 mg kg<sup>-1</sup> al grupo V. Al grupo de control se le administró solamente la solución vehículo. Se registró la mortalidad durante 15 días después de la administración y se realizó necropsia de los animales muertos durante el ensayo y de los supervivientes al final del mismo. Los datos fueron procesados mediante análisis de probit y estimación de la función de supervivencia. **Resultados:** La DL50 estimada fue 90.71 mg kg<sup>-1</sup>, con intervalo de confianza del 95% entre 65,02 y 150,13 mg kg<sup>-1</sup>. La mortalidad se produjo durante los primeros seis días después de la administración de dosis superiores a los 80 mg kg<sup>-1</sup>, siendo mayor en las primeras 48 horas. **Conclusiones:** La DL50 de lorazepam estimada en nuestro estudio es aproximadamente el doble de la reportada, lo cual sugiere una mayor resistencia de la cepa utilizada en este experimento. El período crítico para la intoxicaciones por lorazepam

abarca las primeras 48 horas.

A partir de la década de los 80, la atención de casos de intoxicación por la mezcla de alcaloides antimúscarínicos, especialmente la escopolamina, y fármacos con acción tranquilizante, comúnmente una fenotiazina alifática o una benzodiacepina, ha sido cada vez más frecuente en los servicios de emergencias de las principales ciudades de Colombia (1, 2, 3). Tales intoxicaciones ocurren en dos situaciones particulares: cuando es suministrada subrepticiamente por criminales a sus víctimas potenciales con el propósito de reducir su resistencia y provocar amnesia de lo sucedido; y cuando es consumida voluntariamente por abusadores de sustancias psicotrópicas, quienes consumen semillas secas de "cacao sabanero" (*Datura candida*) - por su propiedades alucinógenas -, concomitantemente con una benzodiacepina (habitualmente flunitrazepam) - con el fin de controlar la exaltación e inquietud que produce el "cacao" (1, 2, 3, 4). Antes de 1980 era común la intoxicación por alcaloides antimúscarínicos aisladamente, los cuales eran denominados genericamente "burundanga", por lo cual se ha decidido llamar "nueva burundanga" a las mezclas mencionadas (1, 2, 3, 4). El cuadro clínico agudo de la intoxicación por "nueva burundanga" es muy variado y com-

prende desde leve somnolencia hasta el coma, encontrándose, con alguna frecuencia, cuadros severos de psicosis tóxica (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Las consecuencias comportamentales a mediano y largo plazo que han sido reportadas anecdotíicamente oscilan desde la amnesia lacunar, hasta la precipitación de psicopatologías severas y permanentes (3, 7).

Su frecuencia, la variedad de su cuadro clínico, la severidad de sus complicaciones a corto y a largo plazo, los costos que genera la atención de las víctimas, por un lado, y la falta de estudios sistemáticos sobre ella, por el otro, motivan la investigación acerca de las bases farmacológicas de la intoxicación por mezclas de tranquilizantes y antimuscarínicos.

El modelo experimental de la intoxicación por "nueva burundanga" que se ha escogido para esta investigación es la administración conjunta de escopolamina y lorazepam a ratones albinos (*Mus musculus*). La escopolamina fue seleccionada por tener marcados efectos antimuscarínicos centrales y pocos efectos periféricos administrada en dosis relativamente bajas (8). El lorazepam, por otra parte, se escogió por su corta vida media, por su metabolismo simple y porque virtualmente carece de efectos antimuscarínicos (9).

El estudio de los efectos tóxicos de una mezcla de fármacos implica la caracterización de su interacción sobre la letalidad, para lo cual es necesario conocer la relación dosis vs letalidad y la dosis letal 50 (DL50) de cada uno de los componentes de la mezcla en el reactivo biológico seleccionado (10). Este artículo presenta los resultados de la determinación experimental de la DL50 del lorazepam en *Mus musculus* albino, cepa suizo-ICR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sujetos.** Se emplearon 60 machos adultos de *Mus musculus* albino, cepa suizo-ICR, de calidad convencional, pro-

cedentes del bioriego de producción del Instituto Nacional de Salud. A su llegada al bioriego de experimentación del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, los sujetos tenían ocho semanas de edad y su peso era de  $30 \pm 2.5$  gramos. Antes de iniciar los experimentos se dejó un período de dos semanas para permitir la adaptación de los sujetos a las condiciones del bioriego de experimentación.

**Diseño experimental.** Se conformaron cinco grupos experimentales (I - V) y uno de control (C), a cada uno de los cuales fueron asignados aleatoriamente diez individuos. A todos los individuos de cada uno de los grupos experimentales se les administró la misma dosis de lorazepam (en  $\text{mg kg}^{-1}$ ), mientras que a los del grupo de control se les administró la solución de vehículo en volumen equiparable a las inyecciones de los grupos de control ( $5\mu\text{l g}^{-1}$ ). La dosis asignada a cada grupo fue: 10  $\text{mg kg}^{-1}$  al grupo I, 20  $\text{mg kg}^{-1}$  al grupo II, 40  $\text{mg kg}^{-1}$  al grupo III, 80  $\text{mg kg}^{-1}$  al grupo IV, y 160  $\text{mg kg}^{-1}$  al grupo V. Estas dosis fueron seleccionadas con base en ensayos preliminares y en la DL50 reportada en la literatura (9).

Preparación de soluciones para inyección. El Lorazepam clorhidrato, USP, suministrado por Laboratorios Wyeth, fue vehiculado en una mezcla a partes iguales de propilenglicol, USP, y polietilenglicol (200), USP. Para administrar a cada animal un volumen de  $5\mu\text{l ml g}^{-1}$ , la solución para inyección correspondiente a cada grupo experimental se calculó para que la dosis por gramo asignada estuviera disuelta en  $5\mu\text{l}$ . Las soluciones así calculadas fueron preparadas y envasadas en viales de 2 ml, dos horas antes de iniciar el experimento. La solución de propilenglicol y polietilenglicol para el grupo control fue preparada y envasada en las mismas condiciones.

**Aplicación.** El día del experimento cada animal fue marcado y pesado. A cada individuo se le inyectó

intraperitonealmente un volumen de  $5\mu\text{l g}^{-1}$  de la solución correspondiente a su grupo, usando una jeringa de insulina con graduaciones de 0.01 ml y aguja # 29.

**Observación y registro de datos.** A partir del momento de la inyección se registró el número de individuos muertos en períodos de 24 horas, hasta completar 15 días de observación. Se hicieron necropsias a todos los individuos muertos durante el estudio (11). Al final del período de observación, se hizo la necropsia a los supervivientes de cada grupo los cuales fueron sacrificados con dosis elevadas de tiopental sódico (11).

**Procesamiento y análisis de datos.** Con base en la mortalidad acumulada durante los 15 días de observación en cada uno de los grupos experimentales, se construyó la curva de la letalidad como función del logaritmo de la dosis. Estos mismos datos experimentales fueron utilizados para determinar, mediante un análisis de probit (12), la ecuación lineal mejor ajustada para expresar la probabilidad de muerte (expresada en unidades probit) en función de la dosis de lorazepam y la DL50 del mismo con un intervalo de confianza del 95%. Con base en la mortalidad diaria registrada en cada grupo experimental y de control, se determinó la función de supervivencia por el método de Kaplan-Meier (13). Las curvas de probabilidad de supervivencia en función del tiempo para cada grupo fueron comparadas entre si utilizando la prueba Logrank (13).

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la mortalidad acumulada al final del período de observación, con base en la cual se construyó la curva de letalidad en función del logaritmo de la dosis, ilustrada en la Figura 1. El análisis total de probit de la probabilidad de muerte (expresada en unidades probit) en función de la dosis de Lorazepam en ratones albinos de la cepa suizo-ICR se ajusta a la expresión lineal:

Tabla 1. Mortalidad acumulada por grupo.

GRUPO	DOSIS (mg kg <sup>-1</sup> )	MORTALIDAD (%)
Control	-	-
I	10	-
II	20	-
III	40	-
IV	80	20
V	160	100

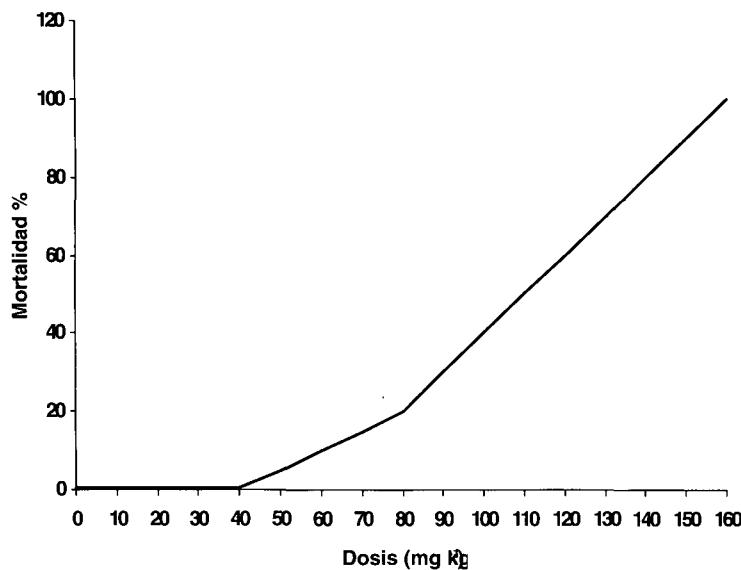


Figura 1. Curva mortalidad vs dosis de lorazepam.

$$\text{Probit de mortalidad} = 3.063698 \text{ (log Dosis)} - 0.9976134,$$

en donde la desviación estándar de la pendiente fue  $\pm 0.6858134$  (Figura 2). La DL50 estimada con base en el análisis total de probit fue  $90.71 \text{ mg kg}^{-1}$ , con un intervalo de confianza del 95% entre  $65.02$  y  $150.13 \text{ mg kg}^{-1}$ .

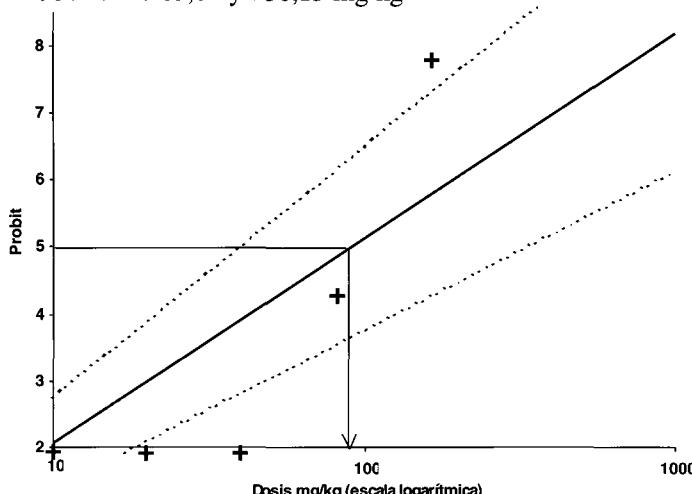


Figura 2. Relación probit vs logaritmo de la dosis de lorazepam. La línea sólida representa la solución de la ecuación de probit en función del logaritmo de la dosis de lorazepam; las líneas punteadas muestran los límites de confianza; la línea delgada con flecha indica la interpolación de la DL50. Las cruces muestran los datos experimentales.

La Tabla 2 y la Figura 3 muestran la función de supervivencia con respecto al tiempo, obtenida por el método de Kaplan-Meier, para diferentes dosis de lorazepam (las dosis más bajas fueron agrupadas bajo el nombre de "40 mg kg<sup>-1</sup> o menos", puesto que en ninguna de ellas se presentó mortalidad). Al comparar globalmente las funciones de supervivencia de todos los grupos según el método Log Rank, se encontró que tales funciones eran significativamente diferentes entre sí ( $\chi^2 = 32.82$ , con 2 grados de libertad,  $p < 0.0001$ ). Al comparar los grupos las funciones de supervivencia de los grupos control, I, II y III entre sí se encontró que no eran comparables por ser idénticas entre sí e iguales a 1. La función de supervivencia del grupo V fue significativamente menor que la del grupo IV ( $\chi^2 = 16.57$ , con 1 grado de libertad,  $p < 0.0001$ ) y que la de todos los demás grupos ( $\chi^2 = 21.89$ , con 1 grado de libertad,  $p < 0.0001$ ). La función de supervivencia del grupo IV, aunque menor, no fue significativamente diferente que la de los grupos con dosis más bajas ( $\chi^2 = 2.11$ , con 1 grado de libertad,  $p = 0.1462$ ).

En ninguno de los individuos muertos durante el ensayo ni en los supervivientes de cada grupo al final del mismo se encontraron anormalidades macroscópicas en la necropsia.

## DISCUSIÓN

La DL50 de la presentación inyectable de lorazepam administrada por vía intraperitoneal reportada originalmente por la sección de toxicología de laboratorios Wyeth es de  $46 \text{ mg kg}^{-1}$  (9), aproximadamente la mitad de la DL50 obtenida en nuestro estudio. El método utilizado para inferir la DL50 no aparece especificado en el reporte de Owen y su equipo. No obstante, si nuestros resultados se usan para estimar la DL50 por otros dos métodos, se obtienen cifras cercanas a las obtenidas con análisis de probit y ambas están dentro del intervalo de confianza especificado. Así, la DL50 estimada con el método de Reed y Muench es  $103.75 \text{ mg kg}^{-1}$  y con el método de Spearman-Karber es de  $98.49 \text{ mg kg}^{-1}$ . Por esto, se puede descartar una diferencia en el procesamiento de datos como explicación de la discordancia en la DL50 entre los dos estudios.

El diseño experimental, en general, es comparable en ambos estudios; sin embargo, en la investigación de Owen y colaboradores se utilizaron ratones de ambos sexos de la cepa Charles River CD y se administró el lorazepam en su forma inyectable. Resulta plausible que la cepa utilizada en el primer ensayo tuviese una mayor susceptibilidad hacia los efectos letales del lorazepam; sin embargo, hay otras causas posibles de esta discrepancia.

Puesto que el grupo de Owen no reporta diferencias significativas en la mortalidad entre sexos, es poco probable que la discrepancia en la DL50 entre ambos estudios sea debida a la diferencia en la conformación de los grupos experimentales.

La presentación inyectable del lorazepam utilizada en el estudio de laboratorios Wyeth estaba vehiculizada en una mezcla de propilenglicol, polietilenglicol y alcohol bencílico, con una

Tabla 2. Función de supervivencia con diferentes dosis de lorazepam.

Grupo	Tiempo (días)	Iniciales	Muertos	Pérdidas netas	Función de supervivencia	Error estándar	Intervalo de confianza del 95%
Control	15	10	0	10	1.0000	-	- - -
≤ 40 mg/kg	15	10	0	10	1.0000	-	- - -
80 mg/kg	3	10	2	0	0.8000	0.1265	0.4087 0.9459
	15	8	0	8	0.8000	0.1265	0.4087 0.9459
160 mg/kg	1	10	5	0	0.5000	0.1581	0.1836 0.7532
	2	5	3	0	0.2000	0.1265	0.0309 0.4747
	4	2	1	0	0.1000	0.0949	0.0057 0.3581
	6	1	1	0	0.0000	-	- - -

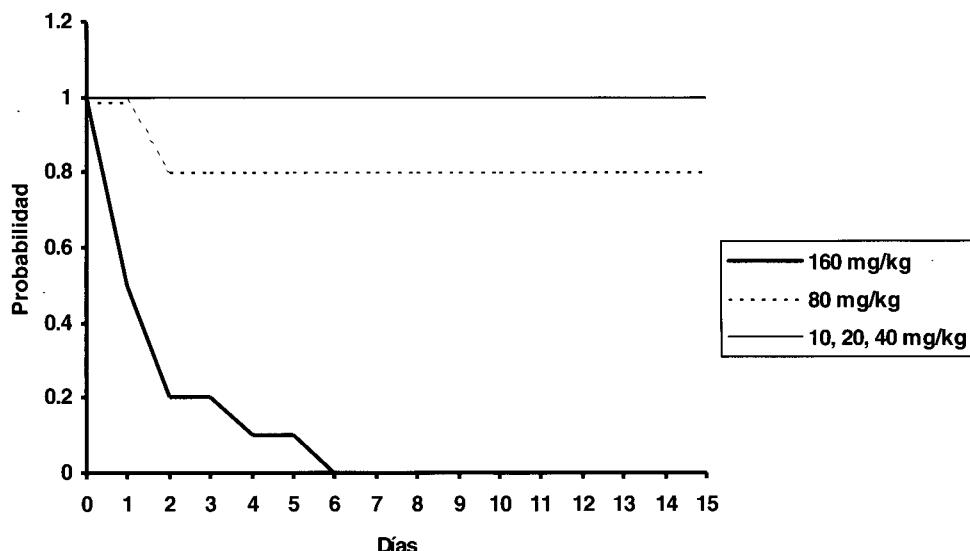


Figura 3. Probabilidad de supervivencia con diferentes dosis de lorazepam.

concentración constante de 5 mg ml<sup>-1</sup>. El uso de concentraciones fijas obliga al uso de cantidades grandes para administrar dosis altas del fármaco; sin embargo, la vía intraperitoneal permite cierta tolerancia a volúmenes grandes de inyección. En cuanto a la composición del vehículo, la única diferencia con respecto a nuestro experimento es la presencia del alcohol bencílico. El alcohol bencílico es muy tóxico para los ratones y potencia, además, el efecto depresor del SNC del lorazepam, como hemos encontrado en algunos de nuestros ensayos preliminares, lo cual podría explicar parcialmente el hallazgo de una DL50 menor. En todo caso, resulta necesario realizar investigaciones dirigidas específicamente a aclarar el motivo de la diferencia entre ambos estudios.

La curva de supervivencia muestra que la mortalidad por dosis altas de lorazepam no es inmediata, sino que se distribuye durante un

período de aproximadamente seis días, siendo mayor en los primeras 48 horas. La mortalidad temprana parece debida directamente a una profunda depresión respiratoria, mientras que la tardía parece determinada indirectamente por la depresión del SNC, ya que los animales, pese a recuperar parcialmente su pauta respiratoria, no pueden movilizarse para alimentarse ni beber y presentan una hipotermia progresiva, lo cual coincide con lo descrito por el grupo de toxicología de laboratorios Wyeth 9. El comportamiento de la curva de supervivencia en ratones puede tener implicaciones clínicas para los casos de intoxicación por lorazepam en humanos, pues sugiere la existencia de un período crítico durante las primeras 48 horas después de la exposición, pasadas las cuales se reduciría drásticamente el riesgo de muerte. En consecuencia, mantener al máximo las medidas de sostén durante este período crítico podría aumentar las probabilidades de sobrevida del paciente.

#### AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestra gratitud a Roberto Pinzón Serrano, Profesor del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y director del proyecto "Búsqueda de principios bioactivos en plantas medicinales de la flora colombiana", por habernos permitido realizar esta investigación en las instalaciones del bioterio de experimentación y a Laboratorios Wyeth Inc. por habernos suministrado lorazepam con calidad USP.

Esta investigación fue financiada por el Comité de Investigaciones y Desarrollo Científico CINDEC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Arévalo C.** Aspectos Toxicológicos de la Burundanga. Medicina 1983; 7: 22-23.
2. **Moreno C, Yomayusa N, Mora-Izquierdo R.** Intoxicación por escopolamina: casos del Instituto de Medicina Legal. Bogotá: Memorias del II Congreso Mundial de Medicina Legal 1990.
3. **Motta G.** Burundanga: Aspectos psiquiátricos. Repercusión social. Rev Col Psiquiatría 1982; 11(4): 489-493.
4. **Uribe C.** Veinte años de toxicología en Colombia. Bogotá: Clínica de Toxicología "Guillermo Uribe Cualla" 1987.
5. **Ardila A, Moreno C.** Scopolamine intoxication as a model of transient global amnesia. Brain and Cognition 1991; 15: 236-245.
6. **Brizer DA, Manning DW.** Delirium induced by poisoning with anticholinergic agents. Am J Psychiatry 1982; 139: 1343-1344.
7. **Drachmann DA.** Memory and cognitive function in man: Does the cholinergic system have a specific role?. Neurology 1972; 27: 783-790..
8. **Heller J.** Atropine, scopolamine, and related antimuscarinic agents. En: **Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P.** (Ed). The pharmacological basis of therapeutics. Eight edition. New York: Pergamon 1990.
9. **Owen G, Hatfield GK, Pollock JJ, Steinberg AJ, Tucker WE, Agersborg HPK.** Toxicity studies of Lorazepam, a new benzodiazepine, in animals. Arzneim Forsch (Drug Res) 1971; 21(7): 1065-1075.
10. **World Health Organization.** Environmental health criteria Nº 6. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Part 1. Ginebra: World Health Organization 1978.
11. **Reinhard JF.** Pharmacological screening. En: Kaplan HM, Brewer NR, Blair WH. The mouse in biomedical research. New York: Academic Press 1982: 313-327.
12. **Finney DG.** Probit analysis. Third edition. London: Cambridge University Press 1971.
13. **Dawson-Saunders B, Trapp RG.** Basic and clinic biostatistics. Second edition. Norwalk: Appleton & Lange 1994.