

ACTIVIDAD "In Vivo" DEL CLORURO DE BERBERINA FRENTE A UNA LEISHMANIASIS CUTANEA CAUSADA POR LA ESPECIE *Leishmania mexicana mexicana* 856/INS

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

*Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Departamento de Biología, A.A. 8668. **Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, A.A. 14490. ***Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Parasitología, Santafé de Bogotá, Colombia.

Keywords: Berberine, *Leishmania mexicana*, Células Gigantes.

RESUMEN

En una leishmaniasis experimental inducida con *Leishmania mexicana mexicana* en hocico de hamsters dorados *Mesocricetus auratus*, después de 30 días post infección tomando como criterio la reducción del área de lesión, dosis de 100 mg/kg. de Cloruro de Berberina intralesionales en los días 30, 33 y 36 tuvieron el mismo efecto antileishmaniásico que el Antimonial Pentavalente "Glucantime", el cual fue administrado de igual modo en dosis de 20 mg/kg/día entre los días 30 a 38. El análisis histopatológico, demostró una proliferación de células gigantes de Langhans en las pápulas tratadas con Cloruro de Berberina.

ABSTRACT

Experimental lesions were induced with *Leishmania mexicana mexicana* in Syrian golden hamsters *Mesocricetus auratus* and 30 days postinfection, 100 mg/kg of Berberine Chloride administrated intralesionally in days 30, 33 and 36 had the same effect that the Antimonial Pentavalent "Glucantime" at 20 mg/kg/day administrated too intralesionally during days 30 at 38. The histopathological analysis showed a proliferation of Langhans'Giants Cells with the Berberine Chloride.

INTRODUCCION

La prevalencia de leishmaniasis para 1994 se calculó en 350 millones de personas en 80 países (1). La Organización Mundial de la Salud calcula que cerca de 12 millones de casos nuevos cada año, se presentan en el mundo (2); sólo en Colombia entre 1985 y 1990 se registraron cerca de 18000 casos nuevos; los Antimoniales Pentavalentes constituyen la primera elección en el quimiotratamiento; cuando fracasan se usa Anfotericina B aunque limitadamente por su apreciable toxicidad (3). Hoy, el conocimiento de la biología molecular de la *Leishmania sp.* y el uso de terapias con productos naturales en zonas endémicas restauran el interés en la medicina tradicional (1). El Cloruro de Berberina (7,8,13,13a tetrahidro-9.10 dimetoxi 2,3 metilendioxiiberbinium) una sal del alcaloide cuaternario Berberina, usado en la medicina tradicional china, ha demostrado *in vitro* ser más efectivo en la inhibición del crecimiento del promastigote de *L. donovani* que la Pentamidina (antimonial pentavalente) a iguales concentraciones (4) y en la fase amastigote *in vitro* e *in vivo*, en *L. donovani* (5) y *L. braziliensis* es igual de efectivo con la ventaja de ser bien tolerado (6). La Berberina también manifiesta actividad *in vitro* contra *P. falciparum* (7), *G. lamblia* y *T. vaginalis* (8) y se reporta como intercalador clásico de alta especificidad con DNA (9) sintético o natural rico en nucleótidos A-T, además de una elevada capacidad para alternar con polímeros de A-T (10), Poly (dG-dC) (11) y con poderosa afinidad con Poly (A) tanto de DNA o de tRNA (12). Farmacológicamente la Berberina tiene actividad como un Alfa 2 Agonista parcial (13) y toxicológicamente es reportado como hipoglicemiante y depresor del SNC (14). En Colombia los únicos antecedentes como fármaco antileishmaniásico datan de 1945 y son los ensayos en humanos diagnosticados con leishmaniasis cutánea y tratados « satisfactoriamente » con diferentes sales de Berberina (15). En este trabajo se determinó en un modelo de ocho días si el Cloruro de Berberina administrado de manera intralesional tiene actividad frente a un cuadro leishmaniasico cutáneo experimental causado por la cepa *Leishmania mexicana mexicana* en hocico de hamsters dorados *Mesocricetus auratus*.

MATERIALES Y METODOS

Los promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* cepa 856/INS cultivada en medio Schneider provienen del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud. Se lavaron con solución fisiológica de 0.85 % de NaCl y fueron contados en un hemocitómetro de NEUBAUER según la metodología descrita por Ghosh y Col. (4). Se concentraron a 1.0×10^7 en un volumen de 0.1 ml de la misma solución fisiológica y se inocularon

en el hocico de hamsters dorados machos *Mesocricetus auratus* cepa AURA/BINS de 90 gramos de peso; a los 30 días postinfección en grupos experimentales de 9 animales se inició dentro de un modelo de ocho días la comparación de la reducción del área lesionada (6) aplicando Antimoniato de Meglumina "Glucantime" intralesionalmente en su dosis estándar de 20 mg/kg/día entre los días 30 a 38 (ocho días); Cloruro de Berberina intralesionalmente en dosis de 100 mg/kg. en los días 30, 33 y 36 de su período de ocho días. La fórmula de medición del área de lesión planteada en el modelo de ocho días por Vennestrom y Col. (1990) es : $A = r_1 r_2 \times 3.1416$; donde A es el área de la lesión; r_1 es el radio mayor del área de la lesión y r_2 es el radio menor del área de la lesión y 3.1416 es igual a π (6). El vehículo del Cloruro de Berberina, una solución 2:1 de PG en agua destilada estéril fue paralelamente evaluado. El fármaco Antimoniato de Meglumina, solución inyectable de Antimonio al 30 % Lote 505271A Glucantime Laboratorios ESPECIAL Rhone Poulenc RORER fue suministrado por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud. El Cloruro de Berberina purificado por técnicas cromatográficas de columna y capa delgada obtenido de la especie *Berberis rigidifolia* HBK proviene del proyecto multinacional "Estudios de los alcaloides de especies nativas del Género *Berberis*" llevado a cabo en el Área de Productos Naturales Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La dosis usada así como la vía de administración surgió del previo establecimiento del rango de seguridad dado por la dosis máxima tolerable resultante de la metodología establecida por REED & MUENCH en el estudio toxicológico por dosis fijas elaborado por Acero y Col. (14). El análisis estadístico se hizo utilizando métodos paramétricos (ANOVA y COVARIANZA). Para evaluar la actividad antileishmaniásica se realizó un análisis histopatológico de las pápulas obtenidas, las cuales se fijaron en solución de formol tamponado con fosfatos; la deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina, la obtención de la lámina con coloración de hematoxilina & eosina y su respectivo montaje se realizó según los protocolos McManus & Mowry y Luna L.G. seguidos por Sarmiento y Col. (16) y el Laboratorio de Histología y Embriología de la Universidad Distrital. En la lectura de la láminas el patólogo no conoció el tratamiento del cual provenía cada pápula.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el modelo de ocho días midiendo la reducción del área de lesión en las leishmaniasis inducidas se pudo observar (ver figura 1) que el Cloruro de Berberina a dosis de 100 mg/kg en tres ocasiones durante un lapso de ocho días tiene igual eficacia que el Antimonial Pentavalente "Glucantime"

aplicado a dosis de 20 mg/kg de manera diaria por el mismo período de tiempo.

Tras observar los componentes del análisis de varianza randomizado, (Tabla 1) valor de la "F" obtenida (2.55) se manifiesta por fuera de la "F" teórica (2.35), con lo cual se acepta que tanto el comportamiento del Glucantime como del Cloruro de Berberina tienen una disminución estadísticamente significativa sobre el área de lesión ($p \leq 0.05$). En la figura 1 se destaca que la solución vehículo del Cloruro de Berberina PG no manifiesta actividad antileishmaniásica, con lo cual se descarta que el efecto de la reducción de las pápulas tratadas con Cloruro de Berberina fuese debido al vehículo.

En el respectivo análisis histopatológico todas las pápulas obtenidas presentaron el mismo diagnóstico: Histiocitoma leishmaniásico en Hamsters, causado experimentalmente en el hocico; más su descripción microscópica manifiesta en las pápulas tratadas con Glucantime (control

Comportamiento del Área de Lesión

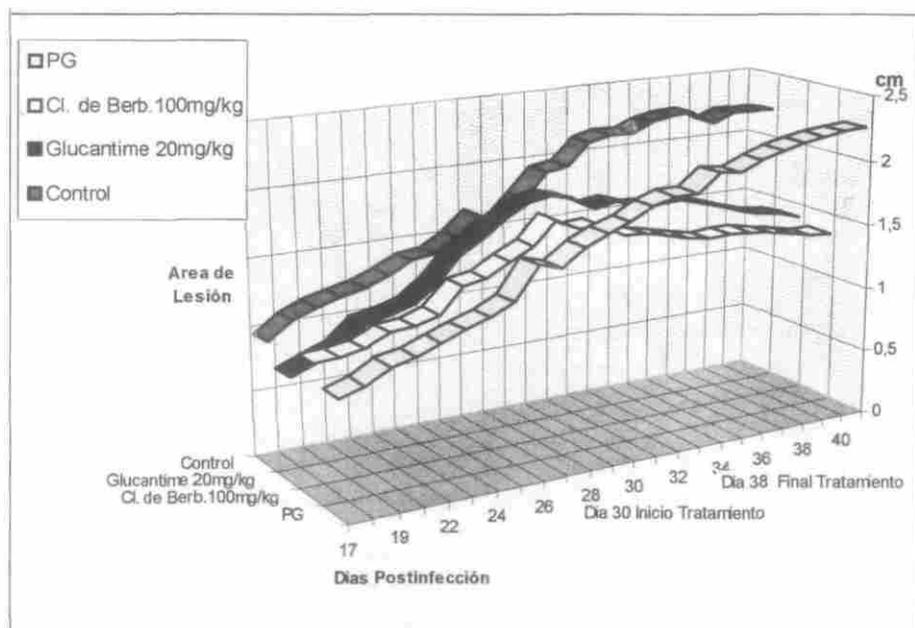


Figura 1. Comportamiento en un modelo de ocho días de las áreas de pápulas leishmaniásicas cutáneas experimentalmente indicidas con *Leishmania mexicana mexicana* Cepa 856 INS en hocico de hamsters *Mesocricetus auratus* por administración intralesional de Glucantime 20 mg/kg/día y Cloruro de Berberina 100 mg/kg/ en tres ocasiones.

Tabla 1. Componentes del análisis de varianza randomizado.

Fuente	Grado de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Tratamiento	3	3.140	1.046	2.5578
Error	96	39.287	0.4092	
Total	99	42.427	—18742.1	

de referencia foto 1) necrosis extensa y macrófagos en gran cantidad; existen plasmocitos y el histiocitoma tiene macrófagos vacuolados con abundantes amastigotes; por su parte en las pápulas control blanco (fotos 2 y 3) se observó infiltrado masivo y difuso de macrófagos vacuolados con enorme número de amastigotes; se diagnosticó absceso con necrosis e infección secundaria.

En las pápulas tratadas con Cloruro de Berberina (fotos 4 y 5) se evidencia una importante y novedosa proliferación de Células Gigantes de inducción inmunológica, (obsérvese la distribución periférica de los núcleos (17)) cuya presencia en el granuloma manifiestan resistencia a las leishmaniasis; se destaca también un tejido

más compacto con evidente disminución de la proliferación de macrófagos espumosos y a su vez un número menor de amastigotes por macrófago; hay así mismo muchas células inflamatorias, linfocitos y plasmocitos (clara respuesta inmune no observada en la histopatología de las pápulas control blanco) pero todavía quedan macrófagos con amastigotes.

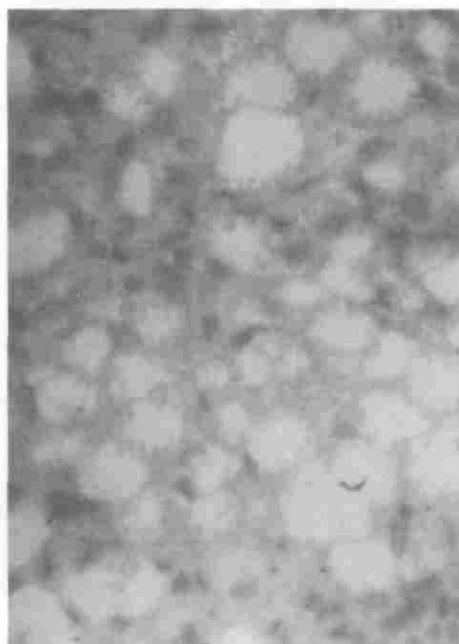


Foto 1. H. & E. 250 X

No hay reportes de la relación *Leishmania mexicana mexicana* Berberina-Células Gigantes aquí manifiesta; la única correlación con la cual además hipotetizamos el efecto inhibitorio del Cloruro de Berberina sobre la reducción de amastigotes en los macrófagos, (relación *Leishmania sp*-Berberina-Macrófago) podría basarse en la acción moderadamente inhibitoria

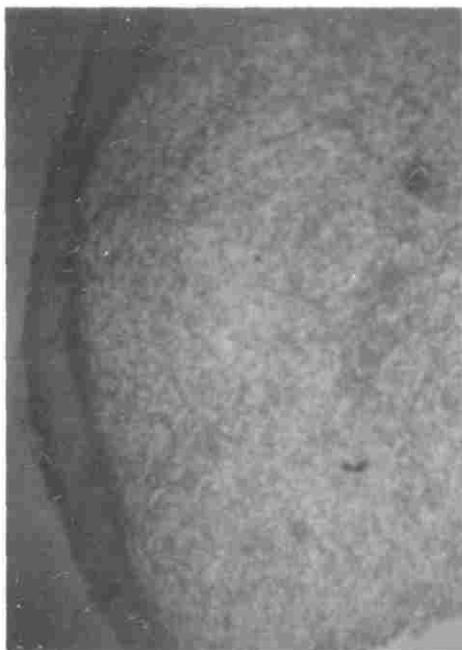


Foto 2. H. & E. 63 X

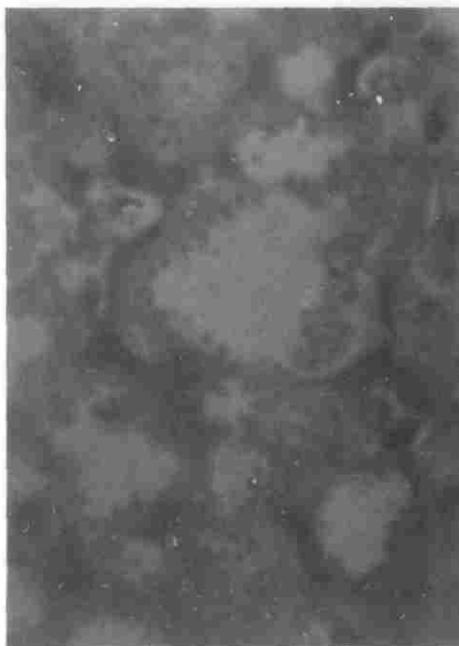


Foto 3. H. & E. 625 X

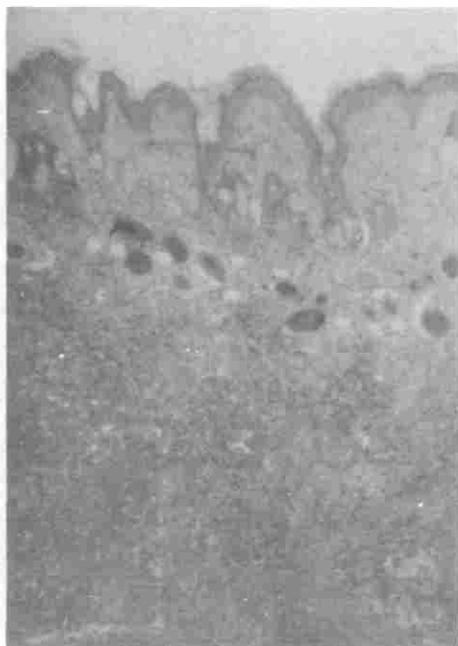


Foto 4. H. & E. 63 X

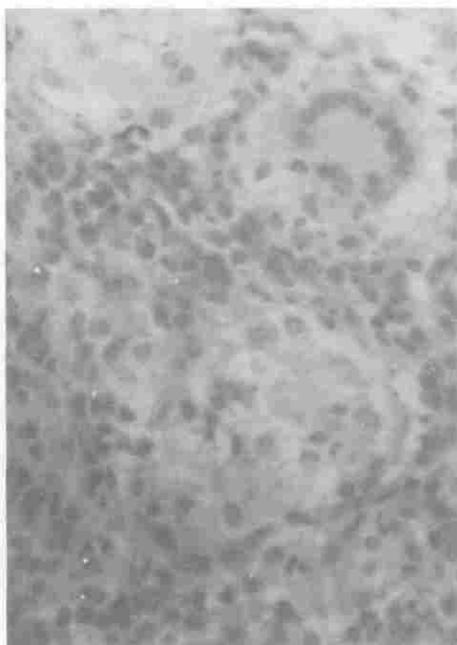


Foto 5. H. & E. 625 X

que tiene la Berberina sobre el transporte de hipoxantina en monocitos humanos (18) la cual como base del IMP (Inosina Mono Fosfato) a su vez precursora de GMP y AMP; (19) al ser bloqueada en su ingreso al interior del monocito, repercutiría en el detrimento de la incorporación de Guanina y Adenina por parte del parásito que lo coloniza; de esta manera se causaría en este último un ineficiente mantenimiento del estadio intracelular ya que estos no fabrican "Vía Novo" las bases nitrogenadas púricas 20 ; esto no sucedería con el monocito (hospedador) que sí tiene una "Vía Novo" para suplir la deficiencia eventual de bases púricas. Este punto de vista podría también eventualmente explicar como la Berberina reduce el área de lesión; pero su papel en la proliferación de Celulas Gigantes de Langhans (relación *Leishmaniasp.*-Berberina-Células Gigantes) por intervención en alguna ruta inmunoquímica y/o si se involucra su acción Alfa 2 Adrenergica, se ignora. Estudios en este campo pueden aportar a la comprensión del control en la exacerbación de lesiones leishmaniasicas cutáneas.

CONCLUSIONES

En un modelo experimental "In Vivo" de leishmaniasis cutánea inducida por *Leishmania mexicana mexicana* en hocico de hamsters, la administración intralesional de una dosis de 100 mg/kg de Cloruro de Berberina cada tres días en solo tres ocasiones poseen igual eficacia en la reducción del área de lesión que el Antimoniato de Meglumina "Glucantime" administrado también intralesionalmente pero de manera diaria en una dosis de 20 mg/kg en un periodo de ocho días. Únicamente las pápulas tratadas con Cloruro de Berberina manifiestan proliferación de Células Gigantes de Langhans.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración especial del Dr. Gerzain Rodriguez Toro . Coordinador del Area de Patología del I.N.S ; Dra. Elvia Cáceres . Profesora de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional ; Dra. Martha Estella Ayala . Area de Investigación Aplicada. Parasitología I.N.S y Dr. Jaime Muñoz. Bioterio de Experimentación I.N. S.

BIBLIOGRAFIA

1. Iwu, M.M.; Jackson, J.E.; Shuster, B.G. *Parasitology Today*. **1994**, 10, 65.
2. Organización Mundial de la Salud. (OMS). Tech. Rep. Ser. Geneva. **1994**, 793, 216.
3. MINSALUD. Casos nuevos de Leishmaniasis, Colombia. 1985-1990, Mimeografo. **990**
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, L. J. ; Lovelace, J. K. ; Waits, B. V. ; Hanson, W. L. ; Klayman, D.L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1990**, 34, 918.
7. Patridge, S.J. ; Russel, P.F. ; Anderson, M.M. ; Wright, C.W. ; Phillipson, J.D.; Firby, G.C.; Warhurst, D.C. ; P.L. Schiff. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1990**, 44, 97.
8. Kaneda, Y.; Tanaka T. ; Saw, T. *Journal of Experimental Clinical Medicine*. **1990**, 15, 417.
9. Robinson., T. *Molecular Biology Biochemistry and Biophysics*. Springer - Verlag. New York., 1981. p. 77.
10. Debnath., D.; Kumar, G.S.; Nandi, R. ; Maiti, M. *Indian Journal Biochem. and Biophys.* **1989**, 26, 201.
11. Kumar, G.S.; Debnath, D.; Maiti, M. *Indian Institute of Chemical Biology*. **1992**, 7, 305.
12. Nandi, R.; Debnath, D. ; Maiti, M. *Institute of Chemical Biology*. **1990**, 1049, 339.
13. Hui, K.K.; Yu, L.J.; Chan, A.F.W. ; Tse, E. *Life Sciences* . **1994**, 49, 315.

14. Acero, E.J.M. ; Avila, AT.; Torres de Young S. ; Granobles P.L.A. *Estudio de la Toxicidad Aguda del Sulfato y del Cloruro de Berberina y de sus Actividades 'In Vivo' frente a la Leishmania Cutanea*. Tesis de Grado. Departamento de Biología Universidad Distrital "Francisco Jose de Caldas" Santafe de Bogota D.C. **1995**, p.120.
15. Hartman, C. *Determinación de la Berberina en Berberis rigidifolia HBK. y sus aplicaciones en Leishmaniasis*. Tesis de Grado. Departamento de farmacia. Universidad Nacional de Colombia.. **1946**. 68.
16. Sarmiento, L.E.; Ramirez, P.S.; Morales, M.S.; Barrera, V.M.; Castro G.S ; Parrado D.C. *Estudios preliminares de la toxicidad aguda y subaguda del compuesto LC 4509*. Tesis de Grado. Departamento de Biología .Universidad Distrital «Francisco José de Caldas». **1991**. p. 112.
17. Wheeler, P.R.; Burkitt, A.; Steven,S.J. *Histopatología Básica*. Ed. Churchill Livinstone. Segunda Edición. 1991, p. 43.
18. Kraup, M.; Paskutti, B.; Schon, C. ; Marz R. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 456.
19. McGilvery, W. R. y Goldstein, W.G. *Bioquímica*. ; Ed. Interamericana.. Mexico D.F. 1986, p .760.
20. Hammond, D. J.; Gutteridge, W.E. *Molecular Biochemical Parasitology*. **1984**, 13, 223.