

ESTIMULAÇÃO DO SISTEMA METABOLIZADOR DE DROGAS HEPÁTICO DO RATO, POR DDT

RUBENS CECCHINI¹
LAERTE H. STORTI²

RESUMO

Uma única dose de DDT (diclorodifeniltricloroetano) (50 e 100mg/kg) aumentou a atividade metabolizadora de drogas em fígado de ratos. A N-desmetilação da aminopirina aumentou 3 a 4 vezes quando comparada com o controle. Por outro lado, um aumento de 2 vezes foi verificado tanto para a hidroxilação da anilina, como nos níveis de citocromo P₄₅₀. O tempo de hipnose barbitúrica provocado pelo pentobarbital sódico foi reduzido em 80% nas duas doses empregadas. Nossos resultados demonstraram que o efeito indutor máximo foi atingido com a dose de 50 mg/kg de DDT. Além disso, revelaram também que DDT exerce um efeito diferencial, na sua capacidade indutora, sobre a atividade da aminopirina N-desmetilase e anilina hidroxilase.

Palavras-chave: Metabolismo de drogas – microssoma – inseticidas clorados – indução enzimática.

1 – INTRODUÇÃO

O aumento da atividade do sistema metabolizador de drogas, hepático, por substâncias xenobióticas tem sido investigado ao longo dos últimos 25 anos (CONNEY³, KHAN¹ e SNIDER & REMMER¹⁸).

Este fenômeno conhecido como “indução” enzimática microssomal desempenha um importante papel na duração da ação e efeitos de drogas e na toxicidade de poluentes ambientais.

Entre as substâncias capazes de produzir aquele fenômeno, encontram-se os inseticidas organoclorados (KHAN¹, SNYDER & REMMER¹⁸). O DDT (diclorodifenil tricloroetano), um inseticida deste grupo, tem sido investigado na sua capacidade estimuladora do sistema microssomal hepático (KHAN¹, SNYDER & REMMER¹⁸ e CECCHINI & ROTHSCCHILD¹). Tais estudos foram desenvolvidos empregando diferentes esquemas de tratamento.

Ratos alimentados com dietas contendo 500ppm de DDT entre 2 semanas e 4 meses, mostravam aumento do metabolismo do hexobarbital, diminuição do tempo de hipnose provocado por este barbitúrico e estimulação do metabolismo da aminopirina, mas nenhuma alteração do metabolismo da anilina, (HART & FOUTS⁸). O efeito estimulador sobre o metabolismo de barbitúrico, foi observado também na intoxicação aguda por DDT (CECCHINI & ROTHSCCHILD¹). Dose única deste inseticida administrado para ratos, demonstrou um aumento de até sete vezes na

atividade de p-nitroanisol oxidesmetilase e duas vezes na concentração de citocromo P₄₅₀ (VAINIO¹⁹).

Na presente investigação, nós estudamos a indução na aminopirina N-desmetilase, anilina hidroxilase e citocromo P₄₅₀ microssomais hepático, pela administração de DDT para ratos. Investigamos também a atividade metabolizadora “in vivo”, através do tempo de hipnose barbitúrica (THB) provocado pelo pentobarbital sódico.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados ratos machos Winstar, pesando entre 200 e 250 gramas, alimentados “Ad libitum” com dieta comercial (Anderson Clayton). O DDT foi dissolvido em óleo de soja e injetado intraperitonealmente nas doses de 50 e 100 mg/kg em única vez. Os respectivos controles recebiam somente óleo de soja. O DDT grau técnico 100%, foi obtido da indústria nacional de inseticidas e fertilizantes. A análise deste inseticida feita por cromatografia gasosa revelou um teor de 98% de DDT totais.

Os ratos sacrificados por deslocamento cervical 48 horas após terem recebido a injeção do inseticida e observados 12 horas de jejum. Os fígados foram perfundidos com 20 ml de KC1 1,15% através da veia porta conforme descrito por FOUSTS⁵. Imediatamente após, foram retirados, lavados com KC1 1,15% em banho de gelo, pesados, picados e homogeneizados com um homogeneizador Potter contendo pistilo de teflon, para dar homogeneizado a 20% (p/V de fígado em KC1 1,15%). Esta suspensão foi subme-

¹. Departamento de Patologia Geral do Centro de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Londrina

². Departamento de Patologia Geral Centro de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Londrina.

tida a centrifugação a 10.000X g por 20 minutos em centrífuga refrigerada Janetzky K 70 D, e o sobrenadante retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Esta fração foi empregada como fonte de enzima para verificação do metabolismo hepático de drogas e para obtenção da fração microsomal (FOUTS⁵). O microsoma foi sedimentado por precipitação isoeletrica conforme FRY & BRIDGES⁶, como descrito previamente por CECCHINI & ROTHSCCHILD¹. A proteína foi estimada pelo método de LOWRY¹³, modificado por MILLER¹⁴.

A atividade da aminopirina N-desmetilase foi determinada pela medida da quantidade de formaldeído produzido a 415 nm em um espectrofotômetro SPEKOL (NASH¹⁵).

A atividade da anilina hidroxilase foi determinada pela medida da quantidade de P-aminofenol formado, a 640 nm em um espectrofotômetro SPEKOL (KATO & GILLETTE⁹, LA DU et alii¹²).

As misturas de incubação continham 0,65 μ moles de NADP+, 10 μ moles de G-6-p, 50 moles de nicotinamida, 25 μ moles de MgC₂, 45 μ moles de semicarbazida (apenas para o metabolismo da aminopirina), tampão Na⁺/K⁺ 0,1M pH 7,4 e 1 ml de sobrenadante 10.000 x g. A aminopirina foi adicionada ao meio, na quantidade de 5 μ moles para um volume final de 6 ml. A anilina foi adicionada ao meio na quantidade de 5 μ moles para um volume final de 4 ml.

Estas misturas foram incubadas a 37°C por 20 ou 30 minutos, em agitador metabólico DUBNOFF utilizando-se ar como fase gasosa, mantendo-se uma velocidade de 120 ciclos/minutos.

A concentração de citocromo P₄₅₀, foi medida pelo método de OMURA & SATO¹⁶. Para esta determinação, microsoma foi diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4/glicerol 20%, para dar aproximadamente 2 mg de proteína microsomal por ml.

O tempo de hipnose barbitúrica foi medido empregando-se a dose de 45 mg/kg de pentobarbital sódico (i.p.) e medindo-se o tempo decorrido entre a perda do reflexo de endireitamento e a sua recuperação.

A significância estatística foi obtida com o auxílio do teste "t" de STUDENT e considerados significativamente diferentes os valores de P > 0,05. Cada resultado individual representa a média de 6 animais.

3 – RESULTADOS

O tratamento dos animais com uma única dose de 50 ou 100 mg/kg de DDT não provocou aumento no peso do fígado por 100 g de peso corporal. A concentração de proteína microsomal aumentou significativamente apenas quando a dose de DDT foi de 100 mg/kg (Tabela I).

A atividade da aminopirina M-desmetilase aumentou 3,5 vezes para dose de 50 mg/kg e 3 vezes para a dose de 100 mg/kg. Para a atividade da anilina hidroxilase, os aumentos foram menores, cerca de 2 vezes para as duas doses empregadas (Tabela II).

Os níveis de citocromo P₄₅₀ aumentaram cerca de 2 vezes, tanto nos animais que receberam 50 mg/kg, como

os animais que receberam 100 mg/kg (Tabela III).

O metabolismo "in vivo" do pentobarbital sódico foi investigado nos animais tratados com DDT. Notamos na Tabela IV, que os dois grupos tratados com 50 e 100 mg/kg de DDT tiveram uma redução de 80% na duração da ação desse barbitúrico. Isto reflete um aumento significativo da atividade do sistema metabolizador de drogas hepático nestes animais.

4 – DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a administração de DDT, para ratos adultos, nas doses de 50 e 100 mg/kg produz um aumento significativo da velocidade de metabolização da ordem de 3 a 4 vezes da aminopirina e cerca de 2 vezes da anilina. Aumentos desta ordem de grandeza foram obtidos por HART & FOUTS⁸, na intoxicação aguda com doses que variavam entre 75 e 300 mg/kg de DDT. A exemplo de nossas observações, aqueles autores não obtiveram aumentos adicionais no metabolismo da aminopirina e anilina, quando doses superiores a 75 mg/kg foram empregadas. Paralelamente ao aumento da atividade metabolizadora hepática, verificamos um aumento de 2 vezes na quantidade de citocromo P₄₅₀ microsomal, quando os ratos recebiam a dose de 50 mg/kg de peso. Os níveis desta

hemoproteína também não mostraram aumentos adicionais na dose de 100 mg/kg. Este aspecto parece-nos coerente já que o citocromo P₄₅₀ é uma hemoproteína chave no processo de metabolismo de drogas hepático (OMURA & SATO¹⁶ e ESTABROOK et alii⁴). Um aumento de 2 vezes na concentração de citocromo P₄₅₀ foi observado por VAINIO¹⁹, em ratos tratados com a dose de 160 mg/kg de DDT. A ineficácia em aumentar a atividade do sistema metabolizador de drogas hepático em doses superiores a 50 mg/kg de DDT, foi verificada para o metabolismo "in vivo" do hexobarbital (CECCHINI & ROTHSCCHILD¹).

É importante notar em nossos resultados, que os níveis de aumento de citocromo P₄₅₀ são mais compatíveis com o aumento do metabolismo da anilina do que aquele da aminopirina. Sem dúvida, tem sido demonstrado que o DDT exerce efeito indutor diferencial sobre substratos diferentes (KHAN¹¹) e que o citocromo P₄₅₀ induzido por ele parece diferir cataliticamente daqueles induzidos por outros inseticidas (CHADWICK, et alii²), fenobarbital (GIELEN & NEBERT⁷) e benzopireno (CECCHINI & ROTHSCCHILD¹). Apesar destas diferenças, o aumento da atividade metabolizadora de drogas, produzido pelo DDT, resulta da síntese "de novo" de proteínas (SANCHEZ¹⁷) similar àquela produzida pelo fenobarbital (KATO et alii¹⁰).

A confirmação da capacidade indutora do DDT, sobre o metabolismo hepático de drogas, foi feita através da medida do tempo de hipnose barbitúrica provocado pelo pentobarbital. Neste experimento, observamos também que a dose 100 mg/kg não provocou diminuição adicional no tempo de hipnose provocado por aquele barbitúrico. Isto parece refletir a capacidade de máxima de indução deste inseticida na dose de 50 mg/kg.

Assim, nossos resultados refletem que a dose de 50 mg/kg produz um efeito máximo não só sobre a atividade metabolizadora "in vitro" da aminopirina e da anilina, como "in vivo" sobre o metabolismo do pentobarbital. Esta conclusão baseia-se no fato de que a dose de 100 mg/kg, por nós investigada, e doses intermediárias investigadas por outros autores, não revelaram efeito indutor adicional. Parece-nos provável que esse limite de capacidade indutora seja o resultado em parte, da saturação da capacidade

de síntese protéica pela célula hepática e em parte da inibição provocada pela presença do inseticida, nas membranas do retículo endoplasmático (KHAN¹¹). Além disso nossos resultados revelam um efeito diferencial do DDT na indução da atividade da aminopirina N-desmetilase e anilina hidroxilase e uma maior dependência do metabolismo da anilina em relação à concentração de citocromo P₄₅₀.

TABELA I – Variação do peso do fígado/peso corporal e conteúdo de proteína microsomal hepática em ratos tratados com DDT (Diclorodifeniltricloroetano).

Tratamento	Peso do Fígado 100 g de peso animal	EPm	Proteína microsomal mg/g fígado	EPm
Controle	2,90	0,15	21,18	0,88
50 mg/kg	3,65 n.s.	0,21	21,49 n.s.	0,96
100 mg/kg	3,66 n.s.	0,12	24,27 +	0,82

+ = resultados estatisticamente significativos a um nível de $P \leq 0,05$ em relação aos controles.

n.s. = não significativos

EPm = erro padrão da média

TABELA II – Metabolização "in vitro" de aminopirina e anilina pelo sistema microsomal hepático de ratos tratados com DDT (Diclorodifeniltricloroetano).

Tratamento	Aminopirina (§) Média ± EPm	% Metabolização	Anilina (£) Média ± EPm	% Metabolização
Controle	71,49 ± 6,26	100	10,05 ± 0,76	100
50 mg/kg	245,75 ± 19,55 +	343	19,03 ± 3,35 +	189
100 mg/kg	198,73 ± 8,46 +	277	18,57 ± 0,96 +	184

+ = Resultados estatisticamente significativos a um nível de $P \leq 0,05$ em relação aos controles.

§ = nmol de CHO_H formado/mg de proteína microsomal/30 minutos de incubação.

£ = nmol de p-aminofenol formado/mg proteína microsomal/ 20 minutos de incubação.

TABELA III – Níveis de citocromo P₄₅₀ em microsoma obtido de fígado de ratos tratados com DDT (diclorodifeniltricloroetano).

Tratamento	P ₄₅₀ ± EPm D O. x 10 ³ /mg proteína microsomal	% de P ₄₅₀
Controle	41,72 ± 4,61	100
50 mg/kg	91,32 ± 7,57 +	218
100 mg/kg	99,02 ± 5,02 +	239

+ = Resultados estatisticamente significativos a um nível de $P \leq 0,05$ em relação aos controles.

TABELA IV – Tempo de hipnose barbitúrica (THB) provocado pelo pentobarbital (nembital) em ratos tratados com DDT.

Tratamento	Tempo de hipnose barbitúrica ± EPm em minutos	% de THB
Controle	340,7 ± 52,9 (4)	100
50 mg/kg	79,3 ± 6,4 (6) +	23
100 mg/kg	66,2 ± 3,4 (4) +	19

+ = Resultados estatisticamente significativos a um nível de $P \leq 0,05$ em relação aos controles.
() = Número de animais por grupo.

ABSTRACT

A single dose of DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) (50 and 100 mg/kg i.p.) enhanced the hepatic metabolizing activity in rats. The N-demethylation of aminopyrine showed a 3-4 fold increase when compared with control. On the other hand, there was only a 2-fold increase on hydroxylation of aniline and on the levels of cytochrome P₄₅₀. The pentobarbital sleeping time decreased 80% in both doses of insecticide. These results revealed a maximal induction in the dose of 50 mg/kg of insecticide. In addition, it was demonstrated that the DDT evokes a differential effect on the aminopyrine N-demethylase and aniline p-hydroxylase activity.

Key-Words: Drug-metabolism - microsoma - chlorinated insecticides - enzyme induction.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CECCHINI, R. & ROTHSCHILD, A.M. Efeito de fenobarbital, DDT e 3,4 Benzo(a)pireno sobre a atividade metabolizadora de drogas do sistema microsomal hepático da rata. Ribeirão Preto, Fac. de Med. Ribeirão Preto, 1978. Tese (Mestr. Ciê.) Fac. Med. – Ribeirão Preto - SP.
- CHADWICK, R.W. & FREAL, J.J. Comparative acceleration of lindane metabolism to chlorophenols by pretreatment of rats with lindane or with DDT and lindane. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10:789-795, 1972.
- CONNAY, A.H. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.*, 19(3):317-363, 1967.
- ESTABROOK, R.W.; TAKAHY, M.; MASON, J.I., et alii. Studies on the molecular function of cytochrome P₄₅₀ during drug metabolism. *Drug. Metab. Dispos.*, 1:98-110, 1973.
- FOUTS, J.R. *Methods in Pharmacology*. New York, 1971. p. 305-307.
- FRY, J.R. & BRIDGES, J.W. Aryl mono-oxygenase activity in hepatic microsomes isolated by isoelectric precipitation. *Analytical Biochemistry*, 67:390-318, 1975.
- GIELEN, J.E. & NEBERT, D.W. Microsomal hydroxylase induction in liver cell culture by phenobarbital, polycyclic hydrocarbon and p,p-DDT. *Science*, 172: 167-169, 1971.
- HART, G.L. & FOOTS, J.R. Effects of acute and chronic DDT administration on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114: 388-392, 1963.
- KATO, R. & GILLETTE, J.R. Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150: 279-284, 1965.
- KATO, R., JONDORF, W.R., LOEB, L.A. et alii. Studies on the mechanism of drug induced microsomal enzyme activities. V. Phenobarbital stimulation of endogenous messenger RNA and polyuridylic acid-directed L-¹⁴C-phenylalanine incorporation. *Mol. Pharmacol.*, 2: 171-186, 1966.
- KHAN, M.A.Q. Induction of drug-metabolizing enzymes by insecticides and other xenobiotics. *Pharmac. Ther.*, 11:43-107, 1980.
- LA DU, B.N.; MANDEL, H.G.; WAY, E.L. *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1971. p. 569-570.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.S.; FARR, A.L., et alii. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.* 31: 964, 1959.
- NASH, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *J. Biol. Chem.*, 55: 416-412, 1953.
- OMURA, T. & SATO, R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370-2378, 1964.
- SANCHEZ, E. DDT-induced metabolic changes in rat liver. *Can. J. Biochem.*, 45: 1809-1817, 1967.

18. SNYDER, R. & REMMER, H. Classes of hepatic microsomal mixed function oxidase inducers. *Pharmac. Ther.* 7: 203-244, 1979.

19. VAINIO, H. Enhancement of hepatic microsomal drug oxidation and glucuronidation in rat by 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT). *Chem. Biol. Interact.*, 9: 7-14, 1974.

Imizol acaba com qualquer tristeza.

Quando a tristeza ataca o gado, você pode pensar que ela seja causada pela Babesose ou pelo Anaplasmose.

Ou por ambos. Em vez de perder tempo usando vários produtos num tratamento difícil e caro, é muito melhor usar Imizol. Isso porque Imizol é uma receita única para acabar com a tristeza.

ou seja, uma pequena dose de Imizol é o suficiente para interromper a evolução da doença e permitir a rápida recuperação do animal, seja qual for o agente causador.

Não deixe a tristeza acabar com a sua alegria. Fale com o seu veterinário. Use Imizol.

The advertisement features a large, detailed black and white illustration of a cow's head in profile, facing left. The cow has thick, curly fur and small horns. In the lower right corner, there is a photograph of the Imizol product packaging, which includes a box and a small glass vial with a white stopper. The box is labeled 'Imizol Injetável' and 'COOPER'. Below the cow's head, the word 'IMIZOL' is written in large, bold, outlined letters. A small circular logo with a cow silhouette and the word 'COOPER' is positioned above the brand name. Below the logo, the text 'LABORATÓRIOS WILCOX S.A.' is visible.