

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 – microsoma – 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 microsomal 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 microsomal 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 microsomais 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 FOUTS⁵. 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 & FOOTS⁸, 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 CHO₂H 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.

Um 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 bottom 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. To the left of the cow's head, there is a circular logo with a stylized animal and the word 'COOPER' next to it. Below the logo, it says 'LABORATÓRIOS WILCOX S.A.'.