

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

INDUÇÃO E INIBIÇÃO DO METABOLISMO HEPÁTICO POR FENILBUTAZONA E  
CLORANFENICOL E A ANESTESIA POR XILAZINA E CETAMINA EM RATOS,  
CÃES E PORCOS

Autor: Antonio de Pádua Ferreira da Silva Filho  
Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

Tese de Doutorado

1999

**S586a** Silva Filho, Antonio de Pádua Ferreira da

Indução e inibição do metabolismo hepático por fenilbutazona e cloranfenicol e a anestesia por xilazina e cetamina em ratos, cães e porcos / Antonio de Pádua Ferreira da Silva Filho ; orient. João Roberto Braga de Mello. – Porto Alegre, 1999. 122 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Clínica Médica.

1. Fígado : Metabolismo. 2. Indução enzimática. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Fenilbutazona. 5. Cloranfenicol. 6. Xilazina. 7. Cetamina. 8. Ratos. 9. Suínos. 10. Cães. I. Mello, João Roberto Braga. II. Título.

NLM: WI 704

*Ao Gabriel e ao Miguel Besnos, que com o carinho de todos os dias, são permanente fonte de estímulo e motivo de vida.*

*"Combati o bom combate, cumprí minha missão, guardei a minha fé."*

Paulo. II Timóteo, 4-7

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, pela orientação, estímulo e amizade, não apenas na condução deste trabalho, mas também durante os longos anos de atividade profissional em conjunto.

Ao Prof. Dr. Ellis D'Arrigo Busnello, pela acolhida respeitosa e solidária.

Ao Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs, pelo aconselhamento e pelo apoio irrestrito dispensados em todos os momentos, que não foram poucos, em que sua presença foi importante.

Ao Prof. Dr. Carlos Termignoni, pela orientação nos procedimentos bioquímicos, tornando viável este trabalho.

À Dra. Tatyana Goloubkova, pela paciência, dedicação e esforço durante a execução do projeto.

Ao Prof. Carlos Afonso de Castro Beck, amigo e colaborador, pelo auxílio nas diferentes fases do projeto e pelas inúmeras vezes em que assumiu minhas responsabilidades funcionais para que o programa a que me propus tivesse seu prosseguimento.

Ao Prof. Dr. Eduardo Estevão Eggers, pelo exemplo de determinação na busca dos objetivos propostos, pela amizade pessoal e pelo suporte profissional, sem os quais este trabalho não teria sido concluído.

À Professora Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira, pela incansável disposição com que assumiu a relatoria desta tese, pelos inúmeros conselhos e sugestões e pelos gestos de amizade, continuamente demonstrados.

Ao Dr. Rogério Silveira Martins, pela capacidade profissional, postura científica e disponibilidade pessoal expressas durante as diferentes etapas do programa de pós-graduação.

À Professora Dra. Sandra Costa Fuchs e ao Prof. Dr. Amarílio Vieira de Macedo Neto, pela maneira gentil com que se dispuseram a compor a banca do Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Carlos Marcos Barcellos de Oliveira, Diretor da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pela liderança, equilíbrio e estímulo que contribuíram de forma decisiva para o desenvolvimento de todo o meu programa de pós-graduação. Na sua pessoa, agradeço a todos os professores da minha Instituição por ter a felicidade de integrar um corpo docente solidário e fraterno.

À Professora Dra. Jane Maria Rubensam e à Professora Jocelei Maria Chies, que, com carinho e compreensão, tornaram menos áridas as fases mais difíceis dos procedimentos laboratoriais.

Aos Médicos Veterinários Jarbas Castro Jr., Luciana Oliveira de Oliveira e Virgínia Bocorny Lunardi e aos funcionários do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, pelo auxílio na condução da etapa experimental *in vivo*.

Aos Biólogos Eduardo Cezar Tondo, Cláudia Chiarel Almeida, Jaqueline Silveira e Temenonga Guecheva e ao Técnico de Laboratório Fernando Gisler, pela boa vontade e colaboração indispensáveis.

À Faculdade de Medicina da UFRGS e, por meio dela, à Universidade Pública, que tornaram possível, não apenas a minha formação, mas a de um número muito grande de brasileiros que, de outra forma, veriam barradas suas perspectivas de uma educação de qualidade, único caminho para um projeto de desenvolvimento do País que incluía progresso econômico com justiça social e dignidade.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS por ter aberto suas portas e colocado a minha disposição pesquisadores, técnicos, instalações e equipamento, sem os quais este projeto não teria tido andamento.

Ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde e ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, pela cedência de equipamento e instalações.

Aos meus familiares que assumiram comigo o desafio de buscar e cumprir um programa de pós-graduação no nível e com a seriedade a que me propus.

Finalmente, a todos os que tiveram algum grau de participação e que não foram citados, a certeza de que seu apoio não foi esquecido.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 - REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 - Sistema microssomal hepático citocromo P - 450.....	19
2.2 - Indução enzimática.....	22
2.3 - Inibição enzimática.....	33
2.4 – Fármacos utilizados ou relacionados com o estudo.....	36
2.4.1 – Considerações gerais.....	36
2.4.2 – Fenobarbital.....	37
2.4.3 – Fenilbutazona.....	40
2.4.4 – Cloranfenicol.....	42
2.4.5 – Cetamina.....	48
2.4.6 – Xilazina.....	51
2.4.7 – Associação xilazina - cetamina.....	52
2.4.8 – Ensaio bioquímico relacionados com o estudo.....	54
<b>3 – OBJETIVOS E HIPÓTESES.....</b>	<b>56</b>
3.1 - Objetivo geral.....	56
3.2 – Objetivos específicos.....	56
3.3 – Hipótese conceitual.....	56
3.4 – Hipóteses operacionais.....	56

<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	58
4.1 - Animais experimentais.....	58
4.1.1 - Tamanho da amostra.....	58
4.2 - Fármacos e reagentes.....	59
4.3 - Doses e vias de administração.....	59
4.4 - Procedimentos <i>in vivo</i> .....	60
4.4.1 Ratos.....	60
4.4.2 - Cães e porcos.....	62
4.5 - Procedimentos <i>ex vivo</i> .....	63
4.5.1 - Ratos.....	63
4.5.2 - Cães e porcos.....	63
4.6 - Procedimentos <i>in vitro</i> .....	63
4.6.1 - Preparo dos microssomas hepáticos.....	64
4.6.2 - Determinação de proteínas hepáticas.....	65
4.6.3 - Determinação da concentração de citocromo P – 450.....	65
4.6.4 - Determinação da velocidade de redução de NADPH - citocromo C.....	66
4.7 - Delineamento.....	67
4.8 - Análise estatística.....	67
<b>5 – RESULTADOS</b> .....	68
5.1 - Ratos.....	68
5.2 - Cães.....	73
5.3 - Porcos.....	76
5.4 - Resultados comparativos entre os grupos de animais.....	80
<b>6 - DISCUSSÃO</b> .....	84

6.1 - Aspectos gerais.....	84
6.2 – Experimentos utilizando ratos.....	84
6.3 – Experimentos utilizando cães.....	91
6.4 – Experimentos utilizando porcos.....	95
6.5 - Estudo comparativo entre os grupos animais.....	97
7 - CONCLUSÕES.....	102
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ABSTRACT	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental proposto.....	62
Figura 2 – Tempo de ausência de reflexo de endireitamento. Dados obtidos em ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina, em valores percentuais do grupo controle em cada espécie.....	81
Figura 3 – Concentração hepática de proteínas. Dados obtidos em ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina, em valores percentuais do grupo controle em cada espécie.....	82
Figura 4 – Velocidade de redução de NADPH – citocromo C por minuto por miligrama de proteína. Dados obtidos em ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina, em valores percentuais do grupo controle em cada espécie.....	83

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Tempo de início de ausência de reflexo de endireitamento de ratos anestesiados com xilazina e cetamina antes de tratamento e após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol..... 68
- Tabela 2 - Tempo de ausência de reflexo de endireitamento de ratos anestesiados com xilazina e cetamina antes de tratamento e após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol..... 69
- Tabela 3 - Peso dos fígados de ratos tratados com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina..... 70
- Tabela 4 - Concentração hepática de proteínas, concentração de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C de ratos tratados com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina..... 71
- Tabela 5 - Tempo de ausência de reflexo de endireitamento de cães anestesiados com xilazina e cetamina antes de tratamento e após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol..... 73

Tabela 6 - Concentração hepática de proteínas, concentração de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C de cães tratados com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina.....	75
Tabela 7 - Tempo de ausência de reflexo de endireitamento em porcos anestesiados com xilazina e cetamina antes de tratamento e após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol.....	76
Tabela 8 - Tempo de retorno à ambulação de porcos anestesiados com xilazina e cetamina, antes de tratamento e após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol.....	77
Tabela 9 - Concentração hepática de proteínas, concentração de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C de porcos tratados com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesiados com xilazina e cetamina.....	79

## RESUMO

O sistema microsomal hepático citocromo P - 450, compreendendo famílias e subfamílias de isoenzimas, atua no metabolismo de um grande número de substratos endógenos e exógenos e desempenha um papel central na biotransformação dos fármacos e na ativação metabólica de compostos carcinogênicos.

Muitos fármacos têm a capacidade de aumentar a atividade enzimática do sistema citocromo P - 450. Outros fármacos diminuem a atividade enzimática do sistema. O primeiro fenômeno é denominado de indução enzimática e o segundo é definido como inibição enzimática.

A interação medicamentosa envolvendo fármacos anestésicos tem, na alteração do tempo de sono, a principal e mais visível alteração *in vivo*.

No presente trabalho foi estudada a influência da administração prévia de fenilbutazona e de cloranfenicol sobre a anestesia promovida pela associação de xilazina e cetamina em ratos, cães e porcos.

A fenilbutazona é um antiinflamatório com propriedades indutoras semelhantes às do fenobarbital, embora em menor intensidade. O cloranfenicol é um antibiótico com reconhecida capacidade inibidora, prolongando a ação de drogas como barbitúricos, fenitoína, varfarina e digoxina.

Tanto a fenilbutazona quanto o cloranfenicol são de uso freqüente no exercício da clínica em medicina veterinária.

Xilazina é um agonista adrenérgico alfa-2 com propriedades analgésicas, sedativas e miorreloxantes. A cetamina é um composto de ação cataléptica, analgésica e anestésica que produz uma anestesia denominada de dissociativa. A xilazina e a cetamina são muito utilizadas em associação para promover anestesia em diferentes espécies animais.

Nesse estudo foram utilizados 54 ratos Wistar, 18 cães sem raça definida e 18 porcos cruzamento Landrace - Duroc, todos de sexo masculino.

Os ratos foram separados em três grupos denominados controle (CTL), fenilbutazona (FBZ) e cloranfenicol (CLF), com 18 animais em cada grupo.

Os cães e porcos foram divididos em três grupos, em cada espécie, com seis animais em cada grupo, tendo sido também denominados CTL, FBZ e CLF.

No primeiro dia do experimento, os animais dos grupos CTL, FBZ e CLF foram anestesiados, recebendo xilazina, na dose de  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os ratos e  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os cães e porcos, e cetamina na dose de  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os ratos e  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os cães e porcos. Os fármacos foram administrados simultaneamente, na mesma seringa, por via intraperitoneal (i.p.) nos ratos e por via intravenosa (i.v.) nos cães e porcos. Foram avaliados e anotados os tempos até a perda do reflexo de endireitamento e até a sua recuperação nos ratos, cães e porcos. Nesta última espécie foi registrado o tempo de retorno à ambulação.

A partir do sexto dia, os animais receberam doses diárias de solução fisiológica ou fenilbutazona ou cloranfenicol, durante cinco dias. A fenilbutazona foi administrada na dose de  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os ratos e na dose de  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os cães e porcos. O cloranfenicol foi administrado na dose de  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os ratos e na dose de  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para os cães e porcos. A fenilbutazona e o cloranfenicol foram administrados por via i.p. nos ratos e porcos e por via i.v. nos cães. A solução fisiológica foi administrada nos animais do grupo CTL, por via i.v., nos cães e por via i.p. nos ratos e porcos.

No décimo dia foram repetidos os procedimentos e as avaliações do primeiro dia e sacrificados todos os animais.

Os fígados dos ratos foram pesados e reunidos em *pool* por grupo. Os fígados dos cães e porcos foram processados individualmente.

Foram preparados microssomas hepáticos (GUENGERICH, 1994) e determinadas a concentração de proteínas hepáticas (LOWRY *et al.*, 1951), a concentração de citocromo P - 450 (OMURA & SATO, 1964a) e a velocidade de redução de NADPH - citocromo C (PHILLIPS & LANGDON, 1962).

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA , teste de Student - Newman - Keuls e teste de Pearson. O nível de significância foi de  $\alpha = 0,05$ .

Os resultados revelaram que a fenilbutazona diminuiu o tempo de anestesia nos ratos, sem alteração nas outras duas espécies, e o cloranfenicol aumentou o tempo de anestesia nos ratos e cães, mas não nos porcos. A média dos pesos dos fígados dos ratos do grupo FBZ foi mais elevada do que a dos demais grupos. A velocidade de redução de NADPH - citocromo C foi maior no grupo FBZ nas três espécies, indicando uma situação de indução enzimática. Paralelamente, houve uma menor velocidade de redução no grupo CLF nos porcos. Foi verificada correlação inversa entre o tempo de anestesia e a atividade enzimática em ratos e porcos.

## 1 – INTRODUÇÃO

Os estudos de interação medicamentosa datam do início da década de 1950, quando RICHARDSON & CUNNINGHAM (1951) publicaram um dos primeiros trabalhos, sugerindo a ativação do metabolismo de algumas drogas pela administração prévia ou simultânea de outras. Estes autores observaram que ratas tratadas com um hidrocarboneto policíclico, o 3' – metilcolantreno, apresentavam menor incidência de câncer de fígado, quando expostas a determinado composto hepatocarcinogênico, quando comparadas com ratas não - tratadas. Na mesma linha de pesquisa, CONNEY, MILLER, MILLER (1957) verificaram que a administração de pequenas quantidades de diferentes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos induz rapidamente um aumento na atividade das enzimas microssomais hepáticas por aumento da síntese de proteínas. CONNEY (1967), com base em estudos próprios e de outros autores, sistematiza, em extensa monografia, o que se convencionou denominar de indução do sistema microssomal hepático citocromo P-450. A continuidade dos estudos levou OKEY (1990) a atualizar os relatos existentes, muitos deles baseados somente em observações *in vivo*, incluindo os aspectos bioquímicos da indução enzimática.

Os efeitos terapêuticos da diminuição da atividade do sistema microssomal hepático, a inibição enzimática, tem recebido uma atenção menor do que aquela dedicada a efeitos relacionados com a indução enzimática, embora suas conseqüências sejam tão importantes quanto aquelas.

Sob o aspecto anestesiológico, tanto a indução quanto a inibição enzimáticas conduzem a efeitos que, muitas vezes, condicionam a conduta do profissional no

momento de optar pelo protocolo de anestesia mais adequado à situação clínica com que se depara.

Enquanto os trabalhos clássicos sobre o assunto descrevem exaustivamente a ação da inibição e da indução enzimáticas sobre os barbitúricos, em especial, o fenobarbital, o presente estudo faz uma abordagem da interação medicamentosa envolvendo fármacos anestésicos, a xilazina e a cetamina, de uso cotidiano em medicina veterinária e em modelos animais experimentais. Da mesma forma, a escolha da fenilbutazona e do cloranfenicol como possíveis drogas indutora e inibidora do sistema microsomal hepático, respectivamente, atendeu à importância que estes fármacos apresentam em medicina animal.

Foram utilizados ratos por sua importância como animais de laboratório, facilidade de comparação com estudos semelhantes e homogeneidade dos indivíduos; cães pela importância da espécie para a medicina veterinária e porcos por se constituírem em um importante modelo animal experimental na pesquisa médica.

Atendendo à abrangência da proposta, com a escolha dos fármacos e das espécies, foram estudadas variáveis observadas *in vivo* com possibilidade de correlação com dados obtidos de procedimentos bioquímicos.

## 2 – REVISÃO DA LITERATURA

Quando dois ou mais fármacos são administrados, pode ocorrer uma interação medicamentosa capaz de causar alterações em sua farmacocinética e em sua farmacodinâmica. Quando ocorre interferência em nível de receptor, diz-se que há uma interação farmacodinâmica. Quando um dos fármacos interfere com absorção, distribuição, metabolização ou excreção do outro fármaco, ocorre uma interação farmacocinética (FLECK, TANNHAUSER, TANNHAUSER, 1977).

Os fármacos podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os primeiros podem ser excretados sem modificações pela urina, bile e outras secreções. Os fármacos lipossolúveis tendem a se acumular no organismo e afetar os processos celulares por um período prolongado, caso não sejam transformados em compostos menos ativos ou em metabólitos hidrossolúveis que são excretados mais facilmente. Como o endotélio dos sinusóides hepáticos tem fenestrações ou poros transcelulares, os fármacos podem se difundir passivamente dos sinusóides para o espaço de Disse, permitindo um contato direto entre o fármaco e a membrana plasmática do hepatócito. O tamanho relativamente amplo dos poros permite que fármacos com moléculas grandes ou aqueles ligados a proteínas passem através deles, sendo transportados para o interior do hepatócito onde ocorre a biotransformação (HOYUMPA & SCHENKER, 1993).

Os sistemas enzimáticos responsáveis pela biotransformação de muitos fármacos estão localizados no retículo endoplasmático liso do fígado, também denominado de fração microssômica.

A ação fisiológica essencial das enzimas metabolizadoras dos fármacos é converter drogas lipofílicas em metabólitos hidrossolúveis que são excretados mais facilmente. O metabolismo dos fármacos consiste de reações de Fase I e reações de Fase II. As reações de Fase I, incluindo oxidação, redução e hidrólise, convertem o fármaco original em um metabólito mais polar. As reações de Fase II, também chamadas de reações de conjugação, envolvem a ligação do fármaco ou de seu metabólito polar a um substrato endógeno, como glicuronato, sulfato, acetato ou um aminoácido (PARK & BRECKENRIDGE, 1981; DONATO, GÓMEZ-LECHÓN, CASTELL, 1990; BENET, KROETZ, SHEINER, 1996).

### **2.1 - Sistema microsomal hepático citocromo P - 450**

O sistema microsomal hepático citocromo P - 450 se constitui de famílias de monoxigenases que atuam no metabolismo de um grande número de substratos endógenos e exógenos e que desempenham um papel central na biotransformação dos fármacos e na ativação metabólica dos compostos carcinogênicos (LUC *et al.*, 1996).

O citocromo P - 450 é um pigmento descoberto por KLINGEMBERG (1958) e GARFINKEL (1958). Estes pesquisadores, trabalhando de forma independente, isolaram o pigmento a partir de microsomas hepáticos de ratos e porcos, respectivamente. OMURA & SATO (1964 a, b) demonstraram que o pigmento é uma hemoproteína com características atípicas que apresenta um pico a 450 nm no espectrofotômetro, quando reduzido e ligado ao monóxido de carbono, sendo por isso denominado citocromo P - 450. Uma vez isolado da membrana, o citocromo P - 450 é convertido a uma forma que, quando reduzida e ligada ao monóxido de carbono, apresenta um pico de 420 nm.

O sistema microsomal hepático é responsável por reações de oxidação que exigem um agente redutor, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e oxigênio molecular. As biotransformações catalisadas pelas monooxigenases incluem N- e O-desalquilação, hidroxilação de cadeia lateral e de anel aromático, formação de sulfóxido, N-oxidação, N-hidroxilação, desaminação de aminas primárias e secundárias e dessulfuração. Neste processo ocorre a inserção de um átomo de oxigênio molecular no substrato, quase sempre um intermediário instável que se decompõe para formar o produto final. Apesar do fígado ser o local principal de oxidação de fármacos e outros xenobióticos, muitos tecidos extra-hepáticos, particularmente os rins, intestino delgado e pulmões, contêm isoenzimas do citocromo P - 450 (SESARDIC *et al.*, 1990).

Os ésteres são hidrolisados por várias esterases inespecíficas no fígado, no plasma, no trato gastrointestinal e em outros tecidos. Nas reações de redução, as enzimas do retículo endoplasmático e do citosol do fígado e de outros tecidos catalisam a redução de grupamentos nitro e a redução da ligação azo. Nas reações de conjugação, a formação de glicuronídeo é catalisada por glicuroniltransferases hepáticas, localizadas no retículo endoplasmático (BENET *et al.*, 1996).

O sistema citocromo P - 450 dos mamíferos pode ser dividido em dois grandes grupos. Os P - 450s mitocondriais, encontrados na córtex adrenal, sintetizados pelos polirribossomas sem membrana e envolvidos com a síntese dos esteróides. Os P - 450s microsomais, encontrados principalmente na membrana do retículo endoplasmático, são sintetizados pelos ribossomas ligados a membranas e estão envolvidos com o metabolismo dos fármacos e com a ativação da carcinogênese (GONZALES, 1990).

BRESNICK, FOLDES, HINES (1984) enumeraram três fatores de interesse no estudo do sistema citocromo P - 450 : constitui uma família de enzimas, isto é , isoenzimas; é um sistema que se desenvolve, apresentando atividade baixa durante a

vida fetal e no recém - nascido, aumentado rapidamente no período pós - parto, e é uma enzima sujeita à indução.

O sistema citocromo P - 450 é classificado em famílias, sub - famílias e P - 450 individuais. Existem 20 famílias de genes P - 450 reconhecidas, sendo que 10 existem em todos os mamíferos e calcula-se que entre 60 e 200 genes P - 450 são encontrados em qualquer espécie de mamífero (HOYUMPA & SCHENKER, 1993).

As famílias são designadas por números romanos, as sub - famílias por letras maiúsculas e os genes individuais por números arábicos. Este sistema de classificação é baseado no alinhamento global de seqüências completas de aminoácidos. Desta forma, duas isoenzimas P - 450 que demonstrem 40 % ou menos de similaridade de aminoácidos são membros de famílias diferentes. Quando a similaridade for maior do que 59 %, as isoenzimas pertencem à mesma sub - família de genes. Foi verificado que membros das famílias P450I, P450II e P450III metabolizam fármacos e substâncias carcinogênicas. Algumas destas enzimas também atuam na hidroxilação de esteróides, como testosterona, estrogênio e progesterona (GONZALEZ, 1990).

Uma única isoenzima do complexo P - 450 pode estar envolvida no metabolismo de dois ou mais fármacos e um mesmo fármaco pode sofrer a ação de diversas isoenzimas. Muitos fármacos, entretanto, são metabolizados com a interferência de uma única isoenzima do complexo P - 450 (WATKINS, 1990).

Nas reações que envolvem a oxidação de fármacos, além das proteínas de citocromo P - 450, inseridas na bicamada lipídica do retículo endoplasmático liso, interfere a NADPH-citocromo P - 450 redutase, também ligada à bicamada lipídica em uma estequiometria de 10 moléculas P - 450 para uma de redutase. O substrato farmacológico liga-se inicialmente ao citocromo P - 450 oxidado. O complexo resultante fármaco - citocromo é reduzido pela redutase e o complexo reduzido combina-se com

o oxigênio molecular. Um segundo elétron e dois íons de hidrogênio são adquiridos do sistema doador, produzindo água e o metabólito oxidado, com regeneração do citocromo P - 450 oxidado (BENET *et al.*, 1996).

A maior parte dos fármacos de utilização clínica é metabolizada pelas enzimas do sistema microsomal hepático (BRODIE, GILLETTE, LA DU, 1958). Um grande número de fármacos tem a capacidade de aumentar a atividade enzimática deste sistema. Existem outros fármacos que diminuem a atividade das enzimas presentes nos microsomas. O primeiro fenômeno é denominado de indução enzimática; o segundo é denominado de inibição enzimática (FLECK *et al.*, 1977). A indução enzimática envolve um aumento seletivo na concentração de uma determinada enzima relacionada à concentração de proteína microsomal na célula, enquanto a inibição enzimática implica em uma ação direta sobre a enzima e não envolve alteração na síntese enzimática (PARK & BRECKENRIDGE, 1981).

## 2.2 - Indução enzimática

Historicamente a indução do sistema citocromo P - 450 é reconhecida como um fenômeno que altera aspectos biológicos funcionalmente importantes para o organismo, ou seja, a atividade catalítica das enzimas e as subseqüentes duração e intensidade da resposta farmacológica (OKEY, 1990). RICHARDSON & CUNNINGHAM (1951) publicaram um dos primeiros trabalhos sugerindo a indução de enzimas por xenobióticos. Estes autores observaram que ratas previamente tratadas, por via vaginal, com 3 - metilcolantreno, um hidrocarboneto policíclico, apresentavam menor incidência de câncer de fígado quando expostas a um composto hepatocarcinogênico, o 3' - metil - 4' dimetilaminoazobenzeno, em comparação com ratas não tratadas. Dando prosseguimento a estes estudos, MILLER, MILLER, BROWN (1952) verificaram uma redução acentuada na concentração do composto

hepatocarcinogênico no sangue e no fígado de ratos que haviam recebido 3 - metilcolantreno. Esta redução foi consequência do aumento do metabolismo do composto hepatocarcinogênico devido à indução enzimática no fígado.

CONNAY, MILLER, MILLER (1957) verificaram que a injeção de pequenas quantidades de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como 3 - metilcolantreno, 3,3 - benzopireno e 1,2,5,6 - dibenzantraceno, induz rapidamente um aumento na atividade das enzimas microssomais hepáticas. Os mesmos autores verificaram que os hidrocarbonetos policíclicos aumentam a atividade enzimática pelo aumento da síntese de proteínas. De acordo com CONNEY (1967), o fenobarbital induz um grande número de enzimas do sistema microssomal hepático, responsáveis pelo metabolismo de fármacos. Estudos posteriores identificaram a indução de isoenzimas da sub - família P450IIB (AUSTIN et al, 1988).

Os estudos de biotransformação em animais de laboratório mostram a influência de fatores genéticos, ambientais e fisiológicos. LUBET *et al.* (1992b) compararam a resposta sobre o sistema microssomal hepático de ratos das linhagens Zucker, F344/NCr e DA à administração de fenobarbital e de substâncias estruturalmente correlatas. Em seu estudo verificaram que ratas de linhagem Zucker, tanto obesas como com massa corporal dentro dos limites fisiológicos, apresentavam uma resposta diminuída das reações envolvendo isoenzimas do sistema citocromo P - 450 em relação aos animais das outras linhagens observadas.

CAMPBELL & HAYES (1974) afirmam que a nutrição é um fator determinante na ação dos fármacos. Em primeiro lugar, a ingestão insuficiente de praticamente qualquer nutriente modifica a atividade do sistema microssomal hepático. Em segundo lugar, mesmo alterações muito pequenas na disponibilidade de determinados nutrientes podem levar a diferenças consideráveis na atividade enzimática.

KATO (1967) verificou que a insuficiência crônica de nutrientes avaliados experimentalmente *in vitro* modifica a atividade dos sistemas de metabolização dos fármacos por alterações na estrutura e na composição das membranas microssomais.

KIM, CHOI, WADE (1990), estudando o efeito da dieta sobre a indução de isoenzimas do sistema P - 450 por fenobarbital em ratos, verificaram que, em animais privados de concentrações adequadas de ácidos graxos não saturados, ocorrem modificações no retículo endoplasmático que podem limitar a quantidade e a atividade das isoenzimas. De acordo com estes autores, a falta de resposta à administração de fenobarbital pelos animais submetidos a uma dieta inadequada pode estar relacionada a uma diminuição da eficiência do fenobarbital em inibir a proteinoquinase C. Nos ratos com dieta sem gordura, o aumento da atividade das fosfolipases (A e C) pode elevar os níveis de ácidos graxos intracelulares necessários para processos celulares essenciais, provocando um aumento na concentração de diacilglicerol. Uma vez que o fenobarbital compete com o diacilglicerol pela proteinoquinase C, esta inibição pode ser comprometida severamente em animais privados de ácidos graxos não saturados. Sem uma inibição efetiva da proteinoquinase C pelo fenobarbital, ocorre pouca ou nenhuma indução enzimática, pois a proteinoquinase seria responsável pela fosforilação de uma proteína específica que se liga ao genoma e reprime os genes para isoenzimas induzíveis pelos compostos tipo fenobarbital.

LEVINE & PEREZ (1990) estudaram a influência da idade, sexo, espécie animal e método de sacrifício em ratos, camundongos, cobaias, hamster e coelhos tratados com dimetilaminoazobenzeno (DAB), um composto hepatocarcinogênico reduzido por isoenzimas do sistema P - 450. Verificaram variação considerável na atividade microssomal hepática entre as espécies, sem alteração significativa nas concentrações de citocromo P - 450 por miligrama de proteína. Nos ensaios com microssomas

preparados de fígados de ratos de sexo masculino, a velocidade de redução foi maior do que nas amostras de ratas, até as quatro semanas de vida. A partir desta idade, os valores passaram a se assemelhar. Com exceção dos ratos, as velocidades de redução nos ensaios de cinética nas amostras preparadas de fígados de animais mortos por dióxido de carbono foram muito mais baixas do que nas de animais mortos por decapitação.

JONES & LUBET (1992) descreveram a indução de isoenzimas do sistema P - 450 em primatas não humanos pré - tratados com fenobarbital de forma semelhante aos roedores.

A indução enzimática requer a síntese protéica (OKEY,1990). O autor reforça sua afirmação citando CONNEY, em sua monografia de 1967, quando faz uma extensa revisão do assunto. Naquele texto, CONNEY (1967) considerou a indução como um fenômeno de células intactas e que não poderia ser obtido pela adição direta de indutores nos microssomas hepáticos. Estudos posteriores, como o de DAJAUT *et al.* (1991) e WORTELBOER *et al.* (1991), descrevem a indução enzimática em procedimentos *in vitro*. Estes últimos verificaram que as isoenzimas P450IA1, P450IA2, P450IIA, P450IIC, P450IIIA e P450IVA sofrem o processo de indução em culturas de hepatócitos de ratos, em extensão semelhante à indução *in vivo*. Os resultados não se repetiram em relação às isoenzimas P450IIB1, P450IIB2 e P450IIE. DONATO *et al.* (1990) consideraram a cultura primária de hepatócitos humanos como um modelo importante para caracterização do metabolismo de fármacos pelo fígado e sua resposta aos xenobióticos. IMAOKA *et al.* (1996), considerando que ratos são comumente utilizados como animais experimentais para o estudo do metabolismo de fármacos e de toxicidade em humanos, desenvolveram um método de comparação entre a atividade catalítica de P - 450 recombinantes humanos purificados com os de

ratos em um sistema reconstituído, estabelecendo os níveis de microsomas hepáticos humanos , utilizando um anticorpo específico desenvolvido contra P 450 recombinantes humanos e comparando com os de fígado de ratos.

MAHNKE *et al.* (1996) demonstraram pela primeira vez que isoenzimas da sub-família P450III<sub>A</sub> são induzíveis *in vivo* em leucócitos de ratos e verificaram uma correlação linear com a indução no fígado. Os autores continuam estudos no sentido de identificar as isoenzimas específicas induzíveis nos leucócitos de ratos.

ADESNIK *et al.* (1981) consideraram a transcrição de genes como o mecanismo mais importante na indução do citocromo P - 450. Estes autores detectaram níveis elevados de mRNAs específicos, logo após tratamento de ratos com fenobarbital. TUKEY, NEBERT, NEGISHI (1981) detectaram o mesmo fenômeno depois de tratamento com 3 - metilcolantreno. Existem mecanismos pós - transcricionais que incluem processamento, transporte e estabilidade de mRNA (OKEY, 1990).

CONNERY (1967) relacionou mais de 200 substâncias capazes de estimular a atividade metabólica das enzimas microsomais hepáticas. WATKINS (1990) apresenta os diferentes fármacos relacionando-os com as famílias de citocromo P - 450 às quais servem de substrato. CONNEY (1967), em sua descrição de substâncias indutoras da atividade enzimática, destaca a diversidade da ação farmacológica das mesmas, sugerindo a inexistência de relação tanto entre sua ação quanto entre sua estrutura e sua capacidade de indução. Entre as substâncias capazes de promover a indução do sistema P - 450, CONNEY *et al.* (1960) destacam os barbitúricos, em especial o fenobarbital. CONNEY (1967) diz que a quantidade de indutor necessária para causar um efeito detectável varia muito. Ilustrou sua afirmativa citando experimento nos quais ratos jovens, recebendo fenobarbital na dose de 0,5 mg . kg<sup>-1</sup>,

por via intraperitoneal, duas vezes ao dia, tiveram diminuído o tempo de ação anestésica dos barbitúricos. Com o aumento da dose de fenobarbital obteve resultados mais significativos com diminuição mais acentuada do tempo de ação anestésica. BRECKENRIDGE *et al.* (1973) pré - trataram ratos com seis diferentes doses de fenobarbital durante quatro dias, quando administraram pentobarbital, verificando uma correlação inversa entre dose de fenobarbital e tempo de sono promovido por pentobarbital. HART & FOUTS (1963) descreveram o aumento no metabolismo de fármacos após aplicação rotineira de inseticidas a base de hidrocarbonetos halogenados em gaiolas de ratos, em achado acidental.

CONNAY (1967) dividiu as substâncias capazes de produzir indução enzimática em dois tipos: aquelas que se assemelham ao fenobarbital e as que têm sua ação indutora semelhante aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) . Entre as substâncias que se assemelham ao fenobarbital e estimulam um número elevado de reações, estão outros barbitúricos, a fenitoína, o diclorodifeniltricloroetano (DDT), a fenilbutazona e uma extensa relação de compostos com estrutura química e propriedades farmacológicas diversas. As substâncias tipo PAH estimulam um número menor de reações e tem como protótipo o 3-metilcolantreno, indutor da isoenzima P450IA1. Os indutores mais potentes nesta categoria são altamente tóxicos e carcinogênicos, como o 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo - *p* - dioxina (TCDD) e o 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano, entretanto os indutores tipo PAH, também denominados indutores tipo metilcolantreno (MC), incluem compostos de baixa toxicidade como indóis e flavonas (OKEY, 1990).

SESARDIC *et al.* (1990), ao citar o metabolismo e a ativação de xenobióticos, incluindo compostos tipo PAH em diferentes tecidos extra - hepáticos, afirmam que, apesar da atividade ser freqüentemente mais lenta, a indução seguida de tratamento

com o agente indutor é mais pronunciada do que no fígado. Este fato, associado a uma atividade de biotransformação relativamente baixa, tem sido citado como um fator crítico na determinação da suscetibilidade destes tecidos extra - hepáticos à carcinogenicidade.

OKEY (1990) relacionou os glicocorticóides, o etanol, os proliferadores da peroxisoma e o isosafrol como outras categorias de indutores. O mesmo autor se reportou ao fato de que, tão logo foi descoberta a indução do sistema P - 450, foi levantada a sugestão de que os tecidos e células responsáveis deveriam possuir algum mecanismo para o reconhecimento do agente indutor. ARCOS, CONNEY, BUU-HOI (1961) verificaram que os indutores tipo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos eram moléculas coplanares, medindo entre 850 e 1500 nm. WARTEMBERG, PAGE, LEONG (1968) definiram como propriedades moleculares dos indutores tipo PAH a lipossolubilidade, forma planar ou capacidade de assumir a forma planar, dimensões moleculares similares e distribuição apropriada de cargas com efeito eletrônico otimizado pela substituição do halogênio. Estas propriedades sugeriam, que para um composto ser um bom indutor nesta categoria, deveria existir um local altamente específico na célula, ou seja, um receptor.

POLAND, GLOVER, KENDE (1976) relataram a primeira demonstração experimental do que passou a ser denominado receptor hidrocarboneto aromático (Ah), de acordo com OKEY *et al.* (1979), e receptor TCDD, por GUSTAFSSON *et al.* (1987). Este mecanismo encontrou suporte na relação estrutura - atividade , nas diferenças genéticas em camundongos (POLAND & KNUTSON, 1982) e na genética de células somáticas e biologia molecular (TUKEY *et al.*, 1981). A relação estrutura - atividade é a correlação entre a afinidade de um composto em se ligar ao receptor Ah *in vitro* e a sua potência como indutor do citocromo P - 450IA1 ou de atividades catalíticas

associadas *in vivo*. POLAND & KNUTSON (1982) relataram a existência de certas linhagens de camundongos de mesma raça, denominados geneticamente responsivos, que mostravam uma indução elevada de P - 450 no fígado, quando tratados com hidrocarbonetos policíclicos não - halogenados. Da mesma forma, descreveram a existência de linhagens geneticamente não - responsivas por não mostrarem aumento significativo de P - 450 hepático, mesmo quando tratados com doses elevadas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos não - halogenados. TUKEY *et al.* (1981) demonstraram uma ligação importante entre o receptor Ah e o mRNA quando verificaram que os níveis de P - 450 mRNA nos fígados de camundongos tratados *in vivo* com TCDD eram altamente correlacionados com o conteúdo de complexos TCDD - receptor Ah recuperados dos núcleos do mesmo tecido.

OKEY (1990) enfatizou a predominância da indução tipo fenobarbital no fígado. CHRISTOU, WILSON, JEFCOATE (1987), entretanto, relataram que as isoenzimas P450IIB1 e P450IIB2, induzíveis por compostos tipo fenobarbital, são induzidas, mesmo que em níveis baixos, em diversos tecidos extra - hepáticos.

A indução tipo fenobarbital, à semelhança do mecanismo da indução tipo PAH, requer síntese protéica (CONNEY, 1967). ADESNIK & ATCHINSON (1985) estabeleceram que a velocidade da síntese de proteínas estava relacionada com a velocidade de transcrição dos códigos dos genes para P450IIB1 e P450IIB2, as formas mais induzíveis do sistema P - 450, do tipo fenobarbital no rato. HARDWICK, GONZALEZ, KASPER (1983) demonstraram que o fenobarbital aumenta rapidamente (1 hora) a transcrição nuclear do gene P450IIB1 e dos genes para NADPH - citocromo P - 450 óxido redutase e epóxido hidrase. OKEY (1990), em sua monografia sobre a indução do sistema P - 450, descreveu a dificuldade de explicar o mecanismo de reconhecimento dos indutores tipo fenobarbital pelas células. A hipótese da existência

de um receptor à semelhança do receptor Ah encontra obstáculos e evidências em contrário. A relação estrutura - atividade requer semelhança de tamanho, forma e planaridade dos indutores, como ocorre nos de tipo hidrocarboneto aromático policíclico. Os indutores tipo fenobarbital têm estruturas químicas variadas. O mesmo autor citou a baixa potência relativa dos indutores tipo fenobarbital como outra característica limitante na identificação de um receptor específico. Enquanto na indução do P450IA1 pelo TCDD o indutor é ativo na escala  $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ , os indutores tipo fenobarbital são efetivos em doses na escala  $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Esta baixa especificidade do receptor dificultaria a sua identificação pelos métodos convencionais. POLAND *et al.* (1980), na tentativa de identificar um receptor fenobarbital, sintetizaram o 1,4-bis[2-(3,5dicloropiridiloxi) benzeno] (TCPOBOP), um indutor tipo fenobarbital muito potente em camundongos. O TCPOBOP não agiu como um indutor tipo fenobarbital em ratos e não ocorreu evidência de que interagisse com um receptor específico (POLAND, MAK, GLOVER, 1981). Os mesmos autores, estudando mecanismos alternativos incluíram a possibilidade de que os indutores tipo fenobarbital pudessem agir por meio de suas propriedades físicas, fazendo uma analogia com o mecanismo da anestesia geral. OKEY (1990) citou a inexistência de diferenças genéticas substanciais entre diferentes linhagens de camundongos ou ratos relacionadas com a indução do P - 450 pelo fenobarbital. SIRICA & PITOT (1980) verificaram que os indutores tipo fenobarbital não são muito efetivos em culturas celulares, fazendo com que os experimentos devam ser conduzidos em animais íntegros, onde estudos de genética de células somáticas e linhas de células mutantes não possam ser empregados com facilidade. LUC *et al.* (1996) reafirmam que a administração de fenobarbital e de diversos compostos hidrofóbicos sem relação estrutural é seguida de aumento marcado dos níveis de mRNA e de proteínas, sendo a

indução uma consequência de um aumento na transcrição de genes, embora sem definição de um mecanismo que explique o fenômeno.

Foi verificado que indutores tipo fenobarbital podem induzir formas de P - 450 *in vitro* que são induzidas *in vivo* geralmente pelos indutores tipo PAH (ALTHAUS *et al.*, 1979). NEBERT & GONZALEZ (1987) sugeriram que esta especificidade cruzada aparente de indutor pudesse ser resultado de uma contaminação de estoques de fenobarbital por algum indutor potente e desconhecido do tipo PAH.

LU *et al.* (1972) verificaram que o espectro das atividades catalíticas induzidas pela pregnenolona-16 alfa-carbonitrila (PCN) era diferente daquele induzido pelo fenobarbital e pelo metilcolantreno. ELSHOURBAGY & GUZELIAN (1980) purificaram uma forma de P - 450 induzida por PCN no fígado de ratos e, por meio de critérios bioquímicos, catalíticos e imunológicos, verificaram ser uma forma distinta das induzidas por outros tipos de indutores. Esta isoenzima pode ser induzida por um número muito diverso de compostos , incluindo esteróides, indutores tipo fenobarbital, antibióticos macrolídeos e antifúngicos. Pela diversidade da natureza química dos indutores da isoenzima, o mecanismo de reconhecimento do agente indutor, à semelhança dos compostos tipo fenobarbital, é complexo e permanece pouco conhecido (OKEY, 1990).

LIEBER & DECARLI (1968) e JOLY *et al.* (1973) verificaram que a ingestão ou a inalação de etanol por ratos aumentava a biotransformação de outros compostos e do próprio etanol. KOOP *et al.* (1982) isolaram de fígado de coelho uma forma de P - 450 induzida por etanol, diferente das formas conhecidas. NEBERT & GONZALEZ (1987) localizaram este citocromo na sub - família P450IIE, denominando-o P450IIE1. Esta izoenzima pode ser induzida , além do etanol, por isopropanol, acetona, tricloroetileno, pirazol, imidazol e metilpirazol (OKEY, 1990).

OKEY (1990) denominou de indutores mistos os compostos capazes de promover um tipo de indução semelhante à obtida pela administração simultânea de compostos tipo fenobarbital e PAH. Este fenômeno foi descrito inicialmente por DANNAN *et al.* (1978) e confirmado por ROBERTSON, PARKINSON, SAFE (1980).

Quando uma enzima responsável pelo metabolismo de determinada substância é induzida, esta desaparece de forma mais rápida e seu metabólito é formado mais rapidamente. As conseqüências para o organismo dependem da atividade relativa do composto e de seu metabólito. Quando o metabólito é pouco ativo, a indução enzimática acelera o fim da ação da droga tomando mais rápida a sua inativação (CONNEY, 1967). Isto ocorre com a zoxazolamina (CONNEY *et al.*, 1960), meprobamato (KATO & VASSANELLI, 1962), fenitoína (CUCINELL *et al.*, 1963) e diversos barbitúricos (CONNEY *et al.*, 1960; CONNEY, MICHAELSON, BURNS, 1961). Quando o metabólito produz o mesmo efeito que a droga original e tem potência igual ou maior que esta, a indução enzimática pode intensificar os efeitos pela aceleração da produção do metabólito (CONNEY, 1967). Quando a droga original não é metabolizada pela enzima induzida, não ocorre alteração na duração ou na intensidade de ação, como é o caso do barbital, no rato (BURNS, EVANS, TROUSOF, 1957; CONNEY, *et al.*, 1961). Existem situações em que o composto somente se torna ativo pela biotransformação. WALTON, WOLF, WORKMAN (1992) verificaram que a administração de fenobarbital, pregnenolona-16-alfa-carbonitrila e beta-naftoflavona, em camundongos, ativa a redução de 1,4-dióxido-3-amino-1,2,4-benzotriazina (SR 4233) para 1-óxido-3-amino-1,2,4-benzotriazina. Como a forma reduzida do SR 4233 tem ação antitumoral potente, os autores sugerem a possibilidade do uso terapêutico da indução do metabolismo do SR 4233 no tratamento de neoplasias.

WILLIAMS *et al.* (1991) e CLARK *et al.* (1995) descreveram a inibição pela interleucina - 6 (IL-6) no processo de indução das isoenzimas P450IIB1 e P450IIB2, induzíveis pelo fenobarbital. CLARK *et al.* (1996) têm desenvolvido estudos no sentido de estabelecer o nível de interferência da IL-6 nos processos de síntese e de degradação destas isoenzimas. Os autores, embora não tenham ainda condições de afastar completamente a interferência da IL-6 nos processos de degradação, têm encontrado evidências fortes da inibição da expressão do mRNA das isoenzimas P450IIB1 P450IIB2 pela interleucina-6. Este fato merece importância clínica pela participação da IL-6 na fase aguda dos processos de inflamação ou de infecção (HEINRICH, CASTELL, ANDUS, 1990).

CONNEY (1967) relacionou fármacos que induzem enzimas responsáveis pelo seu próprio metabolismo quando administradas de forma crônica, diminuindo seus efeitos. Incluiu nesta relação o fenobarbital e a fenilbutazona.

### **2.3 - Inibição enzimática**

Os efeitos terapêuticos associados com a inibição enzimática têm recebido muito menos atenção do que aqueles relacionados com a indução enzimática. Entretanto, os efeitos inibidores de substâncias como beta - dietilaminoetil difenilpropilacetato (SKF 525-A) no metabolismo dos fármacos têm sido bem documentados em estudos com animais de laboratório. Estudos *in vitro* indicam que os inibidores podem agir em diferentes fases do processo enzimático do metabolismo dos fármacos (PARK & BRECKENRIDGE, 1981).

MURRAY (1992) estudou o efeito de derivados da fenotiazina sobre os processos de metabolismo enzimático hepático. Em seus resultados identificou a isoenzima P450IIB1 como a mais suscetível à inibição por promazina e clorpromazina. Considerando que estes dois fármacos são importantes no controle de alterações

neurológicas e que o tratamento exige a administração de diferentes compostos, o autor alertou para o risco de toxicidade em decorrência de interações farmacocinéticas.

MCNEIL & MURRAY (1996) detectaram inibição enzimática em ratos tratados com desipramina, com possibilidade de interferência na metabolização de fármacos co-administrados.

ORTIZ DE MONTELLANO (1986) definiu três etapas do ciclo catalítico de citocromo P - 450 como sendo particularmente vulneráveis à inibição: a ligação ao substrato; a ligação ao oxigênio molecular subsequente à primeira transferência de elétron e a fase catalítica, em que o substrato é de fato oxidado.

As isoenzimas do sistema citocromo P - 450 podem ser inibidas pela competição entre substratos, por destruição generalizada, usualmente associada com a peroxidação lipídica, pela ativação catalítica de substratos, transformando-os em compostos que se ligam de maneira firme mas reversível ao átomo de ferro, pela geração de metabólitos que reagem com a estrutura da proteína e pela oxidação catalítica de substratos em intermediários que se ligam de forma covalente ao grupo heme (ORTIZ DE MONTELLANO & CORREIA, 1983).

A eficácia de uma substância inibidora depende de diferentes fatores, entre os quais a magnitude da constante de inibição ( $K_i$ ) do inibidor relativa à constante de Michaelis ( $K_m$ ) do fármaco cujo metabolismo é inibido. A velocidade máxima ( $V_{max}$ ) relativa do metabolismo do inibidor e do fármaco é outro fator a ser levado em conta, pois a capacidade inibidora aumenta à medida que a  $V_{max}$  de metabolismo do inibidor tende para zero (PARK & BRECKENRIDGE, 1981).

Os inibidores do sistema P - 450 podem ser classificados conforme o seu mecanismo em: agentes que se ligam de forma reversível; agentes que formam complexos quase-irreversíveis com o átomo de ferro e agentes que se ligam de forma

irreversível à proteína ou ao grupo heme ou que aceleram a degradação do grupo heme sem aparentemente ligar-se a este (ORTIZ DE MONTELLANO & REICH, 1986). Os mesmos autores estabeleceram que os inibidores que interferem no ciclo catalítico antes da etapa oxidativa são inibidores reversíveis, competitivos ou não - competitivos e os compostos que atuam durante ou após a transferência de oxigênio são geralmente irreversíveis ou quase-irreversíveis, integrando a categoria dos chamados inibidores suicidas. De acordo com ORTIZ DE MONTELLANO & CORREIA (1983), a inativação suicida do citocromo P - 450 hepático impede o metabolismo posterior do próprio composto inibidor e de outras substâncias administradas simultaneamente, podendo alterar a distribuição, retardar a eliminação e prolongar a duração do efeito farmacológico do fármaco ou fármacos co-administrados. No caso de fármacos com índice terapêutico baixo e com predominância de metabolismo pelo citocromo P - 450 hepático, a inibição do sistema microsomal pode resultar em toxicidade. Estas alterações foram bem documentadas por ADAMS, ISAACSON, MASTERS (1977) em experimentos *in vivo* e *in vitro*, nos quais investigaram os efeitos da administração de pentobarbital em ratos pré - tratados com cloranfenicol. Paralelamente às conseqüências indesejáveis da inibição enzimática, HOPKINS, FOROOZESH, ALWORTH (1992), estudando inibidores de isoenzimas do sistema citocromo P - 450 por acetilenos aromáticos policíclicos, verificaram que alterações na estrutura planar do anel aromático policíclico podem produzir inibidores suicidas específicos para determinadas isoenzimas. De acordo com os mesmos autores, um maior desenvolvimento na relação estrutura - atividade nesta área tomaria possível o delineamento de moléculas relativamente simples que seriam inibidores suicidas de isoenzimas específicas. Estas substâncias poderiam funcionar como inibidores efetivos

da ativação metabólica de compostos procarcinogênicos e promutagênicos catalisados por determinadas isoenzimas do sistema citocromo P - 450.

Abordando o aspecto clínico do tema, BENET *et al.* (1996) citam diferentes fármacos capazes de promover a inibição enzimática e seu mecanismo de ação. A inibição de isoenzimas do sistema P - 450 pela quinidina é um exemplo de inibição competitiva. A cimetidina e o cetoconazol inibem o processo oxidativo do metabolismo dos fármacos formando complexos fortes com o ferro do heme do citocromo P - 450. No caso dos antibióticos macrolídeos como a eritromicina, um metabólito deste composto liga-se ao heme. O secobarbital e esteróides sintéticos são exemplos de inibidores suicidas. HALPERT, MILLER, GORSKY (1985) consideram que o cloranfenicol, ao contrário da maioria dos substratos suicidas, inativa o citocromo P - 450 por uma modificação covalente da proteína e não no grupo heme. O cloranfenicol inativa o citocromo P- 450 pela modificação de um ou mais resíduos de lisina na proteína, impedindo a transferência do elétron do NADPH - citocromo P - 450 redutase (HALPERT, 1995).

## **2.4 - Fármacos utilizados ou relacionados com o estudo**

### **2.4.1 - Considerações gerais**

Alterações na biotransformação enzimática de agentes anestésicos podem diminuir ou prolongar a duração da ação do fármaco, dependendo da importância da biotransformação para o término da ação do anestésico, da formação ou não de um metabólito ativo e da ativação ou inibição da biotransformação (HEAVNER, 1996).

CONNAY *et al.* (1960) verificaram que ratos pré - tratados com fenobarbital tinham o tempo de sono produzido pelo tiopental, hexobarbital e pentobarbital diminuído. Os resultados se repetiram quando os ratos recebiam fenilbutazona como

pré-tratamento. A diminuição do efeito anestésico *in vivo* encontrou apoio nos ensaios bioquímicos *in vitro*, incluídos na mesma investigação.

PARK & BRECKENRIDGE (1981) apresentam o fenobarbital como o indutor mais estudado no homem e nos animais, sendo um agente poderoso da indução enzimática na maioria das espécies estudadas. Os mesmos autores, comparando os estudos de indução enzimática com os de inibição enzimática, destacaram que, do ponto de vista dos problemas terapêuticos, esta última tem recebido menos atenção do que a primeira.

MERCER (1980) destacou que o cloranfenicol, apesar de ser considerado de toxicidade elevada em humanos, é pouco tóxico para os animais domésticos.

Os estudos dos efeitos de indução e inibição enzimáticas sobre a ação dos agentes anestésicos têm sido realizados utilizando como protótipo os barbitúricos anestésicos. Trabalhos mais recentes, de AMOUZADEH, SANGIAH, QUALLS (1989), NOSSAMAN, AMOUZADEH, SANGIAH (1990) e RODER *et al.* (1993), verificaram a ação de substâncias indutoras e inibidoras do sistema enzimático microsomal sobre a anestesia promovida pela associação de xilazina e cetamina em diferentes espécies de animais domésticos e de laboratório.

#### **2.4.2 - Fenobarbital**

O fenobarbital (ácido 5-fenil-5-etilbarbitúrico) é um sedativo e anticonvulsivante de longa duração sintetizado em 1912. Devido a sua importância clínica e a seus efeitos adversos, o fenobarbital tem sido investigado em detalhes, servindo como protótipo de um grupo de compostos que apresentam, entre outros efeitos farmacológicos, a indução do sistema microsomal hepático, a proliferação do retículo endoplasmático liso, a hipertrofia hepática e as interações medicamentosas (LUBET *et al.*, 1992a). O mecanismo de ação pelo qual o fenobarbital inibe as

manifestações clínicas de epilepsia envolvem a potencialização da inibição sináptica por meio da ação em receptores GABA - A (MCNAMARA, 1996).

A absorção oral do fenobarbital é completa mas lenta. A concentração máxima no plasma acontece várias horas após uma única dose. Cerca de 40 a 60% ligam-se às proteínas plasmáticas e o fármaco se liga em proporção semelhante aos tecidos, incluindo o cérebro. Até 25% da dose administrada sofre eliminação renal pH-dependente em forma inalterada, sendo o restante inativado pelo sistema microssomal hepático. O fenobarbital sofre hidroxilação das cadeias laterais alifáticas, tendo como metabólito principal o derivado para-hidroxifenílico, inativo e excretado pela urina. Outro metabólito importante é o derivado N-glicosídeo. O fenobarbital tem meia-vida plasmática de aproximadamente 100 horas em seres humanos adultos (MC NAMARA, 1996). Os efeitos colaterais do fenobarbital são bastante conhecidos, sendo o mais evidente a sedação. Podem ocorrer nistágmo e ataxia com doses elevadas (MATTSON *et al.* 1985).

O fenobarbital tem sido utilizado, em medicina veterinária, no controle da epilepsia em cães, com doses diárias orais que variam de 12 a 16 mg . kg<sup>-1</sup> de massa corporal (SCHWARTZ-PORSCHKE, LÖSCHER, FREY, 1982).

A interação medicamentosa do fenobarbital com outros compostos tem sido estudada desde o início da década de 1960, quando CONNEY *et al.* (1960) verificaram que o pré-tratamento de ratos com fenobarbital estimulava a atividade de enzimas microssomais hepáticas responsáveis pelo metabolismo da zoxazolamina, fenilbutazona, hexobarbital, aminopirina e 3-4 benzopireno. Naquele estudo, verificaram que ratos pré - tratados com fenobarbital tiveram o período médio de sono produzido por hexobarbital diminuído de 216 minutos no grupo controle para 11 minutos no grupo tratado. Observaram que o máximo de aumento da atividade

enzimática, de três a 10 vezes os valores basais, só ocorreu após a terceira administração diária, no mínimo. Os fígados dos ratos tratados com fenobarbital tiveram seus pesos aumentados em 20 a 30 %, ocorrendo também aumento nas proteínas do fígado, com os valores médios dos grupos controle subindo de 11,5 mg de proteína por grama de fígado para até 17,4 mg de proteína por grama de fígado, dependendo do grupo.

PIEL, ALDRETE, JONES (1969) verificaram que ratos pré - tratados com fenobarbital, na dose de 30 mg . kg<sup>-1</sup> de massa corporal, via intraperitoneal, duas vezes ao dia, durante quatro dias consecutivos, tiveram os tempos de sono produzidos pela administração de pentobarbital, tiopental, zoxazolamina, cetamina, diazepam e gama – hidroxibutirato diminuídos significativamente quando comparados com os do grupo controle. Os autores consideraram o período de ausência de reflexo de endireitamento como tempo de sono.

ADAMS *et al.* (1977) compararam com o grupo controle o período de sono produzido por pentobarbital em camundongos tratados com fenobarbital durante quatro dias consecutivos, verificando que os animais que haviam recebido fenobarbital tiveram tempos de sono três vezes menores do que os dos não tratados.

MÉNARD, BERTELOOT, HUGON (1974) estudaram a ação do fenobarbital na atividade enzimática e na ultraestrutura do fígado de ratos. Em sua investigação, os ratos foram pré - tratados , por períodos de um a sete dias, com injeções diárias de fenobarbital, na dose de 100 mg . kg<sup>-1</sup> de massa corporal, por via intraperitoneal. A glicose-6-fosfatase foi escolhida como a enzima marcadora para o retículo endoplasmático. A atividade específica da glicose-6-fosfatase atingiu o nível mínimo após três dias de administração de fenobarbital, retornando então aos valores normais, apesar da administração da droga continuar por mais quatro dias. A concentração de

proteínas hepáticas aumentou significativamente, com valores 30 % mais elevados nos animais tratados em comparação ao grupo controle. Após a terceira administração de fenobarbital, os hepatócitos centrolobulares apresentaram uma proliferação intensa de retículo endoplasmático liso com partículas de glicogênio dispersas. Os hepatócitos perilobulares se apresentaram normais, sem proliferação do retículo endoplasmático liso e com áreas grandes de glicogênio.

#### 2.4.3 - Fenilbutazona

A fenilbutazona (3,5-dioxo-1,2-*n*-butilpirazolidina) é um antiinflamatório não - esteróide, sintetizado em 1949, muito usado em medicina veterinária. A fenilbutazona age por inibição da atividade das cicloxigenases e da subsequente atividade de conversão do ácido araquidônico em metabólitos de prostaglandinas. Ocorrendo o antagonismo da enzima, e sendo este antagonismo reversível, seu efeito perdura enquanto houver concentração terapêutica. A biotransformação da fenilbutazona inclui reações de hidroxilação dos anéis fenil na porção butil da cadeia e glicorinidação, tendo como metabólito principal a oxifembutazona, com efeitos farmacológicos, usos terapêuticos e efeitos toxicológicos essencialmente semelhantes aos da fenilbutazona (INSEL, 1996). A fenilbutazona apresenta meia - vida plasmática variável conforme a espécie, sendo de seis horas no rato, duas a seis horas no porco e seis horas no cão (BOOTH, 1988).

BOOTH (1988) destacou que a inibição de prostaglandinas por antiinflamatórios não - esteróides não só produz ações antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas, como também é responsável por seus efeitos adversos. O mesmo autor recomenda, para cães, a dose de 44 mg . kg<sup>-1</sup> por dia, por via oral, não ultrapassando a dose máxima de 800 mg por animal, por dia, independente do peso do animal.

Em trabalhos experimentais, estudando o efeito estimulador do sistema microsomal hepático, foram utilizadas doses de  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , via intraperitoneal, em ratos, e de 25 a  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via oral, e de  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intraperitoneal, em cães (BURNS, CONNEY, KOSTER, 1963).

CONNEY *et al.* (1960) estudaram a indução enzimática ocasionada pela administração de fenobarbital, barbital, aminopirina, fenilbutazona, 3,4-benzopireno e orfenadrina em ratos. Neste trabalho, verificaram que microsomas hepáticos de ratos pré - tratados com fenilbutazona, aminopirina ou 3,4-benzopireno aumentavam sua capacidade de metabolizar estas mesmas drogas. Em observações *in vivo*, utilizaram a zoxazolamina, um agente capaz de produzir paralisia, em ratos pré - tratados com as diferentes drogas citadas. No caso específico da fenilbutazona, verificaram que o tempo de paralisia diminuiu de 730 minutos nos ratos do grupo controle para 307 minutos nos ratos do grupo tratado. Quando foi utilizado fenobarbital no pré-tratamento, o tempo de paralisia diminuiu para 102 minutos. Quando observaram o tempo de sono produzido pelo hexobarbital, encontraram períodos médios de 216 minutos no grupo controle, 36 minutos no grupo barbital, 26 minutos no grupo aminopirina, 23 minutos no grupo orfenadrina, 18 minutos no grupo fenilbutazona e 11 minutos no grupo fenobarbital.

BURNS *et al.* (1963) estudaram os efeitos da administração crônica de drogas sobre as enzimas do sistema microsomal hepático, em ratos e cães. A fenilbutazona foi administrada em ratos, na dose diária de  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , durante quatro dias. No quinto dia, os ratos recebiam hexobarbital e os períodos de sono eram medidos e comparados aos do grupo controle e aos dos grupos que haviam recebido outras drogas indutoras. Os resultados foram semelhantes aos obtidos por CONNEY *et al.* (1960).

WATKINS (1990) cita a fenilbutazona como indutor de isoenzimas das sub - famílias P450IIC e P450IIIA em humanos.

ZBINDEN (1980) descreveu aumento centrolobular e aumento da atividade mitótica em lâminas de tecido hepático de ratos tratados com 200 mg . kg<sup>-1</sup> de fenilbutazona, durante quatro dias.

#### **2.4.4 - Cloranfenicol**

O cloranfenicol é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces venezuelae*, um microrganismo isolado pela primeira vez de uma amostra de solo colhida na Venezuela, em 1947. O cloranfenicol é, na atualidade, um composto sintético lipossolúvel formado por um anel nitro aromático e uma cadeia lateral alifática, o D(-)-threo-2-dicloroacetamido-1-p-nitrofenil-1,3-propanediol (SMITH & WEBER, 1983).

Devido a seu baixo custo, amplo espectro antibacteriano, disponibilidade em preparações tópicas e sistêmicas, o cloranfenicol tem tido amplo uso em medicina veterinária, desde que foi colocado comercialmente. Porém as reações adversas que têm sido descritas em seres humanos, têm originado restrições a seu uso em animais de consumo (PAGE, 1991).

O cloranfenicol nunca foi liberado para uso em animais produtores de alimentos nos Estados Unidos da América do Norte (SETTEPANI, 1984). No Reino Unido, o uso do cloranfenicol em animais tem sido restrito a situações em que não exista outro agente efetivo disponível (BRITISH VETERINARY ASSOCIATION, 1976). No Reino Unido a preocupação maior em restringir o uso do cloranfenicol em animais tem sido no sentido de diminuir as possibilidades de acelerar a evolução de cadeias de patógenos humanos resistentes ao cloranfenicol e não por sua toxicidade em seres humanos (PAGE, 1991).

O cloranfenicol é um inibidor potente da síntese protéica microbiana sendo que nas células de mamíferos a síntese de proteínas é pouco afetada. Exceção é feita pela inibição da síntese de proteínas mitocondriais nas células da medula óssea, responsável por alguns de seus efeitos adversos (WATSON, 1991). A ação do cloranfenicol é principalmente bacteriostática, sendo ativo contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, riquetsias, micoplasma e clamídia. O cloranfenicol é bactericida para *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* (YUNIS, 1988).

O cloranfenicol apresenta boa biodisponibilidade após administração oral em cães. A absorção é rápida, obtendo-se concentrações significativas no plasma em 30 minutos e pico em três horas. A administração do succinato sódico de cloranfenicol em solução aquosa apresenta uma disponibilidade sistêmica melhor do que a suspensão aquosa de cloranfenicol ou soluções do fármaco em solventes orgânicos. A biodisponibilidade por via parenteral foi considerada excelente por WATSON (1991).

Em média, 39,5 % e 35,1 % de cloranfenicol se ligam de forma reversível às proteínas, respectivamente, no cão e no porco (DAVIS *et al.*, 1972).

O cloranfenicol é metabolizado em grande parte no fígado pela conjugação com ácido glicurônico ou redução em aril aminas. Estes metabólitos são inativos e excretados principalmente na urina e em pequena quantidade na bile. Apenas 6 % de uma dose oral em cães é excretada como antibiótico ativo na urina (WATSON, 1991).

Apesar de ser considerado muito tóxico para seres humanos, o cloranfenicol apresenta baixa toxicidade nos animais domésticos (MERCER, 1980). Devido aos possíveis efeitos tóxicos, o cloranfenicol deve ser evitado em fêmeas gestantes, neonatos e animais com insuficiência hepática (WATSON, 1991).

TESKE & CARTER (1971) utilizaram dose de  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , via intramuscular, em trabalho experimental sobre a influência da administração prévia de cloranfenicol sobre o tempo de sono em cães submetidos à anestesia com pentobarbital. Em trabalho semelhante com ratos, ADAMS (1970) havia utilizado dose de  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intraperitoneal.

O cloranfenicol pode inibir a biotransformação de drogas, podendo potencializar ou prolongar a ação de barbitúricos, fenitoína, varfarina e digoxina (MERCER, 1980).

ADAMS & DIXIT (1970) estudaram o tempo de duração do efeito do pentobarbital, traduzido em tempo de sono, em cães pré - tratados com cloranfenicol, administrado pelas vias intravenosa e intramuscular. Neste trabalho destacaram a freqüência do uso pré - cirúrgico de antibióticos. Consideraram como tempo de anestesia, o período compreendido entre a perda e o retorno do reflexo de endireitamento. O tempo de anestesia foi, em média 113 %, maior em cães que haviam recebido cloranfenicol uma hora antes do barbitúrico em comparação com o grupo controle, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Quando o antibiótico foi administrado imediatamente antes do pentobarbital, o tempo de anestesia foi 120 % mais longo do que no grupo controle, sendo estatisticamente significativo. Os cães tratados com cloranfenicol não apresentaram um nível de anestesia mais profundo do que os cães dos grupos controle.

TESKE & CARTER (1971) compararam a duração da anestesia por pentobarbital em cães que haviam recebido cloranfenicol por via oral, duas horas antes e imediatamente antes do barbitúrico, e por via intramuscular, duas horas antes da administração do anestésico. Outro grupo de cães recebeu cloranfenicol em administração contínua, durante a anestesia, por via intravenosa. Em um último grupo foi simulada uma situação clínica, com administração diária de cloranfenicol, durante

quatro dias, e anestesia sete dias após o término do tratamento com o antibiótico. Todos os grupos foram comparados com controles. Os animais dos grupos que receberam cloranfenicol duas horas antes da anestesia tiveram o tempo de sono aumentado significativamente. Os resultados da administração contínua de cloranfenicol foram dose - dependentes. O grupo submetido a uma situação de simulação clínica apresentou tempo de sono significativamente mais longo quando comparado ao controle, mas não apresentou diferença significativa dos grupos tratados com dose única de cloranfenicol. Os autores sugeriram a ocorrência de inibição enzimática e destacaram o fato de que as concentrações capazes de causar inibição são bem mais baixas do que as doses terapêuticas.

ADAMS (1970) estudou a duração da anestesia por barbitúricos em animais de experimentação, incluindo ratos, tendo considerado como tempo de anestesia o intervalo entre a perda e o retorno do reflexo de endireitamento, com os ratos mantidos em decúbito dorsal. O cloranfenicol foi administrado na dose de  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intraperitoneal, e, 10 minutos após, os ratos foram anestesiados com pentobarbital, hexobarbital ou barbital. O grupo controle recebeu solução salina ao invés do antibiótico. Os resultados foram expressos como percentuais do grupo controle. Desta forma, o cloranfenicol aumentou a anestesia por pentobarbital para 263 % e a anestesia pelo hexobarbital para 530 % do valor médio do grupo controle. A anestesia por barbital durou 88 % do tempo médio do grupo controle, o que se explica pela pouca metabolização do barbital no fígado, sendo excretado quase sem alterações pela urina. O autor estendeu a possibilidade de que outros compostos, além dos estudados, possam ter seu tempo de ação prolongado pela administração de cloranfenicol, desde que esta duração esteja na dependência do metabolismo hepático.

ADAMS *et al.* (1977) estudaram a ação do cloranfenicol sobre as enzimas do sistema microsomal hepático em camundongos. Os animais eram pré - tratados com o antibiótico e anestesiados com pentobarbital. O tempo médio de anestesia foi significativamente mais prolongado nos animais do grupo pré - tratado com cloranfenicol em comparação com os do grupo controle. Os ensaios *in vitro*, incluindo concentração de proteínas microsomais, concentração de citocromo P - 450 e redução de NADPH - citocromo C, não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle.

HALPERT *et al.* (1985) estudaram o mecanismo da inativação pelo cloranfenicol da isoenzima P450IIB2 do fígado do rato (induzível pelo fenobarbital). A investigação foi concentrada na relação entre a perda de atividade da monoxigenase e a inabilidade do citocromo para interagir funcionalmente com a NADPH - citocromo P - 450 redutase. Os resultados foram consistentes com a hipótese de que a ligação dos metabólitos do cloranfenicol aos resíduos de aminoácidos da isoenzima bloqueia o transporte de elétrons da NADPH - citocromo P - 450 redutase, levando a uma perda de atividade da monoxigenase. Esta hipótese encontrou apoio em FUGINO *et al.* (1990) que, estudando quatro anticorpos monoclonais para isoenzimas P - 450 induzíveis pelo fenobarbital, verificaram que dois dos anticorpos estudados impediram de forma completa a transferência de elétrons pela NADPH - citocromo P - 450 redutase.

NOSSAMAN *et al.* (1990) investigaram os efeitos de cloranfenicol, cimetidina e fenobarbital na duração da anestesia cirúrgica induzida pela associação de xilazina e cetamina em cães. Os animais experimentais, em número de 20, foram separados em grupos de cinco. O grupo controle recebeu xilazina na dose de  $1,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intravenosa, e, 10 minutos após, cetamina na dose de  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via

intravenosa. Os cães de cada um dos outros grupos receberam cloranfenicol (33 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intravenosa), cimetidina (5 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intravenosa) e fenobarbital (15 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intravenosa), respectivamente, 15 minutos, 24 horas e 96 horas, antes da anestesia com xilazina e cetamina, com protocolo semelhante ao do grupo controle. A administração de cloranfenicol e de cimetidina não alterou significativamente o tempo de anestesia. No grupo tratado com fenobarbital, houve redução significativa no tempo de duração da anestesia.

AMOUZADEH *et al.* (1989) estudaram os efeitos da administração de cloranfenicol, cimetidina, cetoconazol, beta - dietilaminoetil difenilpropilacetato (SKF 525-A) e fenobarbital sobre a anestesia por xilazina e cetamina em ratos. O cloranfenicol foi administrado na dose de 100 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intraperitoneal, 60 minutos antes dos ratos serem anestesiados com xilazina (21 mg . kg<sup>-1</sup>) e cetamina (45 mg . kg<sup>-1</sup>), por via intramuscular. Os animais tratados com cloranfenicol apresentaram um tempo de ausência de reflexo de endireitamento significativamente mais longo do que os ratos do grupo controle, o mesmo acontecendo com os pré - tratados com as outras substâncias, exceto fenobarbital. Os ratos tratados com este último não apresentaram diferença significativa, quanto a tempo de ausência de reflexo, em comparação com o grupo controle.

RODER *et al.* (1993) ampliaram os estudos sobre a ação de indutores e inibidores enzimáticos, incluindo metilcolantreno e rifampim entre os compostos testados, sobre a anestesia por xilazina e cetamina em pintos e camundongos. Os inibidores enzimáticos foram administrados às duas espécies. Fenobarbital foi administrado apenas nos pintos. Os pintos tratados com SKF 525-A, cloranfenicol, cimetidina e cetoconazol tiveram tempos de anestesia significativamente mais longos do que os do grupo controle. O fenobarbital não alterou o tempo de sono nos pintos.

Nos camundongos nenhum dos inibidores utilizados no pré-tratamento apresentou resultados significativos quanto a tempo de anestesia por xilazina e cetamina. Os autores, comparando resultados dos três trabalhos, sugerem diferentes formas de metabolismo entre as espécies. Na situação em especial dos cães, levantaram a hipótese de dose - dependência na inibição das isoenzimas do sistema citocromo P - 450.

#### 2.4.5 - Cetamina

A cetamina - cloridrato de ciclohexanona 2-(*o*-clorofenil)-2-(metilamino) - foi descrita pela primeira vez por CHEN, em 1965, como um composto de ação cataléptica, analgésica e anestésica, sem propriedades hipnóticas.

A cetamina produz uma anestesia denominada dissociativa, definida como um estado de dissociações funcional e eletrofisiológica entre os sistemas talamo - neocortical e límbico (CORSSSEN, MIYASAKA, DOMINO, 1968).

Após administração intravenosa de cetamina, apenas 4 % da dose pode ser recuperada da urina na forma não - modificada ou como norcetamina e 16 % aparecem como derivados hidroxilados. Menos de 5 % são excretados pelas fezes (WIEBER, GUGLER, HENGSTMANN, 1975).

A cetamina tem uma meia-vida de 17 minutos para a Fase I e mais de quatro horas para a Fase II. Os valores de farmacocinética parecem não ser dose-dependentes (CLEMENTS & NIMMO, 1981).

A via metabólica predominante da cetamina envolve sua N - desmetilação pelas enzimas do sistema citocromo P - 450, formando a norcetamina, metabólito I, que pode ser hidroxilada em uma ou mais posições do anel ciclo - hexanona, formando compostos hidroxi - norcetamina que podem ser conjugados para derivados glicuronídeos mais hidrossolúveis, metabólito II. A cetamina pode ainda passar por

hidroxilação do anel sem prévia N – desmetilação, mas esta via é quantitativamente de pouca importância (WHITE, WAY, TREVOR, 1982).

A cetamina tem sido utilizada em diferentes doses e associações com outros fármacos para a promoção de contenção química e anestesia cirúrgica em gatos, cães, equinos, cabras, ovelhas, porcos, répteis, pássaros e animais selvagens (LÖSCHER, GANTER, FASSBINDER, 1990).

Nos porcos, pode ser utilizada isoladamente, para indução da anestesia, na dose de  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intramuscular (WRIGHT, 1982). THURMON, NELSON, CHRISTIE (1972) utilizaram doses de  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para a realização de procedimentos cirúrgicos e de  $13,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intramuscular, para coleta de sêmen por eletroejaculação, em porcos. Estes autores, no entanto, reconhecem uma série de aspectos limitantes ao uso isolado de cetamina em porcos, incluindo pouco miorelaxamento, curta duração do efeito analgésico e possibilidade de hiperexcitabilidade durante o período de recuperação. Isto tem feito com que uma diversidade grande de fármacos, como sedativos, analgésicos e miorelaxantes, venham sendo testados para administração prévia ou concomitante à cetamina.

PIEL *et al.* (1969) investigaram a ação de um indutor enzimático, no caso o fenobarbital, e de um inibidor enzimático, o SKF 525-A, sobre o tempo de sono produzido por diferentes agentes anestésicos e hipnóticos, incluindo a cetamina. Verificaram que a cetamina, administrada na dose de  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  em ratos controle, produziu um período médio de ausência de reflexo de endireitamento de 21 minutos. Em ratos pré - tratados com fenobarbital ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , duas vezes ao dia, durante quatro dias), o período de ausência de reflexo caiu para oito minutos em média. Quando os ratos eram pré - tratados com SKF 525-A ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 60 minutos antes

da anestesia), o tempo de ausência de reflexo se prolongou para 64 minutos, em média. Nenhum dos dois pré-tratamentos modificou o tempo de início de anestesia. Neste estudo foram utilizados ratos de sexo masculino, de quatro a seis semanas de vida, com pesos variando entre 50 e 60 gramas.

COHEN & TREVOR (1974) verificaram que o pré-tratamento de ratos com fenobarbital aumentava em cinco vezes a velocidade de metabolização da cetamina pelo tecido hepático *in vitro* e que a administração prévia de SKF 525-A inibia o metabolismo em 35 % e prolongava a meia vida da droga *in vivo*. Não detectaram, no entanto, alterações no tempo de ausência de reflexo de endireitamento, embora o fenobarbital tenha diminuído e o SKF 525-A tenha aumentado o tempo de duração da ataxia pós - anestésica e de retorno à ambulação. No estudo foi utilizada dose de 40 mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina, administrada por via intravenosa, em ratos de sexo masculino, pesando entre 100 e 200 gramas.

MARIETTA *et al.* (1976), estudando a auto - indução do metabolismo da cetamina em ratos pré - tratados com a própria droga (40 mg . kg<sup>-1</sup> por dia, durante três dias) , fenobarbital e SKF 525-A, concluíram que a redistribuição da droga e o metabolismo hepático têm papel proeminente nos efeitos farmacológicos centrais da cetamina, administrada na dose de 30 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intravenosa, . Enquanto o metabolismo hepático mostrou maior importância no tempo de duração dos efeitos pós - anestésicos como ataxia, analgesia e ambulação, a redistribuição do cérebro para os outros tecidos foi responsável pelo tempo de duração da ausência de reflexo de endireitamento. Verificaram ainda que o pré-tratamento com cetamina aumentou o metabolismo hepático *in vitro* e a velocidade de diminuição dos níveis da droga após sua administração intravenosa. Não encontraram alteração no tempo de duração da

anestesia, mas ocorreu diminuição significativa nos tempos de duração dos eventos pós - anestésicos, como ataxia, analgesia e ambulação.

LIVINGSTON & WATERMAN (1978) trataram ratos com cetamina durante 10 dias, com doses diárias de  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intraperitoneal. No décimo primeiro dia, os ratos foram anestesiados com cetamina na dose de  $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , via intraperitoneal, sendo observado o tempo de ausência de reflexo de endireitamento. Após a morte dos animais experimentais, foram realizados ensaios de metabolismo *in vitro*. Constataram que o tempo de ausência de reflexo nos ratos previamente tratados diminuiu significativamente em comparação com o dos ratos do grupo controle. Esta redução de efeito *in vivo* foi acompanhada de uma diminuição mais rápida dos níveis de cetamina e de seu metabólito I na circulação e no cérebro e de aumento subsequente de metabólito II. Da mesma forma, a transformação da droga para metabólito I em homogenados de fígado de ratos pré - tratados com cetamina foi mais rápida. Os autores, baseados na correlação entre os resultados *in vivo* e *in vitro*, sugeriram que a indução enzimática seria o fator principal no desenvolvimento de tolerância à cetamina.

BREE, PARK, SHORT (1975) descreveram aumento significativo do tempo de ausência de reflexo de endireitamento em gatos que haviam recebido cloranfenicol na dose de  $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via intramuscular, 24 horas antes da anestesia por cetamina.

#### **2.4.6 - Xilazina**

Xilazina – cloridrato de 2(2,6-dimetilfenilamino)-4H-5,6-diidro-1,3-tiazina - é um composto sintetizado na Alemanha em 1962, com propriedades analgésicas, sedativas e miorelaxantes (CLARKE & HALL, 1969). A xilazina é um potente agonista adrenérgico alfa - 2 (BOOTH, 1988). A xilazina tem absorção rápida com meia -vida variando de três a seis minutos, após administração intramuscular. A xilazina sofre metabolismo rápido, produzindo cerca de 20 metabólitos em ratos, sendo que apenas

8 % da droga aparecem inalterados na urina. A biotransformação da xilazina envolve a cisão oxidativa ou hidrolítica do anel tiazina (BOOTH, 1988).

A xilazina potencializa os efeitos de todos os sedativos, catalépticos, anestésicos dissociativos e agentes anestésicos, devendo ser utilizada criteriosamente quando em combinação com drogas destes grupos. Entretanto a xilazina é uma droga eficaz e relativamente segura e tem sido usada em combinação com diferentes neurolépticos, narcóticos, sedativos e barbitúricos para anestesia de curta duração na maioria dos animais domésticos e em muitas espécies de animais silvestres (KNIGHT, 1980). A xilazina mostra diferentes níveis de efeito, conforme a espécie animal, a dose e a via de administração utilizadas (CLARKE & HALL, 1969). Quando administrada isoladamente são preconizadas, no cão, doses de 0,1 a 1,0 mg . kg<sup>-1</sup>, via intravenosa, e 1,0 a 2,0 mg . kg<sup>-1</sup>, via intramuscular, e no porco 1,0 a 2,0 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intramuscular (KNIGHT, 1980). No rato, a xilazina tem sido utilizada preferencialmente em associação com outras drogas. MOHAMMAD, AHMED, KASSIM (1989) utilizaram xilazina isoladamente em ratos, em administrações intraperitoniais de 1,0 a 6,0 mg . kg<sup>-1</sup>, com a finalidade de verificar o efeito da ioimbina sobre a diurese induzida pela xilazina. VAN PELT (1977) administrou xilazina em ratos na dose de 26 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intramuscular, verificando efeito máximo entre 10 e 25 minutos. Colocando os ratos em decúbito dorsal, verificou que os animais faziam tentativas de movimento, mantendo reflexo corneal reduzido e reflexo podal vigoroso.

#### **2.4.7 - Associação xilazina - cetamina**

A relação dos fármacos utilizados em associação com a cetamina é longa, mas a xilazina tem sido o preferido em condições clínicas. A xilazina melhora as condições de analgesia e miorelaxamento e previne a hiperexcitabilidade durante o período de recuperação da anestesia pela cetamina (THURMON, TRANQUILLI, BENSON, 1986).

Em nosso meio, associação de xilazina e cetamina para promoção da anestesia foi descrita, pela primeira vez, por VOLL, WENTZ, WALD (1975) em cães. Naquele estudo, usaram doses de 1,0 a 2,0 mg . kg<sup>-1</sup> de xilazina e 10,0 a 20,0 mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina, por via intramuscular, em 90 cães.

HASKINS, PATZ, FARVER (1986), administrando xilazina e cetamina, nas doses de 1,0 mg . kg<sup>-1</sup> e de 10,0 mg . kg<sup>-1</sup>, respectivamente, por via intravenosa, com intervalo de cinco minutos, em cães, obtiveram um período médio de ausência de reflexo de endireitamento de 32,00 ± 6,00 minutos.

VAN PELT (1977) afirmou que tanto a xilazina como a cetamina não se mostraram adequadas para promover anestesia em ratos, quando administradas como droga única. Administrando simultaneamente as duas drogas, obteve anestesia em plano cirúrgico, com doses de 13 mg . kg<sup>-1</sup> de xilazina e 87mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina, por via intramuscular.

Têm sido preconizadas diferentes doses nos estudos da associação de xilazina e cetamina em ratos. STICKROD (1979), trabalhando com ratas em gestação, usou doses de 10 mg . kg<sup>-1</sup> de xilazina e de 80 mg . kg<sup>-1</sup> e 90 mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina em dois grupos de animais experimentais, não constatando anormalidades nos filhotes, incluindo duas gerações. MULDER & MULDER (1979), utilizando camundongos e estendendo seus resultados para ratos, usaram doses de 50 mg . kg<sup>-1</sup> de cada uma das drogas. KOMULAINEN & OLSON (1991) optaram por doses de 15 mg . kg<sup>-1</sup> de xilazina e de 85 mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina. .

MASSONE (1994) recomendou doses de 20 mg . kg<sup>-1</sup> de xilazina e 50 mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina, administradas simultaneamente por via intravenosa, em ratos. SILVA

FILHO *et al.* (1994) utilizaram doses semelhantes por via intraperitoneal, em ratos com massa corporal de 213 gramas, em média. Neste estudo, os tempos médios de início de ausência de reflexo de endireitamento e de ausência de reflexo foram de  $2,78 \pm 1,04$  e de  $63,83 \pm 17,42$  minutos, respectivamente.

SAKAGUCHI *et al.* (1995) administraram xilazina e cetamina, em porcos, nas doses de  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  e  $10,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectivamente, por via intramuscular. Os fármacos foram administrados isoladamente, com precedência da xilazina, seguida de cetamina, 15 minutos após. Em seu estudo obtiveram um período médio de ausência de reflexo de endireitamento de  $34,6 \pm 17,2$  minutos, com retorno à ambulação  $11,0 \pm 4,0$  minutos em média, após o retorno do decúbito esternal. O tempo médio de início de perda de reflexo, medido a partir da administração de cetamina, foi de  $4,0 \pm 6,0$  minutos.

Os estudos de AMOUZADEH *et al.* (1989), NOSSAMAN *et al.* (1990) e RODER *et al.* (1993) foram os primeiros trabalhos tratando da interação medicamentosa e os efeitos da anestesia por xilazina e cetamina. Os autores, no entanto, deram ênfase às variáveis *in vivo*, não tendo incluído estudos de cinética.

#### **2.4.8 - Ensaio bioquímicos relacionados com o estudo**

O preparo de microssomas hepáticos está bem descrito por GUENGERICH (1994).

Os ensaios para medida da concentração de citocromo P - 450 e de redução de NADPH - citocromo C requerem determinação prévia da concentração de proteínas microssomais hepáticas. LOWRY *et al.* (1951) descreveram um método para determinação de proteínas que tem sido muito utilizado.

O ensaio clássico de medida de concentração de citocromo P - 450 por miligrama de proteína foi descrito por OMURA & SATO (1964 a, 1964b) e, desde

então, tem sido utilizado pelos pesquisadores como rotina de laboratório no estudo das isoenzimas do sistema citocromo P - 450.

A NADPH - citocromo C redutase é uma flavoproteína presente no fígado. DEBETHIZY & HAYES (1994) consideram mais apropriada a denominação de NADPH - citocromo P - 450 redutase, embora reconhecendo ser mais conhecida pela primeira denominação.

A redução de NADPH - citocromo C é medida de forma conveniente pelo método utilizado por PHILLIPS & LANGDON (1962).

DALVI, GAWAI, DALVI (1991) determinaram os valores de concentração de proteínas microsossomais, concentração de citocromo P - 450 e redução de NADPH - citocromo C, em ratos. Os valores encontrados foram de  $19,01 \pm 0,64$  mg de proteínas por grama de fígado,  $0,47 \pm 0,02$  nmoles de citocromo P - 450 por mg de proteína e  $114,47 \pm 6,75$  nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos por minuto por mg de proteína. Estes resultados se aproximam dos obtidos por KNODELL *et al.* (1982), que encontraram 0,470 nmoles de citocromo P - 450 por mg de proteína e 138 nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos por minuto, por mg de proteínas, em amostras de microsossomas hepáticos preparados a partir de fígados humanos.

SHORT & STITH (1973), estudando o desenvolvimento perinatal da atividade microsossomal hepática em porcos, detectaram concentração média de 0,70 nmoles de citocromo P - 450 por mg de proteína e valores entre 90,0 e 100,0 nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos por minuto, por mg de proteína, em animais com seis semanas de vida.

MASTERS, WILLIAMS, KAMIN (1967), ao descreverem o preparo de microsossomas hepáticos de porcos em larga escala, encontraram valores entre 8,5 e 11,0 mg de proteínas por grama de fígado.

### 3 – OBJETIVOS E HIPÓTESES

#### 3.1 - Objetivo geral

Estudar a interação medicamentosa envolvendo fármacos anestésicos em ratos, cães e porcos.

#### 3.2 - Objetivos específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da administração de fenilbutazona sobre a anestesia promovida pela associação de xilazina e cetamina em ratos, cães e porcos.

2. Avaliar o efeito da administração de cloranfenicol sobre a anestesia promovida pela associação de xilazina e cetamina em ratos, cães e porcos.

3. Avaliar o efeito da administração de fenilbutazona e de cloranfenicol sobre a atividade enzimática do sistema citocromo P - 450 (velocidade de redução de NADPH - citocromo C) em ratos, cães e porcos anestesiados com xilazina e cetamina, correlacionando com resultados de tempo de anestesia.

4. Comparar o efeito dos fármacos no tempo de anestesia e atividade enzimática nos três grupos animais.

#### 3.3 - Hipótese conceitual

A administração prévia de fenilbutazona e cloranfenicol interfere nas variáveis bioquímicas relacionadas com a indução e a inibição enzimáticas e alteram o tempo de anestesia por xilazina e cetamina em ratos, cães e porcos.

#### 3.4 - Hipóteses operacionais

3.4.1 O tempo de início de ausência de reflexo de endireitamento, em ratos, cães e porcos anestesiados com xilazina e cetamina, é igual em grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou cloranfenicol.

3.4.2 O tempo de ausência de reflexo de endireitamento, em ratos, cães e porcos anestesiados com xilazina e cetamina, é igual em grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou cloranfenicol.

3.4.3 O tempo de retorno à ambulação, em porcos anestesiados com xilazina e cetamina, é igual em grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou cloranfenicol.

3.4.4 O peso dos fígados de ratos anestesiados com xilazina e cetamina é igual em grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou fenilbutazona.

3.4.5 A concentração de hepática de proteínas, a concentração de citocromo P – 450 e a velocidade de redução de NADPH-citocromo C em ratos, cães e porcos anestesiados com xilazina e cetamina, é igual em grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou cloranfenicol.

3.4.6 A correlação entre velocidade de redução de NADPH – citocromo C e tempo de ausência de reflexo de endireitamento, em ratos, cães e porcos anestesiados com xilazina e cetamina, nos grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou cloranfenicol, é igual a zero.

3.4.7 A correlação entre tempo de ausência de reflexo de endireitamento e tempo de retorno à ambulação, em porcos anestesiados com xilazina e cetamina, nos grupos previamente tratados e não tratados com fenilbutazona ou cloranfenicol, é igual a zero.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Animais experimentais

Foram utilizados 54 ratos Wistar, 18 cães e 18 porcos, todos de sexo masculino.

Os ratos, com idade média de 12 semanas, eram originários do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os ratos foram mantidos sob ciclo claro:escuro de 12 horas. Receberam ração e água "*ad libitum*".

Os cães, com idades estimadas entre dois e seis anos, sem raça definida, de sexo masculino, eram originários do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

Os porcos, com idade média de 12 semanas, cruzamento de raças Landrace e Duroc, de sexo masculino, foram adquiridos em estabelecimento produtor, localizado no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

#### 4.1.1 – Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado a partir de projeto piloto, com ratos, utilizando como variável o tempo de ausência de reflexo de endireitamento.

Para  $\alpha = 0,05$  e poder estatístico de 80%, supondo um coeficiente de variação de 14% (projeto piloto) e esperando uma diferença detectável de 25% no tempo de sono entre os grupos estudados em ratos, o tamanho da amostra (n) foi calculado em seis indivíduos por grupo.

No presente estudo, número maior de ratos foi utilizado prevendo perdas durante os procedimentos experimentais e proporcionando material suficiente para os ensaios bioquímicos.

#### 4.2 - Fármacos e reagentes

Nos procedimentos *in vivo* foram utilizados cloridrato de xilazina (Rompun<sup>®</sup>), cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>®</sup>), fenilbutazona (Equipalazone<sup>®</sup>), succinato sódico de cloranfenicol (Quemicetina Succinato<sup>®</sup>) e solução fisiológica (Solução Fisiológica<sup>®</sup>).

Nos procedimentos *in vitro* foram utilizados cloreto de potássio, [hidroximetil]amino-metano ácido clorídrico (Trizma HCl), ácido etileno diamino tetra - acético (EDTA), ditioneitol, pirofosfato de sódio, acetato de sódio, glicerol, albumina sérica bovina, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, tartarato de sódio potássio, sulfato de cobre, reagente de Folin<sup>®</sup>, ditionita, monóxido de carbono, fosfato de potássio, NADPH (B-NAD fosfato tetrassódico tipo I<sup>®</sup>) e citocromo C<sup>®</sup>.

Os fármacos e reagentes em grau de pureza PA (para análise) foram adquiridos comercialmente.

#### 4.3 - Doses e vias de administração

A xilazina e a cetamina foram administradas simultaneamente, na mesma seringa, respectivamente, nas doses de 20 mg . kg<sup>-1</sup> e 50 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intraperitoneal, nos ratos, e 1 mg . kg<sup>-1</sup> e 10 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intravenosa, nos cães e porcos.

A fenilbutazona foi administrada na dose de 125 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intraperitoneal, nos ratos, e na dose de 25 mg . kg<sup>-1</sup> nos cães e porcos, por via intravenosa e intraperitoneal, respectivamente.

O cloranfenicol foi administrado na dose de 100 mg . kg<sup>-1</sup>, por via intraperitoneal, nos ratos, e na dose de 50 mg . kg<sup>-1</sup> nos cães e porcos, por via intravenosa e intraperitoneal, respectivamente.

Foram estabelecidas diluições que permitissem volumes iguais dos diferentes fármacos por kg de massa corporal, por espécie animal. A solução fisiológica foi administrada no volume correspondente a cada espécie, pela via intravenosa nos cães e pela via intraperitoneal nos ratos e nos porcos.

#### **4.4 - Procedimentos *in vivo***

##### **4.4.1 - Ratos**

Os procedimentos *in vivo* com ratos foram realizados no laboratório do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, no turno da manhã, a partir das sete horas, em temperatura ambiente.

Os 54 ratos foram separados em três grupos, denominados:

- I. grupo controle (CTL) – composto por 18 ratos que receberam solução fisiológica por cinco dias antes do experimento proposto;
- II. grupo fenilbutazona (FBZ) – composto por 18 ratos que receberam esse fármaco por cinco dias antes do experimento proposto;
- III. grupo cloranfenicol (CLF) – composto por 18 ratos que receberam esse fármaco por cinco dias antes do experimento proposto;

Com a finalidade de controle de vieses, em experimento piloto, foram comparados dois grupos. Em um deles, os ratos não receberam qualquer tipo de substância, exceto alimento e água. No outro, foi administrado álcool benzílico, substância contida na formulação da fenilbutazona. Não se observaram diferenças quanto às variáveis de interesse para este estudo (dados não apresentados).

Os ratos dos três grupos, após jejum prévio de 12 horas, foram pesados no primeiro dia e, a seguir, anestesiados com xilazina e cetamina. Foram observados e anotados os tempos de início e de duração de ausência de reflexo de endireitamento. Foi considerado tempo de ausência de reflexo de endireitamento, o período

compreendido entre a perda do tônus postural e o retorno da capacidade de adoção de decúbito esternal. Este período também foi denominado de tempo de anestesia e tempo de sono. Os dados foram registrados em minutos e frações de minuto. Foi considerado um período máximo de 15 minutos de observação para casos em que eventualmente os animais não perderam o reflexo de endireitamento.

No período decorrido entre o primeiro dia e o quinto dia, os animais foram mantidos em suas caixas – moradia, não sendo submetidos a qualquer procedimento, que não a pesagem. Fez-se isso para permitir a recuperação dos animais após anestesia com xilazina e cetamina.

A partir do sexto dia, os ratos passaram a receber administrações diárias de solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol, conforme o grupo, durante cinco dias. Todos os ratos foram pesados diariamente.

No décimo dia, 60 minutos após a administração de solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol, os ratos foram anestesiados com xilazina e cetamina, seguindo o protocolo do primeiro dia. Os procedimentos do décimo dia foram realizados com os ratos em jejum alimentar de 12 horas.

Imediatamente após o retorno da anestesia, os ratos foram mortos por deslocamento da articulação atlanto - occipital e exsangüinados por secção dos vasos cervicais.

Na Figura 1, é apresentado o modelo experimental proposto.

Dia 1	Dias 2 a 5	Dias 6 a 9	Dia 10
← PESAGEM DIÁRIA →			
Anestesia com xilazina e cetamina	Sem administração de qualquer substância, exceto alimento e água	Uso diário de: solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol	Solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol ↓ 60 minutos ↓ Anestesia com xilazina e cetamina

FIGURA 1 – Desenho experimental proposto.

#### 4.4.2 Cães e porcos

Os procedimentos *in vivo*, em cães e porcos, foram realizados no Hospital de Clínicas Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS, no turno da manhã, a partir das sete horas, em temperatura ambiente.

Os cães e porcos foram separados em grupos controle, fenilbutazona e cloranfenicol, à semelhança dos ratos, sendo cada grupo composto de seis animais.

No primeiro dia do experimento, após jejum alimentar de 12 horas, os animais foram pesados e receberam xilazina e cetamina. Foram observados tempos de início e de duração de ausência de reflexo de endireitamento. Nos porcos foram observados os tempos de retorno à ambulação. Os dados obtidos foram registrados em minutos e fração de minuto. O período entre a perda de reflexo de endireitamento e seu retorno foi considerado tempo de anestesia.

A partir do sexto dia, os animais receberam administrações diárias de solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol, de acordo com o grupo.

No décimo dia, com os animais em jejum alimentar de 12 horas, e 60 minutos após a administração de solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol, os mesmos foram anestesiados com xilazina e cetamina, seguindo o protocolo utilizado no primeiro dia do experimento.

Após o registro da última variável, os porcos foram mortos por exsanguinação e os cães com pistola Hauptner<sup>®</sup>, específica para eutanásia e exsangüinados por secção dos vasos cervicais.

#### **4.5 - Procedimentos *ex vivo***

##### **4.5.1 - Ratos**

Após a abertura da cavidade abdominal pela linha média, os fígados foram localizados e perfundidos, por meio da veia porta, com uma solução de cloreto de potássio 1,15 M, pH 7,4, refrigerada a 4° C. Os fígados foram pesados individualmente, reunidos em *pool* por grupo e por experimento e, mantidos na mesma solução utilizada para a perfusão, submetidos à preparação de microssomas hepáticos.

##### **4.5.2 - Cães e porcos**

A cavidade abdominal foi aberta pela linha média e localizado o fígado.

Uma amostra de cada fígado, pesando 25 gramas, foi mantida na mesma solução de cloreto de potássio utilizada nos ratos.

#### **4.6 - Procedimentos *in vitro***

Os procedimentos para avaliar a atividade enzimática foram realizados no Centro de Biotecnologia da UFRGS e incluíram preparo dos microssomas hepáticos, determinação de proteínas hepáticas, determinação da concentração de citocromo P - 450 por miligrama de proteína e determinação da velocidade de redução de NADPH - citocromo C.

#### 4.6.1 - Preparo dos microsomas hepáticos

O preparo dos microsomas hepáticos foi processado com base em técnica citada por GUENGERICH (1994).

Os fígados, reunidos em *pool* por grupo de ratos, em cada experimento, e em amostras individuais de 25 gramas nos cães e porcos, foram fracionados com tesoura cirúrgica, sendo as frações lavadas sucessivamente com a mesma solução utilizada na perfusão, até a obtenção de um líquido sobrenadante claro, sem a presença aparente de hemácias. Após desprezar este líquido, as frações eram imersas em solução com volume de três vezes o seu peso em gramas, contendo cloreto de potássio 0,15 M; Trizma HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 0,2 M e ditioneitol 1 M. As frações de fígado de ratos foram homogeneizadas em homogeneizador de Pötter e as de cães e porcos em homogeneizador TEKMAR TR - 10<sup>®</sup>. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga Sorvall<sup>®</sup> RC 5, com rotor GSA, a 10.500 rotações por minuto (rpm), durante 30 minutos. O sobrenadante resultante de cada tubo foi centrifugado, na mesma centrífuga, com rotor SS 34, a 13.000 rpm, durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram centrifugados em centrífuga Hitachi Himac<sup>®</sup> CP 70 G, em rotor Sorvall<sup>®</sup> A-641, a 32.000 rpm, durante 60 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em solução de Trizma HCl, 100 mM, pH 7,5; pirofosfato de sódio 100 mM; acetato de sódio, 100 mM e EDTA 1mM, pH 8,2, ajustando o pH da solução para 7,4 e centrifugados, na mesma centrífuga, com rotor 875, a 34.000 rpm, durante 60 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em solução de Trizma HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA, 1 mM; ditioneitol 1mM e glicerol 20 %, acondicionados em tubos Eppendorf, em aliquotas de 0,4 mL por ampola e congelados a - 20° C.

#### 4.6.2 - Determinação de proteínas hepáticas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método descrito por LOWRY *et al.* (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Este método utiliza, como reagentes hidróxido de sódio, carbonato de sódio, tartarato de sódio, sulfato de cobre e reagente de Folin. Cada amostra foi completada com água destilada para atingir um volume de 0,4 mL. Após adição de uma solução de carbonato de sódio, hidróxido de sódio, tartarato de sódio e sulfato de cobre, as amostras eram homogeneizadas e mantidas em repouso por 10 minutos. A seguir as amostras eram adicionadas de 0,25 mL de reagente de Folin e novamente mantidas em repouso por 30 minutos. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia LKB®, com comprimento de onda de 750 nanômetros. Os resultados obtidos foram calculados em miligramas de proteína por grama de fígado.

#### 4.6.3 - Determinação da concentração de citocromo P - 450

A determinação da concentração de citocromo P-450 foi realizada em espectrofotômetro UV - 160 A, Shimadzu®, em varredura, com absorvância entre 400 e 500 nm, em um tempo de 200 segundos, conforme descrito por OMURA & SATO (1964a). Cada amostra foi diluída em Trizma HCl 0,1 M, pH 7,4, na proporção de 2 mg de proteína por mL de amostra, completando o volume para 4 mL. Foram utilizadas duas cubetas de quartzo, sendo colocado um mL de solução em cada uma. A cubeta contendo o que se denominou amostra recebeu monóxido de carbono, em borbulhamento, durante um minuto e 30 segundos. O conteúdo da outra cubeta se constituiu no "branco". Imediatamente foram adicionadas 3 mg de ditionita ao conteúdo das duas cubetas e procedida a leitura, sendo observados o valor máximo de absorvância e o comprimento de onda no qual ocorreu. A concentração de citocromo P - 450 de cada amostra foi obtida dividindo a absorvância pelo fator 91 e multiplicando

por  $10^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Os resultados obtidos corresponderam à concentração de citocromo P - 450 por mL de amostra. Como cada amostra continha 2 mg de proteína, os valores foram divididos por dois, obtendo-se o resultado em nmoles de citocromo P - 450 por miligrama de proteína.

#### **4.6.4 - Determinação da velocidade de redução de NADPH - citocromo C**

Para determinação da velocidade de redução de NADPH - citocromo C, foi utilizada solução tampão de fosfato de potássio 0,05 M e EDTA  $1 \cdot 10^{-4}$  M, pH 7,7; citocromo C e NADPH. O citocromo C foi diluído na proporção de 4,44 mg por 1000  $\mu\text{L}$  da solução tampão e o NADPH, na proporção de 1  $\mu\text{M}$  para 660  $\mu\text{L}$  da solução tampão. Na cubeta denominada branco foram colocados 1000  $\mu\text{L}$  de tampão, 100  $\mu\text{L}$  de citocromo C e 20  $\mu\text{L}$  da amostra. Na cubeta denominada amostra, foram colocados 980  $\mu\text{L}$  de tampão, 100  $\mu\text{L}$  de citocromo C, 20  $\mu\text{L}$  da amostra e 100  $\mu\text{L}$  de NADPH. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia LKB®, com comprimento de onda de 550 nm, em temperatura ambiente. O cálculo foi efetuado conforme PHILLIPS & LANGDON (1962), dividindo a absorbância em 60 minutos por 0,021 e obtendo-se assim o resultado em nmoles de NADPH-citocromo C reduzidos por minuto. Dividindo este resultado pela quantidade de proteína existente em 20  $\mu\text{L}$  de amostra, foi obtida a velocidade de redução em nmoles de NADPH-citocromo C reduzidos por minuto, por miligrama de proteína.

Os resultados de concentração de proteínas hepáticas, concentração de citocromo P- 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C para cada amostra foram obtidos pela média de dois ensaios por amostra.

#### 4.7 Delineamento

O trabalho se constituiu em um estudo experimental.

#### 4.8 - Análise estatística

A análise estatística foi processada em programa SigmaStat® (Jandell, San Raphael, Ca., USA).

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Na comparação entre os resultados dos grupos animais foram utilizados percentuais do grupo controle.

Foram utilizados os testes de ANOVA de uma via, seguidos do teste de Student-Newman-Keuls (SNK), quando apropriado, e teste de correlação de Pearson (SHAVELSON, 1988).

As variáveis obtidas nos procedimentos *in vivo* foram comparadas entre os grupos, por espécie animal, antes e após os tratamentos, por ANOVA.

As variáveis relacionadas com os ensaios bioquímicos foram comparadas entre os grupos, por espécie animal, após o tratamento, utilizando ANOVA de uma via.

Foram calculados os coeficientes de correlação entre variáveis, sendo verificada a existência ou não de correlação pelo teste de Pearson.

Foram consideradas significativas as diferenças cuja probabilidade de erro  $\alpha$  fosse menor do que 5 % ( $P < 0,05$ ).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - Ratos

Os valores médios dos tempos de início de ausência de reflexo de endireitamento nos grupos controle, fenilbutazona e cloranfenicol, antes e após o tratamento, estão relacionados na Tabela 1. Os dados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, nem antes nem após os tratamentos. Três ratos do grupo fenilbutazona não perderam o reflexo de endireitamento após o tratamento.

Ocorreram seis óbitos entre o terceiro e o oitavo dias de tratamento, sendo um no grupo controle, dois no grupo fenilbutazona e três no grupo cloranfenicol. As necrópsias dos seis ratos indicaram peritonite como *causa mortis*.

TABELA 1 - Tempo de início de ausência de reflexo de endireitamento de ratos anestesiados com xilazina e cetamina, antes (pré) e após (pós) tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol. Valores médios  $\pm$  desvio padrão em minutos.

GRUPO	N	PRÉ <sup>a</sup>	PÓS <sup>a</sup>
CONTROLE	17	3,23 $\pm$ 1,39	3,50 $\pm$ 1,21
FENILBUTAZONA	16	4,22 $\pm$ 2,53	3,57 $\pm$ 2,19
CLORANFENICOL	15	4,12 $\pm$ 1,09	3,15 $\pm$ 1,21

N = número de ratos por grupo.

a = diferença não - significativa por ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ .

Os valores médios dos tempos de ausência de reflexo de endireitamento estão relacionados na Tabela 2. O valor médio do tempo de ausência de reflexo de endireitamento, antes do tratamento, não diferiu entre os grupos. Após tratamento, diminuiu significativamente no grupo fenilbutazona, em comparação com os grupos controle e cloranfenicol. No grupo cloranfenicol ocorreu aumento significativo em relação aos outros dois grupos. Se analisados em números percentuais, observa-se uma redução no tempo de ausência de reflexo de endireitamento de 45,17% no grupo fenilbutazona, e um aumento de 53,51% no grupo cloranfenicol após tratamento, em comparação com os valores do grupo controle.

TABELA 2 - Tempo de ausência de reflexo de endireitamento de ratos anestesiados com xilazina e cetamina, antes (pré) e após (pós) tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol. Valores médios  $\pm$  desvio padrão em minutos.

GRUPO	N	PRÉ <sup>a</sup>	PÓS <sup>b</sup>
CONTROLE	17	62,32 $\pm$ 16,97	62,054 $\pm$ 9,18
FENILBUTAZONA	16	57,66 $\pm$ 20,21	34,020 $\pm$ 21,31 <sup>c</sup>
CLORANFENICOL	15	59,91 $\pm$ 19,95	95,26 $\pm$ 30,57 <sup>c</sup>

N = número de ratos por grupo.

a = diferença não – significativa entre grupos por ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ .

b = diferença significativa por ANOVA de uma via,  $P < 0,05$ .

c = diferença significativa em relação aos demais grupos pelo teste SNK,  $P < 0,05$ .

Os valores médios dos pesos dos fígados estão relacionados na Tabela 3. A média dos pesos dos fígados dos ratos do grupo fenilbutazona foi significativamente mais elevada do que as médias dos grupos controle e cloranfenicol.

TABELA 3 - Peso dos fígados de ratos após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina. Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

GRUPO	N	PESO <sup>a</sup> (GRAMAS)
CONTROLE	17	9,12 $\pm$ 1,55
FENILBUTAZONA	16	10,37 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>
CLORANFENICOL	15	8,43 $\pm$ 2,42

N = número de ratos por grupo.

a = diferença significativa por ANOVA de uma via, P<0,05.

b = diferença significativa em relação aos demais grupos pelo teste SNK, P<0,05.

Os valores médios das concentrações de proteínas por grama de fígado, das concentrações de citocromo P - 450 e das velocidades de redução de NADPH - citocromo C estão relacionados na Tabela 4.

TABELA 4 - Concentração de hepática de proteínas, concentração de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C de ratos após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina. Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

GRUPO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS <sup>a</sup> (mg/grama de fígado)	CONCENTRAÇÃO DE CITOCROMO P - 450 <sup>c</sup> (nmoles/mg de proteína)	VELOCIDADE DE REDUÇÃO NADPH-CITOCROMO C <sup>a</sup> (nmoles/cit. C reduzidos/min./mg proteína)
CONTROLE	14,46 $\pm$ 4,06	0,726 $\pm$ 0,103	123,23 $\pm$ 20,85
FENILBUTAZONA	25,74 $\pm$ 5,25 <sup>b</sup>	0,831 $\pm$ 0,124	175,12 $\pm$ 25,73 <sup>b</sup>
CLORANFENICOL	15,82 $\pm$ 2,78	0,576 $\pm$ 0,304	93,19 $\pm$ 6,10

N = Três *pools* de 5 a 6 fígados por grupo.

a = diferença significativa por ANOVA de uma via, P<0,05.

b = diferença significativa em relação aos demais grupos, pelo teste SNK, P<0,05.

c = diferença não - significativa por ANOVA de uma via, P>0,0

Os valores das concentrações de proteínas por grama de fígado apresentaram diferenças significativas entre o grupo fenilbutazona e os grupos controle e cloranfenicol. Em termos percentuais, a média da concentração de proteínas no grupo fenilbutazona foi 74,33 % mais elevada em comparação ao grupo controle.

Os valores médios das concentrações de citocromo P - 450 não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos.

A velocidade de redução de NADPH - citocromo C foi significativamente maior no grupo fenilbutazona quando comparada com a dos grupos controle e cloranfenicol. Em análise em percentual, verificou-se um aumento de 42,11 % na velocidade de redução no grupo fenilbutazona, em relação ao grupo controle. Em uma análise similar, o grupo cloranfenicol mostrou uma atividade cinética 24,38 % menor do que a do grupo controle, sem, no entanto, apresentar significância estatística.

O coeficiente de correlação entre velocidade de redução de NADPH - citocromo C e tempo de ausência de reflexo de endireitamento, após tratamento, foi de  $r^2 = -0,841$ , representando uma correlação inversa forte e estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 Cães

Nos cães não foi possível mensurar o início da perda de reflexo de endireitamento, já que os 18 animais perderam o tônus postural durante a injeção intravenosa da associação de xilazina e cetamina.

Os valores médios dos tempos de ausência de reflexo de endireitamento estão relacionados na Tabela 5.

TABELA 5 - Tempo de ausência de reflexo de endireitamento de cães anestesiados com xilazina e cetamina, antes (pré) e após (pós) tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol. Valores médios  $\pm$  desvio padrão em minutos.

GRUPO	PRÉ <sup>a</sup>	PÓS <sup>b</sup>
CONTROLE	26,66 $\pm$ 5,13	30,00 $\pm$ 13,21
FENILBUTAZONA	30,05 $\pm$ 8,94	27,16 $\pm$ 5,42
CLORANFENICOL	29,50 $\pm$ 12,85	60,67 $\pm$ 24,33 <sup>c</sup>

N = 6 cães em cada grupo.

a = diferença não - significativa por ANOVA de uma via, P>0,05.

b = diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via, P<0,05.

c = diferença significativa em relação aos demais grupos, pelo teste SNK, P<0,05.

Previamente ao tratamento, não houve diferença significativa. No grupo cloranfenicol, ocorreu um aumento significativo do tempo de ausência de reflexo, em relação aos outros dois grupos, após o tratamento. Em números percentuais, o aumento foi de 100 % em comparação com o grupo controle. No grupo fenilbutazona houve uma variação de aproximadamente 10 % no tempo de ausência de reflexo, em comparação com o grupo controle, após o tratamento.

Os valores médios das concentrações de proteínas, concentrações de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C encontram-se relacionados na Tabela 6.

Os valores médios das concentrações de proteínas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Em números percentuais, o valor médio no grupo fenilbutazona foi 54,65 % mais elevado do que no grupo controle. A diferença entre os grupos cloranfenicol e controle foi de 19,27 % para mais no grupo tratado com o antibiótico.

O valor médio da concentração de citocromo P - 450 no grupo fenilbutazona foi significativamente mais elevado do que os valores médios dos outros grupos, representando um aumento de 255,74 % em relação ao grupo controle.

A média dos valores de velocidade de redução de NADPH - citocromo C obtidos no grupo fenilbutazona foi significativamente mais elevada do que as médias dos grupos controle e cloranfenicol, representando uma diferença de 54,24 % em relação ao grupo controle.

Os números do grupo controle apresentaram uma amplitude de 43,23 nmoles, com um valor máximo de 139,21 nmoles e um valor mínimo de 95,98 nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos por minuto, por miligrama de proteína. No grupo fenilbutazona, os números oscilaram entre 136,34 e 233,08 nmoles, com uma amplitude de 96,74 nmoles. No grupo cloranfenicol, a amplitude foi de 71,28, com uma oscilação entre 82,869 e 154,152 nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos por minuto, por miligrama de proteína. Não houve correlação entre velocidade de redução e tempo de ausência de reflexo de endireitamento, considerados os resultados dos três grupos ( $P > 0,05$ ).

TABELA 6 - Concentração hepática de proteínas, concentração de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH – citocromo C de cães após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina. Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

GRUPO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS <sup>a</sup> (mg/grama de fígado)	CONCENTRAÇÃO DE CITOCROMO P – 450 <sup>b</sup> (nmoles/mg de proteína)	VELOCIDADE DE REDUÇÃO NADPH- CITOCROMO C <sup>b</sup> (nmoles/cit. C reduzidos/min./mg proteína)
CONTROLE	10,43 $\pm$ 0,60	0,653 $\pm$ 0,214	113,64 $\pm$ 15,18
FENILBUTAZONA	16,13 $\pm$ 11,54	2,232 $\pm$ 1,129 <sup>c</sup>	175,28 $\pm$ 37,09 <sup>c</sup>
CLORANFENICOL	12,44 $\pm$ 7,55	0,852 $\pm$ 0,205	112,37 $\pm$ 28,53

N = 6 cães por grupo.

a = diferença não - significativa por ANOVA de uma via, P>0,05.

b = diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via, P<0,05.

c = diferença significativa em relação aos demais grupos, pelo teste SNK, P<0,05.

### 5.3 - Porcos

Não foi possível mensurar o início de perda de reflexo pois todos os porcos perderam o tônus postural durante a administração da associação de xilazina e cetamina.

Os valores médios dos tempos de ausência de reflexo de endireitamento encontram-se relacionados na Tabela 7. Em valores percentuais, após o tratamento, o grupo fenilbutazona apresentou uma diminuição de 20,97 % e o grupo cloranfenicol um aumento de 29,48 % no tempo de ausência de reflexo de endireitamento, em relação ao grupo controle, sem, no entanto, haver diferença estatisticamente significativa.

TABELA 7 - Tempo de ausência de reflexo de endireitamento em porcos anestesiados com xilazina e cetamina, antes (pré) e após (pós) tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol.  
Valores médios  $\pm$  desvio padrão em minutos.

GRUPO	PRÉ <sup>a</sup>	PÓS <sup>a</sup>
CONTROLE	16,00 $\pm$ 5,42	17,50 $\pm$ 4,85
FENILBUTAZONA	19,66 $\pm$ 6,80	13,83 $\pm$ 4,02
CLORANFENICOL	17,33 $\pm$ 4,36	22,66 $\pm$ 9,11

N = 6 porcos por grupo.

a = diferença não - significativa por ANOVA de uma via, P>0,05.

Os valores médios e desvio padrão do tempo de retorno à ambulação encontram-se relacionados na Tabela 8. Não houve diferença significativa entre os três grupos.

Ocorreu uma correlação positiva forte entre esta variável e o tempo de ausência de reflexo de endireitamento, antes do tratamento ( $r^2 = 0,882$ ) e após o tratamento ( $r^2 = 0,847$ ), ( $P < 0,05$ ).

TABELA 8 - Tempo de retorno à ambulação de porcos anestesiados com xilazina e cetamina, antes (pré) e após (pós) tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol.  
Valores médios  $\pm$  desvio padrão em minutos.

GRUPO	PRÉ <sup>a</sup>	PÓS <sup>a</sup>
CONTROLE	24,17 $\pm$ 7,88	23,83 $\pm$ 5,74
FENILBUTAZONA	29,00 $\pm$ 5,25	20,83 $\pm$ 5,49
CLORANFENICOL	23,83 $\pm$ 8,18	27,33 $\pm$ 8,77

N = 6 porcos por grupo.

a = diferença não - significativa por ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ .

Os valores médios dos resultados das concentrações de proteínas, concentrações de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH - citocromo C encontram-se relacionados na Tabela 9.

As diferenças entre os valores médios de concentração de proteínas não foram significativas entre os três grupos. O grupo fenilbutazona apresentou um aumento de 13,40 % em relação ao grupo controle. No grupo cloranfenicol, ocorreu uma diminuição de 33,47 % em relação ao valor médio obtido no grupo controle.

Os valores médios das concentrações de citocromo P - 450 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Os valores médios de velocidade de redução de NADPH - citocromo C apresentaram diferenças significativas na comparação entre os três grupos. O grupo fenilbutazona apresentou uma velocidade média de redução de 135,07 nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos por minuto por miligrama de proteína. Este valor, comparado ao do grupo controle, que foi de 111,49 nmoles de NADPH - citocromo C reduzidos, representou um aumento percentual de 21,14. O grupo cloranfenicol, com uma velocidade de redução de 78,24 nmoles por minuto por miligrama de proteína, teve uma diminuição da ordem de 29,82 por cento em relação ao controle.

Nos porcos ocorreu correlação inversa regular, estatisticamente significativa, entre ausência de reflexo de endireitamento e velocidade de redução de NADPH - citocromo C por minuto por miligrama de proteína, com  $r^2 = - 0,571$  ( $P < 0,05$ ).

TABELA 9 - Concentração hepática de proteínas, concentração de citocromo P - 450 e velocidade de redução de NADPH – citocromo C de porcos após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina. Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

GRUPO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS <sup>a</sup> (mg/grama de fígado)	CONCENTRAÇÃO DE CITOCROMO P – 450 <sup>a</sup> (nmoles/mg proteína)	VELOCIDADE DE REDUÇÃO DE NADPH – CITOCROMO C <sup>b</sup> (nmoles/cit.c reduzidos/min./mg proteína)
CONTROLE	9,92 $\pm$ 1,94	0,704 $\pm$ 0,071	111,49 $\pm$ 11,50
FENILBUTAZONA	11,25 $\pm$ 6,79	0,705 $\pm$ 0,269	135,07 $\pm$ 15,37 <sup>c</sup>
CLORANFENICOL	6,60 $\pm$ 2,64	0,885 $\pm$ 0,371	78,24 $\pm$ 4,29 <sup>c</sup>

N = 6 porcos por grupo.

a = diferença não - significativa por ANOVA de uma via, P>0,05.

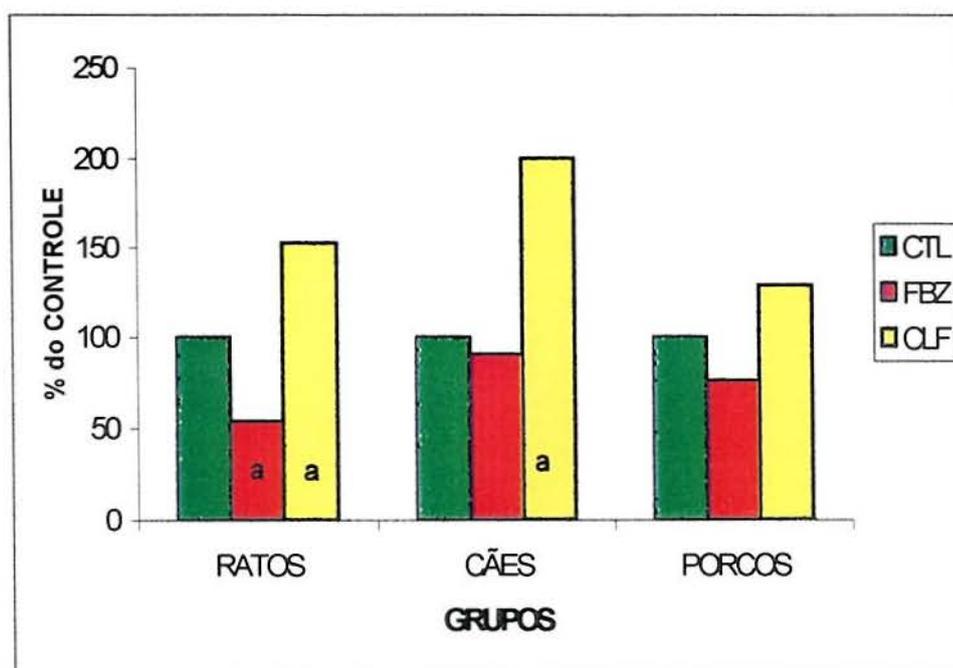
b = diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via, P<0,05.

c = diferença significativa em relação aos demais grupos, pelo teste SNK, P<0,05.

#### **5.4 - Resultados comparativos entre os grupos animais**

O tempo de ausência de reflexo de endireitamento, a concentração hepática de proteínas e a velocidade de redução de NADPH – citocromo C foram escolhidos como variáveis a ser apresentadas em estudo comparativo entre os diferentes grupos animais, por se constituírem nas observações mais freqüentes em estudos semelhantes e pela importância clínica de que se revestem.

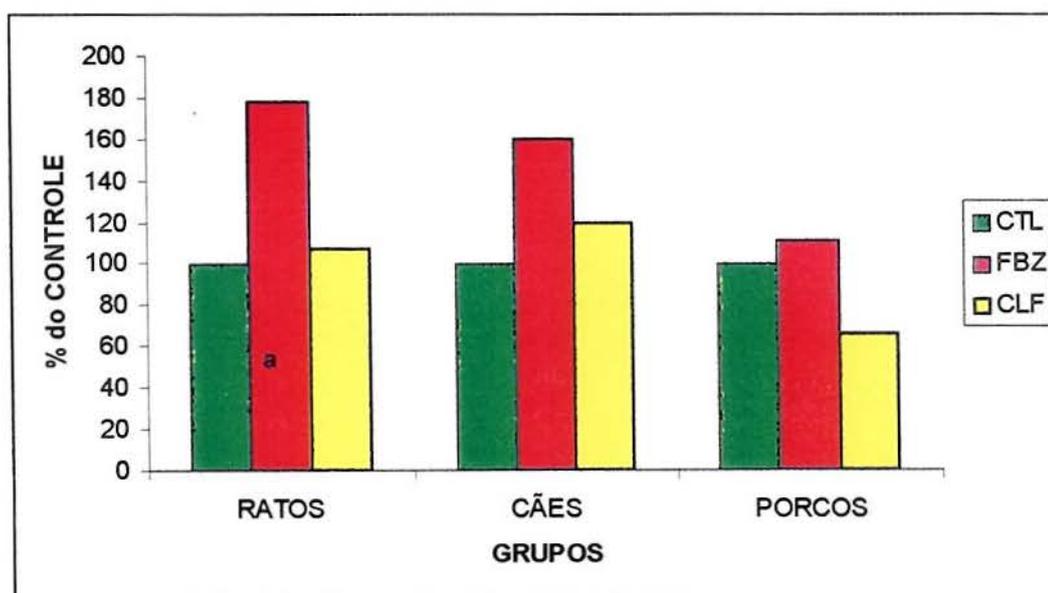
A Figura 2 compara, em valores percentuais, os tempos médios de ausência de reflexo de endireitamento entre ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina, considerando como 100 % os dados do grupo controle.



a = diferença significativa em relação aos demais grupos da mesma espécie, pelo teste SNK,  $P < 0,05$ .

FIGURA 2 – Tempo de ausência de reflexo de endireitamento. Dados em ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona ou cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina, em valores percentuais do grupo controle, em cada espécie.

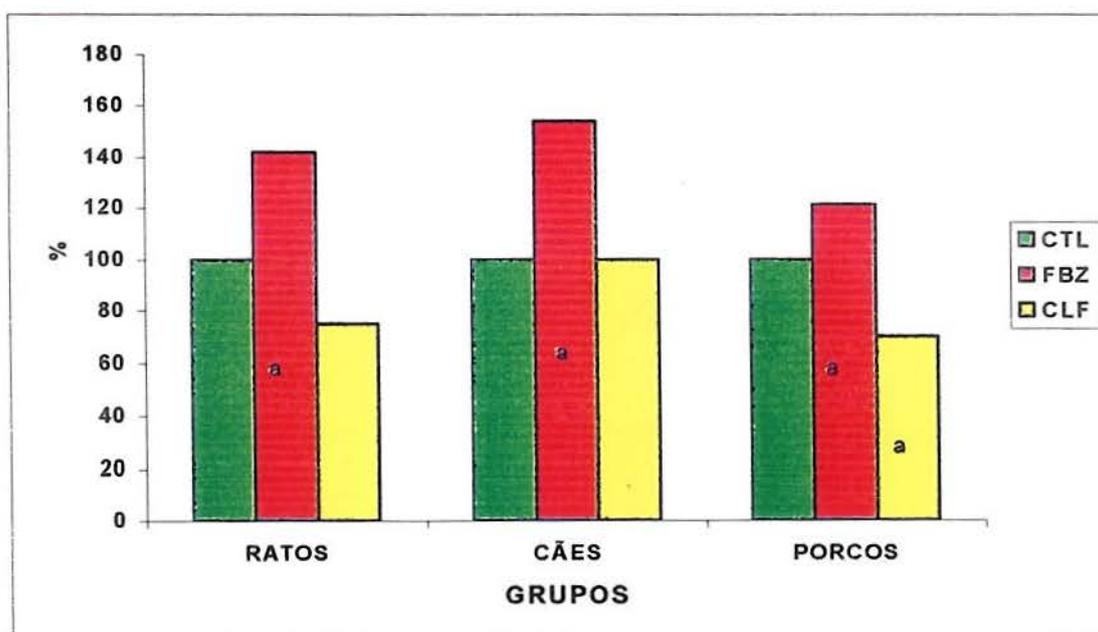
A Figura 3 expressa, em valores percentuais, a concentração de proteínas em cada grupo de ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina, considerando como 100 % os dados do grupo controle.



a = diferença significativa em relação aos demais grupos da mesma espécie, pelo teste SNK,  $P < 0,05$ .

FIGURA 3 – Concentração hepática de proteínas. Dados obtidos em ratos, cães e porcos após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina, em percentuais do grupo controle, para cada espécie.

A Figura 4 expressa, em valores percentuais, a velocidade de redução de NADPH-citocromo C em cada grupo de ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina, considerando como 100% o grupo controle.



a = diferença significativa em relação aos demais grupos da mesma espécie, pelo teste SNK,  $P < 0,05$ .

FIGURA 4 – Velocidade de redução de NADPH – citocromo C por minuto por miligrama de proteína. Dados obtidos em ratos, cães e porcos, após tratamento com solução fisiológica, fenilbutazona e cloranfenicol e anestesia com xilazina e cetamina, em valores percentuais do controle, em cada espécie.

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 - Aspectos gerais

Interações medicamentosas com anestésicos, envolvendo barbitúricos, têm sido muito estudadas desde o final da década de 1950 (CONNEY *et al.*, 1960; PIEL *et al.*, 1969; MÉNARD *et al.*, 1974; ADAMS *et al.*, 1977). Naqueles trabalhos experimentais, os pesquisadores procuraram correlacionar os resultados obtidos *in vivo*, mais explicitamente a duração do tempo de sono, com os resultados de ensaios bioquímicos, incluindo concentração de proteínas hepáticas, concentração de citocromo P - 450 e reações cinéticas.

A utilização de xilazina e cetamina no estudo atual deu seqüência a trabalhos de AMOUZADEH *et al.* (1989), NOSSAMAN *et al.* (1990) e RODER *et al.* (1993), que, além de focalizarem uma associação anestésica de importância em medicina veterinária, ampliaram o espectro das espécies estudadas, estabelecendo comparações entre os resultados obtidos. Aqueles trabalhos, no entanto, se restringiram às variáveis relacionadas com tempo de anestesia, não contemplando a investigação de variáveis bioquímicas, como fizeram seus antecessores ao utilizarem barbitúricos e como se propõe o presente estudo.

### 6.2 – Experimentos utilizando ratos

Os roedores são utilizados de forma ampla como modelo animal experimental em pesquisa biológica. Os ratos, entre os roedores, têm tido a preferência dos pesquisadores que trabalham no campo da interação medicamentosa. Desde os primeiros estudos envolvendo os fenômenos relativos a indução e inibição enzimáticas (RICHARDSON & CUNNINGHAM, 1952; MILLER *et al.*, 1952), com observação dos fenômenos *in vivo*, até a correlação com a atividade microsomal hepática *in vitro*, a experimentação com ratos tem sido presença constante. Sendo assim, este estudo se

propôs a avaliar o efeito do tratamento prévio com fenilbutazona ou cloranfenicol sobre variáveis clínicas e bioquímicas em ratos anestesiados com xilazina e cetamina, juntamente com outros grupos animais.

A literatura cita diferentes doses da associação de xilazina e cetamina sempre relacionadas com trabalhos experimentais (VAN PELT, 1977; MULDER & MULDER, 1979; STICKROD, 1979; AMOUZADEH *et al.* 1989; KOMULAINEN & OLSON, 1991). As doses de 20 mg . kg<sup>-1</sup> de xilazina e de 50 mg . kg<sup>-1</sup> de cetamina foram recomendadas por MASSONE (1994) como adequadas à realização de procedimentos cirúrgicos. As doses se mostraram efetivas.

A dose de fenilbutazona e o esquema posológico foram escolhidos a partir de trabalho de BURNS *et al.* (1963).

A dose de cloranfenicol foi a mesma utilizada por AMOUZADEH *et al.* (1989), com a diferença de que, naquele estudo, o antibiótico foi administrado em dose única, 60 minutos antes da anestesia por xilazina e cetamina. Esta metodologia tem sido seguida por outros autores (ADAMS & DIXIT, 1970; ADAMS *et al.*, 1977) e se explica pelo mecanismo de inibição de isoenzimas do sistema microssomal hepático pelo cloranfenicol. Enquanto a indução enzimática se caracteriza pela necessidade de síntese de proteínas, a inibição é um fenômeno de inativação de enzimas existentes. No caso do cloranfenicol, a inativação se dá pela modificação de um ou mais resíduos de lisina na proteína, impedindo a transferência do elétron do NADPH-citocromo P - 450 redutase (HALPERT, 1995). Com meia-vida aproximada de quatro horas, a ação do cloranfenicol sobre o sistema microssomal hepático é muito rápida. ADAMS (1970) encontrou aumento significativo do tempo de sono por barbitúricos, em ratos, 10 minutos após a administração de cloranfenicol. No caso de anestesia por xilazina e cetamina, AMOUZADEH *et al.* (1989) verificaram aumento significativo do tempo de

anestesia 60 minutos após a administração do antibiótico. No estudo atual, a administração de cloranfenicol obedeceu a um esquema terapêutico. Com isto, foi possível observar os resultados da utilização clínica do antibiótico sobre o metabolismo hepático.

De outra parte, foi estudada a possibilidade de um efeito cumulativo da administração do cloranfenicol, ou seja, a relação entre sucessivos processos de inativação de isoenzimas e a síntese de nova proteína.

As variáveis observadas *in vivo* nos ratos obedeceram aos procedimentos clássicos utilizados na espécie, incluindo tempo de início de perda de reflexo de endireitamento e duração de ausência deste reflexo (PIEL *et al.*, 1969). Em experimento piloto, foi observado que o retorno à ambulação apresentava uma variação de tempo muito grande em relação ao retorno do reflexo de endireitamento. Esta variação de tempo, se a variável fosse incluída na avaliação, interferiria no momento de morte dos animais para os procedimentos *pos mortem*.

No presente estudo optou-se pela morte por deslocamento da articulação atlanto-occipital, seguida de exsangüinação dos ratos. Trabalho de LEVINE & PEREZ (1990) demonstra não haver diferenças na concentração de citocromo P - 450 e nas reações cinéticas utilizando microsomas hepáticos de ratos mortos por este método e ratos mortos por exposição ao dióxido de carbono.

Com referência específica a ratos, foi empregada a técnica de *pool* de fígados, utilizada com freqüência por outros pesquisadores (HART & FOUTS, 1963; ADAMS *et al.*, 1977; SESARDIC *et al.*, 1990). Este procedimento permitiu uma homogeneidade maior pois os grupos de uma mesma série de *pools* foram tratados em condições absolutamente iguais. Além disto, as amostras de fígado incluíram a totalidade dos órgãos de um mesmo grupo em cada série de *pools*.

Os valores médios dos tempos de início de ausência de reflexo de endireitamento não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Esta ausência de diferenças significativas pode indicar a não interferência dos processos de indução ou inibição do sistema microsomal hepático no tempo de desencadeamento dos sinais de anestesia por xilazina e cetamina em ratos.

Os valores médios para tempo de ausência de reflexo de endireitamento, no período anterior ao tratamento, oscilaram entre  $57,66 \pm 20,21$  minutos no grupo fenilbutazona e  $62,32 \pm 16,97$  minutos no grupo controle, estando próximos dos  $63,83 \pm 17,42$  minutos encontrados por SILVA FILHO *et al.* (1994).

Já a administração de fenilbutazona e de cloranfenicol alterou de modo significativo o tempo de ausência do reflexo de endireitamento em ratos. A média do tempo de ausência de reflexo no grupo fenilbutazona foi 28,03 minutos menor do que no grupo controle. Se observados em percentuais, houve uma diminuição de 45,17 % no grupo fenilbutazona em relação ao grupo controle. Os três ratos que não perderam o reflexo de endireitamento em nenhum momento representaram 18,75 % dos animais do grupo fenilbutazona. Verificando que a anestesia com xilazina e cetamina foi eficaz em todos os ratos nos demais grupos, a possibilidade de reduzir o efeito anestésico após tratamento com fenilbutazona pode ser considerada uma evidência muito forte da interação de drogas neste grupo.

Não existem estudos prévios relacionando a pré - medicação com fenilbutazona e a associação anestésica empregada no presente trabalho em qualquer espécie animal. As citações existentes relacionam a administração de fenilbutazona com a diminuição do tempo de sono produzido por hexobarbital em ratos e cães (CONNEY *et al.*, 1960; BURNS *et al.*, 1963). No estudo de BURNS *et al.* (1963), utilizando a mesma dose e o mesmo período de administração de fenilbutazona deste trabalho, o grupo de

ratos tratados com o antiinflamatório apresentou uma diminuição de 91,66 % no tempo de sono, em relação ao grupo controle. Este percentual representa praticamente o dobro do encontrado quando se utilizou xilazina e cetamina como agente anestésico. Poder-se-ia levantar a hipótese de que exista um número maior de isoenzimas induzíveis pela fenilbutazona responsáveis pela metabolização do barbitúrico do que daquelas envolvidas com a biotransformação da xilazina e da cetamina.

A média dos tempos de ausência de reflexo no grupo cloranfenicol foi significativamente maior em relação à observada nos outros grupos após o tratamento. Observada em números absolutos, esta diferença foi de 33,21 minutos em relação ao grupo controle. Em valores percentuais, a variação foi de 53,51 %. Os resultados encontrados são semelhantes aos descritos por AMOUZADEH *et al.* (1989), quando verificaram um aumento de 52 % no tempo de sono por xilazina e cetamina em ratos tratados com cloranfenicol. Recordando que aqueles autores administraram cloranfenicol aos ratos em dose única, 60 minutos antes da anestesia, diferentemente das doses diárias, por um período de cinco dias, administradas no estudo em exame, e considerando a similitude dos resultados obtidos, pode-se inferir que doses múltiplas do antibiótico não interferiram na intensidade do efeito inibidor sobre o sistema citocromo P - 450, em relação à variável tempo de sono.

Os fígados dos ratos foram pesados individualmente. Os resultados mostraram uma diferença significativa na média dos pesos dos fígados dos ratos do grupo fenilbutazona em relação às médias dos grupos controle e cloranfenicol. Estes resultados confirmam os encontrados por REMMER & MERKER (1963) e LUBET *et al.* (1992b).

A diferença significativa encontrada entre os valores médios das concentrações de proteína por grama de fígado do grupo fenilbutazona em relação à dos grupos

controle e cloranfenicol era esperada, pois a indução enzimática requer síntese protéica (OKEY, 1990). Esta afirmativa já havia sido feita por CONNEY *et al.* (1957), estudando os efeitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em ratos. ROBERTSON *et al.* (1980), trabalhando com fígados de ratos tratados com fenobarbital, encontraram valor médio de  $27,4 \pm 3,7$  miligramas de proteínas por grama de fígado no grupo tratado e  $17,6 \pm 1,4$  miligramas de proteínas por grama de fígado no grupo controle. Estes resultados são muito próximos dos dados referentes a animais tratados com fenilbutazona e encontrados neste estudo. REMMER (1970) e REMMER & MERKER (1963) verificaram efeito semelhante após a administração de fenobarbital em ratos.

As concentrações de citocromo P - 450 se mantiveram dentro dos limites citados por DALVI *et al.* (1991), não apresentando diferenças significativas entre os grupos. No estudo de ROBERTSON *et al.* (1980) utilizando fenobarbital, verificaram-se valores 2,5 vezes maiores na concentração de citocromo P - 450 do grupo tratamento em relação ao grupo controle. De acordo com AUSTIN *et al.* (1988), as isoenzimas da sub-família P450IIB, induzíveis pelos compostos tipo fenobarbital, representam apenas 5 % do conteúdo total do citocromo P - 450 do fígado de ratos. Desta forma, um aumento de 10 vezes na concentração destas isoenzimas pode representar valores de apenas 1,45 vezes o conteúdo total de citocromo P - 450. Além disto, alguns indutores tipo fenobarbital têm a capacidade de, concomitantemente, diminuir a concentração de outras isoenzimas do sistema microsomal hepático. Sob este raciocínio, analisando-se os resultados de ROBERTSON *et al.* (1980), pode-se inferir que o valor 2,5 vezes maior na concentração total de citocromo P - 450 corresponde a uma elevação de 31 vezes no conteúdo de isoenzimas da sub-família P450IIB. No presente trabalho, utilizando microsomas hepáticos de ratos tratados

com fenilbutazona, os resultados encontrados são muito discretos. Se for considerado que o grupo fenilbutazona apresentou um resultado médio de 0,831 e o grupo controle 0,726 nmoles de citocromo P - 450 por miligrama de proteína, observa-se um valor 1,14 vezes maior no conteúdo total de citocromo P -450 no grupo tratado. Seguindo o raciocínio de AUSTIN (1988), ocorreu um aumento de 3,8 vezes no conteúdo de isoenzimas da sub-família P450IIB neste estudo, praticamente 10 vezes menor do que os dados encontrados por ROBERTSON *et al.* (1980), para ratos tratados com fenobarbital. Estes resultados sugerem que a fenilbutazona, embora sendo considerada um indutor do tipo fenobarbital, mostra resultados mais discretos em relação a este último.

A média dos resultados dos ensaios de velocidade de redução de NADPH - citocromo C significativamente mais elevada no grupo fenilbutazona, em comparação com a dos grupos controle e cloranfenicol, caracteriza situação de indução de isoenzimas do sistema citocromo P - 450. A diminuição de velocidade de redução no grupo cloranfenicol não chegou a ser significativa em relação ao grupo controle, mas, se observada em termos percentuais, observa-se uma diminuição aproximada de 25 % na atividade enzimática no grupo previamente tratado com o antibiótico.

Comparando os resultados obtidos com os dados de outros autores, verifica-se uma amplitude muito grande nos valores médios do grupo controle. Enquanto ADAMS *et al.* (1977) citam  $130,80 \pm 8,30$  nmoles reduzidos por minuto por miligrama de proteína, ROBERTSON *et al.* (1980) encontraram  $58,40 \pm 7,20$  como valor médio na mesma variável. Considerando-se os valores obtidos por estes últimos no grupo tratado com fenobarbital, observa-se um aumento de 182 % na velocidade de redução. Comparado com o aumento de 42,10 % observado no presente estudo, sugere-se

novamente a característica de indutor fraco da fenilbutazona em relação ao fenobarbital.

Os resultados de velocidade de redução de NADPH - citocromo C mostraram uma correlação inversa forte com o tempo de ausência de reflexo de endireitamento.

O estudo da correlação entre variáveis permitiu, nos experimentos com ratos, reforçar tendências não estatisticamente significativas, mas numericamente expressivas, por sua dependência em relação a variáveis com resultados significativos. Desta forma, a média da velocidade de redução de NADPH - citocromo C no grupo cloranfenicol, embora sem acusar uma diferença significativa em relação ao grupo controle, tem seu significado valorizado pela confirmação do tempo de ausência de reflexo de endireitamento como variável dependente, esta sim com diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos. Os resultados obtidos na etapa *in vivo*, analisados diante dos números encontrados na etapa *pos mortem*, como peso dos fígados, concentração de proteínas e ensaios de cinética, e considerando não apenas a comparação dos grupos tratamento com o grupo controle, mas também incluindo a comparação entre os resultados obtidos no grupo fenilbutazona com os do grupo cloranfenicol, oferecem uma evidência forte de interação de fármacos em ratos pré - tratados com fenilbutazona e cloranfenicol e submetidos à anestesia com xilazina e cetamina.

### **6.3 – Experimentos utilizando cães**

Todos os cães perderam o tônus postural durante a administração intravenosa de xilazina e cetamina nas doses utilizadas. Como esta perda do tônus postural aconteceu em todos os grupos, antes e após o tratamento, não fica evidente qualquer influência da indução ou inibição do sistema microssomal hepático nesta variável.

As doses de xilazina e cetamina foram as indicadas por VOLL *et al.* (1975). A fenilbutazona e o cloranfenicol foram administrados em doses já utilizadas em estudos de outros pesquisadores (BURNS *et al.*, 1963; TESKE & CARTER, 1971). A administração de cloranfenicol, ao contrário de outros trabalhos, como de ADAMS & DIXIT (1970), que administraram o antibiótico a um grupo de cães, 60 minutos antes da anestesia por pentobarbital, e a outro grupo imediatamente antes da injeção do barbitúrico, simulou um esquema terapêutico, com doses diárias durante cinco dias.

O tempo médio de ausência de reflexo de endireitamento antes do tratamento, nos três grupos, está de acordo com HASKINS *et al.* (1986), que, com doses semelhantes, obtiveram um período médio de  $32,00 \pm 6,00$  minutos para esta variável. No presente estudo, o tempo médio oscilou entre  $26,66 \pm 5,13$  minutos no grupo controle e  $30,50 \pm 8,94$  minutos no grupo fenilbutazona.

A média dos resultados em minutos do tempo de ausência de reflexo de endireitamento após o tratamento foi significativamente mais elevada no grupo cloranfenicol em comparação à dos outros dois grupos. NOSSAMAN *et al.* (1990) obtiveram aumento do tempo de anestesia da ordem de 40 %, utilizando os mesmos fármacos. Há que considerar que estes autores utilizaram dose única de cloranfenicol, 15 minutos antes da anestesia por xilazina e cetamina. Na ausência de outras investigações, pode-se questionar a administração do antibiótico em esquema terapêutico com doses múltiplas como fator de influência na intensidade dos resultados *in vivo* obtidos neste estudo. Outro ponto a ser considerado seria a dose de cloranfenicol utilizada, em valores 50 % mais elevados neste trabalho. Cumpre destacar que NOSSAMAN *et al.* (1990) sugerem a possibilidade da inibição do sistema microssomal hepático pelo cloranfenicol ser dependente de dose, o que encontra

apoio no mecanismo de inativação de isoenzimas e nas propriedades farmacocinéticas do fármaco.

No grupo fenilbutazona houve uma variação aproximada de 10 % em comparação com o grupo controle, após o tratamento com o antiinflamatório, mas esta tendência não foi significativa. Ao contrário dos resultados obtidos por BURNS *et al.* (1963), em um dos poucos estudos de interação medicamentosa em cães envolvendo fenilbutazona, quando verificaram queda de 90 % no tempo de anestesia por hexobarbital em cães antes de tratamento com o antiinflamatório, no presente trabalho a fenilbutazona não interferiu no tempo de anestesia por xilazina e cetamina. Nossaman *et al.* (1990), embora trabalhando com xilazina e cetamina, utilizaram o fenobarbital como agente indutor, observando uma diminuição de 30 % no tempo de sono. Em cães, se torna difícil estabelecer comparações com outros estudos, pois, como se pode observar pelos autores citados, não existem outros trabalhos envolvendo fenilbutazona, xilazina e cetamina.

O aumento na concentração de proteínas hepáticas no grupo fenilbutazona não foi significativo, embora represente 54,65 % do valor médio encontrado no grupo controle. O aumento na concentração de proteínas hepáticas é esperado em situações de indução do sistema citocromo P - 450 (OKEY, 1990). A ausência de significância estatística pode ser creditada ao desvio padrão muito elevado no valor médio de concentração de proteínas no grupo fenilbutazona.

Os valores médios de concentração de citocromo P - 450 foram significativamente mais elevados no grupo fenilbutazona, indicando a indução de uma ou mais isoenzimas do sistema citocromo P - 450 pela fenilbutazona em cães. Retomando o raciocínio de AUSTIN (1988) e considerando os valores médios de  $0,653 \pm 0,214$  e  $2,232 \pm 1,129$  nmoles de citocromo P - 450 por miligrama de proteína, nos

grupos controle e fenilbutazona, respectivamente, ocorreu um aumento de quase 50 vezes no conteúdo das isoenzimas indutíveis pela fenilbutazona.

O aumento significativo na velocidade de redução de NADPH - citocromo C no grupo fenilbutazona em relação aos outros dois grupos está, certamente, relacionado com o aumento significativo da concentração de citocromo P- 450, no mesmo grupo. Na tentativa de uma comparação com os resultados de ROBERTSON *et al.* (1980), embora estes tenham utilizado ratos, verifica-se, que naquele trabalho, houve um aumento estimado de 31 vezes no conteúdo de isoenzimas induzíveis pelo fenobarbital, resultando em um aumento de 2,8 vezes na atividade cinética. No presente trabalho, o aumento de 50 vezes no conteúdo de isoenzimas induzíveis pela fenilbutazona correspondeu a aumento de 2,5 vezes na velocidade de redução. Fica também neste tópico o registro da dificuldade de estabelecer termos de comparação, pois os dados disponíveis são relativos a espécies diferentes e a drogas que, embora estejam classificadas no mesmo grupo no que se refere ao tipo de indução do sistema microsomal hepático, diferem quanto à intensidade de indução.

A discrepância mais evidente encontrada nos cães foi o acentuado aumento no tempo de sono sem uma esperada diminuição na atividade cinética no grupo cloranfenicol. Uma atividade cinética mais elevada pode não corresponder a alterações nas variáveis *in vivo*, como tempo de sono, mas é difícil explicar a duplicação do valor médio desta variável, como ocorreu com o grupo cloranfenicol neste trabalho, sem modificação na atividade enzimática.

As discrepâncias encontradas nos resultados referentes a cães podem estar ligadas a diferentes causas, como origem dos animais, estado nutricional e idade (LUBEC, 1992b) e indução de isoenzimas diversas daquelas responsáveis pelo metabolismo da xilazina e da cetamina.

No que se relaciona a estado nutricional, CAMPBELL & HAYES (1974) afirmam que existe um número grande de nutrientes que tem influência sobre o metabolismo dos fármacos e que estudos com dietas adequadas e com dietas deficientes têm mostrado diferenças significativas na atividade enzimática responsável pelo metabolismo das drogas. Estas afirmativas adquirem maior importância em estudos incluindo cães pela dificuldade de homogeneização da amostra, inclusive quanto a aspectos do estado nutricional. Enquanto os ratos e porcos utilizados no presente trabalho foram originários de um mesmo local, criados em condições iguais, os cães procediam de locais diversos e situações desconhecidas, embora passando por um período de quarentena no Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

#### **6.4 – Experimentos utilizando porcos**

A literatura é escassa no que se refere a estudos envolvendo interação medicamentosa na espécie suína. Estes estudos, no entanto, se tornam indispensáveis à medida que cresce a utilização de porcos como modelo animal experimental. Além de semelhanças anatômicas e fisiológicas com seres humanos, os suínos oferecem vantagens no seu uso como animal experimental pela facilidade de formação de grupos homogêneos, considerando-se a prolificidade da espécie e a padronização de manejo criatório e reprodutivo.

A ausência de trabalhos com porcos, nesta área, se por um aspecto, valoriza os resultados obtidos, por outro impede comparações com observações prévias.

Todos os porcos perderam o tônus postural durante a administração intravenosa de xilazina e cetamina.

A fenilbutazona e o cloranfenicol foram administrados em doses e esquemas terapêuticos (BOOTH, 1988).

Os tempos de ausência de reflexo de endireitamento não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos. Os tempos médios encontrados antes do tratamento foram menores dos que os relatados por SAKAGUCHI *et al.* (1995). Naquele estudo foi obtido um tempo médio de  $34,60 \pm 17,20$  minutos em comparação com os  $17,66 \pm 1,85$  minutos encontrados neste trabalho. Deve-se, no entanto, considerar a forma e a via de administração empregadas, pois, no trabalho de SAKAGUCHI *et al.* (1995), as drogas foram administradas por via intramuscular e em momentos diferentes. LÖSCHER *et al.* (1990) encontraram valor médio de 24 minutos. Em valores percentuais, a alteração de tempo de ausência de reflexo em relação ao controle, de 20,97% no grupo fenilbutazona e de 29,48% no grupo cloranfenicol, confere importância clínica ao tempo de imobilidade de porcos tratados com fenilbutazona e cloranfenicol, com tendência a diminuição no primeiro e aumento no segundo. Comparando-se os valores percentuais entre os grupos fenilbutazona e cloranfenicol após o tratamento, verifica-se que a diferença entre as médias dos tempos de ausência de reflexo dos dois grupos alcança 9 minutos, representando 69% do tempo médio do grupo fenilbutazona.

A avaliação do tempo de retorno à ambulação nos porcos não apresentou as limitações citadas nos ratos e cães. Nos porcos, o tempo máximo entre retorno de reflexo de endireitamento e retorno à ambulação foi de 9,34 minutos, antes do tratamento, no grupo fenilbutazona. Esta média também ficou abaixo dos 11 minutos encontrados por SAKAGUCHI *et al.* (1995). As duas variáveis apresentaram correlação positiva forte antes e após o tratamento, embora neste último, tenha ocorrido diminuição do intervalo entre retorno de reflexo e retorno à ambulação em todos os grupos.

Os valores médios das concentrações de proteínas hepáticas não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos. Embora sem significado estatístico, o grupo fenilbutazona apresentou tendência de aumento da concentração de proteínas e o grupo cloranfenicol apresentou tendência de diminuição em relação ao grupo controle.

Os valores médios de velocidade de redução de NADPH - citocromo C apresentaram diferenças significativas entre os três grupos, indicando situações de indução e inibição enzimáticas. Embora os resultados de tempo de anestesia não tenham apresentado diferenças significativas entre os três grupos, as tendências à diminuição no grupo fenilbutazona e aumento no grupo cloranfenicol são reforçadas pela correlação inversa encontrada entre esta variável e a velocidade de redução de NADPH - citocromo C.

A ausência de resposta significativa *in vivo* pode ser decorrente da instabilidade dos resultados da associação de xilazina e cetamina como anestésico em porcos (SAKAGUCHI *et al.*, 1995), do grau de indução e inibição insuficiente para alterar o tempo de anestesia ou da possibilidade das isoenzimas induzidas e inibidas não serem responsáveis pelo metabolismo da xilazina e da cetamina. A correlação inversa entre tempo de ausência de reflexo de endireitamento e a velocidade de redução de NADPH - citocromo C parecem reforçar as duas primeiras hipóteses.

#### **6.5 - Estudo comparativo entre grupos animais**

Observando-se os resultados das diferentes variáveis, verifica-se que, independente da espécie, os animais tratados com fenilbutazona apresentaram diminuição do tempo médio de ausência de reflexo de endireitamento. Este decréscimo, no entanto, foi significativo apenas nos ratos.

Os animais após tratamento com cloranfenicol apresentaram um aumento do tempo de ausência de reflexo de endireitamento que foi significativo nos ratos e cães.

A variável peso dos fígados não pôde ser comparada pois foi registrada apenas nos ratos.

A concentração de proteínas hepáticas mostrou-se mais elevada nas três espécies, com diferença significativa apenas nos ratos. Nos porcos, ao contrário dos ratos e cães, houve uma redução na concentração de proteínas hepáticas no grupo cloranfenicol, embora sem significado estatístico. Esta redução pode ter influenciado os resultados de velocidade de redução de NADPH - citocromo C, nos porcos.

A concentração de citocromo P - 450 não apresentou diferenças entre os grupos, exceto no grupo fenilbutazona em cães, em que foi significativamente mais elevada do que nos grupos controle e cloranfenicol da mesma espécie. Como as isoenzimas induzíveis pelos compostos tipo fenobarbital representam apenas 5% do conteúdo total de citocromo P - 450 (AUSTIN *et al.*, 1988), é possível que a ausência de aumento na concentração de citocromo P - 450 nos grupos fenilbutazona de ratos e porcos não signifique ausência de indução de determinada isoenzima ou isoenzimas, sem repercussão na concentração total. Dentro do mesmo tema, OLIVEIRA (1996) estudou os efeitos de monoterpenos sobre as monoxigenases hepáticas em ratos, encontrando aumento de atividade enzimática sem aumento significativo na concentração de citocromo P - 450 por miligrama de proteína. Na mesma linha de raciocínio, FREITAS *et al.* (1993) compararam dados obtidos de estudo com ratos anestesiados com pentobarbital após administração de monoterpeno, mais especificamente  $\beta$ -mirceno, com resultados de outros autores. Com base no aumento significativo no tempo de sono promovido pelo pentobarbital, verificaram que o composto induz isoenzimas do sistema

P - 450, ao contrário de estudos anteriores apoiados apenas em resultados de concentração total de citocromo P - 450 e que não apresentaram diferenças significativas, concluindo que a concentração total de isoenzimas não pode ser um dado tomado isoladamente no estudo da indução enzimática.

A indução de isoenzimas do sistema P - 450 pela fenilbutazona ficou evidente pelos resultados dos ensaios de cinética, nas três espécies estudadas. A inibição enzimática pelo cloranfenicol, tomando a mesma variável, foi evidente apenas nos porcos.

Quando se observa os resultados *in vivo*, mais especificamente, o tempo de ausência de reflexo de endireitamento, considerado como tempo de anestesia, verifica-se que ocorreu uma correlação inversa forte com a atividade enzimática nos ratos e porcos.

As diferenças de resultados das diferentes variáveis podem encontrar explicação pelas diferenças nas espécies e na condição dos animais experimentais (NOSSAMAN, 1990).

Nos ratos, indivíduos homogêneos, trabalhados em experimentos em condições absolutamente iguais e com número maior de animais nas variáveis *in vivo*, verificou-se a repercussão do aumento da atividade cinética na diminuição do tempo de anestesia, no grupo fenilbutazona, confirmando resultados obtidos por BURNS *et al.* (1963). É importante ressaltar que estes resultados foram acompanhados de aumento de peso dos fígados e aumento na concentração de proteínas hepáticas, variáveis relacionadas com a indução de isoenzimas do sistema P - 450.

Nos cães, os resultados referentes ao grupo fenilbutazona são de explicação mais difícil. Apesar da indução constatada por métodos bioquímicos, não se observou repercussão no tempo de anestesia. É importante ressaltar que nos cães

ocorreu um aumento significativo na concentração de citocromo P - 450, ao contrário das outras espécies. Este aumento deveria se refletir nas respostas *in vivo*. Destacam-se no mínimo três possibilidades: as isoenzimas induzidas não são responsáveis pelo metabolismo dos fármacos anestésicos utilizados; o grau de indução não foi suficiente para alterar o tempo de sono ou a falta de homogeneidade dos cães conduziu a resultados divergentes.

Como a associação de xilazina e cetamina não se mostrou um anestésico adequado nos porcos, as variáveis tempo de ausência de reflexo e tempo de retorno à ambulação perdem importância diante das alterações significativas nos valores de atividade cinética.

No grupo cloranfenicol, a atividade cinética mostrou evidência de inibição enzimática apenas nos porcos, cabendo aqui as mesmas ressalvas feitas em relação ao grupo fenilbutazona nesta espécie. Nos ratos, o aumento no tempo de anestesia não foi acompanhado de diminuição significativa da atividade cinética, embora a variação tenha representado 25 % para menos em relação ao grupo controle.

Nos cães, repetiu-se no grupo cloranfenicol, em sentido inverso, o que foi constatado no grupo fenilbutazona, ou seja, o tempo de sono aumentou significativamente sem ter havido modificações nas reações bioquímicas. Adams *et al.* (1977) verificaram aumento significativo no tempo de sono por pentobarbital em ratos pré - tratados com cloranfenicol. Da mesma forma que no presente estudo, não observaram alterações significativas nos resultados do ensaio de redução de NADPH - citocromo C. Confirmaram, no entanto, a atividade inibidora do cloranfenicol com ensaios de atividade da etilmorfina N - demetilase e da benzfetamina N - demetilase.

Sendo assim, os principais resultados deste trabalho foram mostrar que nem sempre uma alteração de atividade enzimática capaz de caracterizar a indução ou a

inibição do sistema microssomal hepático traduz nos resultados de ensaios enzimáticos as observações obtidas *in vivo* e vice-versa. No rato, espécie mais estudada, os dois fenômenos parecem mais intimamente relacionados, mas, no cão e no porco, ocorreram aparentes discrepâncias que podem estar relacionadas com as doses dos anestésicos utilizadas (BOOTH, 1988), as espécies animais (LEVINE & PEREZ, 1990), as condições física e nutricional dos animais experimentais (CAMPBELL & HAYES, 1974; KIM *et al.*, 1990) e as raças em estudo (LUBET, *et al.* 1992b).

Sintetizando, verifica-se que, nos porcos, ocorreram indução e inibição enzimáticas, constatadas pelas reações de cinética, sem repercussão no tempo de anestesia.

Nos ratos, ocorreu indução enzimática, com repercussão no tempo de anestesia, e provável inibição enzimática, com aumento do tempo de anestesia, sem o esperado significado estatístico na diminuição da atividade cinética.

Nos cães, a indução enzimática não foi acompanhada de diminuição do tempo de anestesia.

## 7 – CONCLUSÕES

1. A administração de fenilbutazona diminuiu o tempo de anestesia promovida pela associação de xilazina e cetamina em ratos, não alterando o tempo de anestesia em cães e porcos.

2. A administração de cloranfenicol aumentou o tempo de anestesia promovida pela associação de xilazina e cetamina em ratos e cães, não alterando o tempo de anestesia em porcos.

3a. A administração de fenilbutazona aumentou a velocidade de redução de NADPH - citocromo C em ratos, cães e porcos, indicando uma situação de indução enzimática.

3b. A administração de cloranfenicol diminuiu a velocidade de redução de NADPH - citocromo C em porcos, indicando uma situação de inibição enzimática.

4. Ocorreu correlação inversa entre o tempo de anestesia e a atividade enzimática em ratos e porcos.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. H. - Prolongation of barbiturate anesthesia by chloramphenicol in laboratory animals. *J.A.V.M.A.*, **157**:1908-13, 1970.
- ADAMS, R.H. & DIXIT, B.N. - Prolongation of pentobarbital anesthesia by chloramphenicol in dogs and cats. *J.A.V.M.A.*, **15**:902-5, 1970.
- ADAMS, R. H.; ISAACSON, E. L.; MASTERS, B. S. S. - Inhibition of hepatic microsomal enzymes by chloramphenicol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **203**: 388-6, 1977.
- ADESNIK, M.; BAR-NUN, S.; MASCHIO, F.; ZUNICH, M.; LIPPMAN, A.; BARD, E. - Mechanism of induction of cytochrome P - 450 by phenobarbital. *J. Biol. Chem.*, **256**:10340-5, 1981.
- ADESNIK, M. & ATCHINSON, M. - Genes for the cytochrome P-450 and their regulation. *CRC Crit. Rev. Bioch.*, **19**:247-305, 1985.
- ALTHAUS, F.R.; SINCLAIR, J.F.; SINCLAIR, P.; MEYER, U.A. - Drug - mediated induction of cytochromes ( s ) P-450 and drug metabolism in cultured hepatocytes maintained in chemically defined medium. *J. Biol. Chem.*, **254** : 2148 – 53, 979.
- AMOZADEH, H.R.; SANGIAH, S.; QUALLS, C.W. - Effects of some hepatic microsomal enzyme inducers and inhibitors on xylazine - ketamine anesthesia. *Vet. Hum. Toxicol.*, **31**:532-4, 1989.
- ARCOS, J.C.; CONNEY, A.H.; BUU-HOI, N.P. - Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes. *J. Biol. Chem.*, **236** : 1291 - 6, 1961.

- AUSTIN, C.A.; SHEPHARD, S.F.P.; RABIN, B.R.; PHILLIPS, I.R. - The effect of terpenoid on cytochrome P - 450 levels in rat liver. **Biochem. Pharmacol.**, **37**: 2223-9, 1988.
- BENET, L. Z.; KROETZ, L.Z.; SHEINER, L.B. - Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.;Ruddon, R.W., eds. - **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p. 3-27.
- BOOTH, N.H. - Analgésicos não -narcóticos. In: Booth, N.H. & McDonald, L.E., eds. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1988. p.270-88.
- BRECKENRIDGE, A. M.; ORME, M. L. E.; DAVIES, L.; THORGEIRSSON, S. S. DAVIES, D. S. - Dose - dependent enzyme induction. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, **14**:514-20, 1973.
- BREE, M. M.; PARK, J. S.; SHORT, C. E. Responses of cats ketamine - antibiotic combinations. **V.M./S.A.C**, **11**:1309-10, 1975.
- BRESNICK, E.; FOLDES, R.; HINES, R. - Induction of cytochrome p - 450 by xenobiotics. **Pharmacol. Rev.**, **36**:43-5, 1984.
- BRITISH VETERINARY ASSOCIATION. - Veterinary use of chloramphenicol. **Vet. Rec.**, **99**:152-3, 1976.
- BRODIE, B. B.; GILLETTE, J. R.; LA DU, B. N. - Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. **Annu. Rev. Biochem.**, **27**:427-53, 1958.
- BURNS, J. J.; EVANS, C.; TROUSOF, N. - Stimulatory effect of barbital on urinary excretion of l-ascorbic acid and non-conjugated d-glucuronic acid. **J. Biol. Chem.**, **227**:785-94, 1957.
- BURNS, J. J.; CONNEY, A. H.; KOSTER, R. Stimulatory effect of chronic drug

- administration on drug - metabolizing enzymes in liver microsomes. **Annals New York Academy of Sciences**, **104**:881-93, 1963.
- CAMPBELL, T. C.; HAYES, J. R. - Role of nutrition on metabolism in the drug metabolizing enzyme system. **Pharmacol. Rev.**, **26**: 171-197, 1974.
- CHEN, G. Evaluation of phencyclidine - type cataleptic activity. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **157**:193-201, 1965.
- CHRISTOU, M.; WILSON, N. M.; ; JEFCOATE, C. R. - Expression and function of three cytochrome isozymes in rat extrahepatic tissues. **Arch. Biochem. Biophys.**, **259**:519 - 34, 1987.
- CLARK, M.A.; BING, B.A.; GOTTSCHALL, P.E.; WILLIAMS, J.F. - Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of p-450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.**, **49**:97-104, 1995.
- CLARK, M.A.; WILLIAMS, J.F.; GOTTSCHALL, P.E.; WECKER, L. - Effects of phenobarbital and interleukin-6 on cytochrome p450B1 and B2 in cultured rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.**, **51**:701-6, 1996.
- CLARKE, K. W. & HALL, L. W. - "Xylazine"- a new sedative for horses and cattle. **Vet. Rec.**, **85**:512-7, 1969.
- CLEMENTS, J. A. & NIMMO, W. S. - Pharmacokinetics and analgesic effect of ketamine in man. **Br. J. Anaesth.**, **53**:27-30, 1981.
- COHEN, M. L. & TREVOR, A. J. - On the cerebral accumulation of ketamine and the relationship between metabolism of the drug and its pharmacological effects. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **189**:351-8, 1974.
- CONNEY, A. H. Pharmacological implications of microsomal induction. **Pharmacol. Rev.**, **19**:317-66, 1967.

- CONNAY, A. H.; DAVISON, C.; GASTEL, R.; BURNS, J. J. - Adaptative increases in drug - metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, **130**:1-8, 1960.
- CONNAY, A. H.; MICHAELSON, I. A.; BURNS, J.J. Stimulatory effect of chorcyclizine on barbiturate metabolism. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, **132** :202-6, 1961.
- CONNAY, A. H.; MILLER, E. C.; MILLER, J.A. - Substrate - induced synthesis and other properties of benzopyrene hydroxylase in the rat liver. **J. Biol. Chem.**, **228**:753-66, 1957.
- CUMMING, J.F. - The development of an acute tolerance to ketamine. **Anesth. Analg.**, **55**: 788-91, 1976.
- CORSSEN, G.; MIYASAKA, M.; DOMINO, E. F. - Changing concepts in pain control during surgery : dissociative anesthesia with Cl - 581. **Anesth. Analg.** **47**:746 59,1968.
- CUCINELL, S. A.; KOSTER, R.; CONNEY, A. H.; BURNS, J. J. - Stimulatory effect of phenobarbital on the metabolism of diphenylhydantoin. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**,**141**:157-60, 1963.
- DAJAUT, M.; PICHARD, L.; FABRE, I.; PINEAU, T.; FABRE, G.; BONFILS, C.; MAUREL, P. - Induction protocols for cytochromes P450III A in vivo and primary cultures of animal and human hepatocytes. **Methods in Enzymology**, **206**:345-53, 1991.
- DALVI, R. R.; GAWAI, K. R. ; DALVI, P. S. - Lack of in vivo effects of fenbendazole on phase I and phase II biotransformation enzymes in rats, mice and chickens. **Vet. Hum. Toxicol.**, **33**:548-51, 1991.
- DANNAN, G. A.; MOORE, R. W.; BESAW, L.C.; AUST, S. D. - 2,4,5,3',4',5'-

- hexabromobibhenyl is both a 3-methylcholantrene and a phenobarbital-type inducer of microsomal drug metabolizing enzymes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **85** :450-8, 1978.
- DAVIS, L. E.; NEFF, C. A.; BAGGOT, J. D. - Pharmacokinetics of chloramphenicol in domesticated animals. **Am. J. Vet. Res.**, **33**:2259-66, 1972.
- DEBETHIZY, J. D. & HAYES, J. R. - Metabolism: a determinant of toxicity. In: Hayes, A.W., ed. - **Principles and methods of toxicology** 3. ed. New York, Raven. 1994. p. 50-100.
- DONATO, M.T.; GÓMEZ-LECHON, M.J.; CASTELL, J.V. - Effects of xenobiotics on monooxygenase activities in cultured human hepatocytes - **Biochem. Pharmacol.**, **39**:1321-26, 1990
- ELSHOURBAGY, N. A. & GUZELIAN, P. S. - Separation, purification and pre characterization of a novel form of hepatic cytochrome p-450 from rats treated with gnenolone-16-alpha-carbonitrile. **J. Biol. Chem.**, **255**:1279-85, 1980.
- FLECK, J. F.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S. - Importância Clínica da Interação Medicamentosa Farmacocinética. **Revista AMRIGS**, **21**: 80-8, 1977.
- FREITAS, J.C.B.R.; PRESGRAVE, O.A.F.; FINGOLA, F.F.; MENEZES, M.A.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. - Effect of  $\beta$ -myrcene on pentobarbital sleeping time. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **26**: 519-23, 1993.
- FUGINO, T.; WEST, D.; PARK, S.; GELBOIN, H. V. - Studies on the mechanism of monoclonal inhibition of enzyme activity of phenobarbital - induced cytochrome p-450. **Pharmacology**, **40**:30, 1990.
- GARFINKEL, D. - Studies on pig liver microsomes. 1. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. **Arch. Biochem. Biophys.**, **77**:493-509, 1958.

- GONZALEZ, J.G. - Molecular genetics of the P - 450 superfamily. **Pharmac. Ther.**, **45**: 1-38, 1990.
- GUENGERICH, F.P. - Analysis and characterization of enzymes. In: Hayes, A.W., ed. **Principles and methods of toxicology** 3. ed. New York, Raven. 1994. p. 1259-313.
- GUSTAFSSON, J. A.; CARLSTEDT-DUKE, J.; POELLINGER, L.; OKRET, S.; WIKSTROM, A. C.; BRONNEGARD, M.; GILLNER, M.; DONG, Y.; FUXE, K.; CINTRA, A.; HARFSTRAND, A.; AGNATI, L. - Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. **Endocrine Rev.**, **8**:185 - 234, 1987.
- HALPERT, J. R. - Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **35**:29-53, 1995.
- HALPERT, J. R.; MILLER, N. E.; GORSKY, L. D. - On the mechanism of the inactivation of the major phenobarbital - inducible isozyme of rat liver cytochrome p - 450 by chloramphenicol. **J. Biol. Chem.**, **260**:839-403, 1985.
- HARDWICK, J. P.; GONZALES, F. J.; KASPER, C. B. - Cloning of DNA complementary to cytochrome p-450 induced by pregnolone-16-alpha -carbonitrile. **J. Biol. Chem.**, **258**:10182-6, 1983.
- HART, L. G. & FOUTS, J. R. - Effects of acute and chronic DDT administration on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **114**: 388-93, 1963.
- HASKINS, S.C.; PATZ, J.D.; FARVER, T.B. - Xylazine and xylazine-ketamine in dogs. **A. J. Vet. Res.**, **47**:636-41, 1986.
- HEAVNER, J. E. Drug Interactions. In: Thurmon, J. C., Tranquilli, W. J. Benson, eds. **Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia**. 3 ed. Baltimore, Lea & Febiger, 1996. p.35-9.

- HENRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. - Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem. J.**, **265**:621-636, 1990.
- HOPKINS, N. E.; FOROOZESH, M. K.; ALWORTH, W. L. Suicide inhibitors of cytochrome p4501A1 and p4502B1. **Biochem. Pharmacol.**, **44** :487-96, 1992.
- HOYUMPA, A. M. & SCHENKER, S. - Influence of Liver Disease on the Disposition and Elimination of Drugs. In: Schiff, L.; Schiff, E. R., eds. - **Diseases of the Liver**, 7ed, Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1993. p. 784-824.
- IMAOKA, S.; YAMADA, T.; HIROI, T.; HAYASHI, K.; SAKAKI, T.; YABUSAKI, Y.; FUNAE, Y. - Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Pharmacol.**, **51**:1041-50, 1996.
- INSEL, P. A. - Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W., eds. - **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p. 617-57.
- JOLY, J. G.; ISHII, H.; TESCHKE, R.; HASUMURA, Y. K.; LIEBER, C. S. - Effect of chronic ethanol feeding on the activities and submicrosomal distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - cytochrome p-450 reductase and the for aminopyrine and ethylmorphine. **Biochem. Pharmacol.**, **22**:1532-5, 1973.
- JONES C.R. & LUBET, R.A. - Induction of a pleiotropic response by phenobarbital and related compounds: response in various inbred strains of rats, response in various species and the induction of aldehyde dehydrogenase in Copenhagen rats. **Biochem. Pharmacol.**, **44**:16651-1660, 1992.
- KATO, R. - Effects of starvation and refeeding on the oxidation of drugs by liver microsomes. **Biochem. Pharmacol.** **16**: 871-87, 1967.
- KATO, R.& VASSANELLI, P. - Induction of increased meprobamate metabolism in rats

- pretreated with some neurotropic drugs. **Biochem. Pharmacol.**, 11:779-94, 1965.
- KIM, H.J.; CHOI, E.S.; WADE, A.E. - Effect of dietary fat on the induction of hepatic microsomal cytochrome p-450 isozymes by phenobarbital. **Biochem. Pharmacol.**, 39:1423-30, 1990.
- KLINGEMBERG, M. - Pigments of rat liver microsomes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 75:376-86, 1958.
- KNIGHT, A. P. - Xylazine. **J.A.V.M.A.**, 176:454-5, 1980.
- KNODELL, R.G.; HOLTZMAN, J.L.; CRANKSHAW, D.L.; STEELE, N.M.; STANLEY, L.N. - Drug metabolism by rat and human hepatic microsomes in response to interaction with H<sub>2</sub>-receptor antagonists. **Gastroenterology**, 82:84-8, 1982.
- KOMULAINEN, A. & OLSON, M. - Antagonism of ketamine - xylazine anesthesia in rats by administration of yohimbine, tolazoline or 4 - aminopyridine. **Am. J. Vet. Res.**, 52:952-3, 1991.
- KOOP, D. R.; MORGAN, E. T.; TARR, G. E.; COON, M. J. - Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome p-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. **J. Biol. Chem.**, 257:8472-80, 1982.
- LEES, P. & HIGGINS, A. J. Clinical pharmacology and therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horse. **Equine Vet. J.**, 17:83-96, 1985.
- LEVINE, W.G. & PEREZ, E. - Microsomal reduction of dimethylaminoazobenzene (DAB). selective effects of carbon dioxide asphyxiation versus decapitation of animals and variation with age, sex and species. **Biochem. Pharmacol.**, 39:973-5 1990.
- LIEBER, C. S. & DeCARLI, L. M. - Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding. **Science**, 162:917-8, 1968.

- LIVINGSTON, A. & WATERMAN, A. E. - The development of tolerance and the significance of hepatic metabolism. **Br. J. Pharmac.**, **64**:63-9, 1978.
- LÖSCHER, W.; GANTER, M.; FASSBENDER, C.P. - Correlation between drug and metabolite concentrations in plasma and anesthetic action of ketamine in swine. **A. J. Vet. Res.**, **51**:391-8, 1990.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **243**:1331-2, 1951.
- LU, A. Y. H.; SOMOGYI, A.; WEST, S.; KUNTZMAN, R.; CONNEY, A. H. - pregnenolone-16-alpha-carbonitrile: a new type of inducer of drug metabolising enzymes. **Arch. Biochem. Biofys.**, **31**:277-95, 1972.
- LUBET, R.A.; DRAGNEV, K.H.; CHAUHAN, D.P.; NIMS, R.W.; DIWAN, B.A.; WARD, J.M.; JONES, C.R.; RICE, J.M.; MILLER, M.S. - A pleiotropic response to phenobarbital-type enzyme inducers in the F344/NCr rat: effects of chemicals of varied structures. **Biochem. Pharmacol.**, **42**:1067-78, 1992a.
- LUBET, R.A.; NIMS, R.W.; DRAGNEV, K.H.; JONES, C.R.; DIWAN, B.A.; DEVOR, D.E.; WARD, J.M.; MILLER, M.S.; RICE, J.M. - A markedly diminished pleiotropic response to phenobarbital and structurally-related xenobiotics in zucker rats in comparison with F344/NCr or DA rats. **Biochem. Pharmacol.**, **43**:1079-87, 1992b.
- LUC, P. T.; ADESNIK, M.; GANGULY, S.; SHAW, P. M. - Transcriptional regulation of the CYP2B1 and CYB2B2 genes by C/EBP- related proteins. **Biochem. Pharmacol.**, **51**:345-56, 1996.
- MAHNKE, A.; ROOS, P.H.; HANSTEIN, W.,G.; CHABOT, G.G. - In vivo induction of cytochrome p-450 CYP3A expression in rat leukocytes using various

- inducers. **Biochem. Pharmacol.**, **51**:1579-82, 1996.
- MARIETTA, M. P.; WHITE, P. F.; PUDWILL, C. R.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. - Biodisposition of ketamine in the rat: self - induction of metabolism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **196**:536-44, 1976.
- MASSONE, F. - **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**, 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1994. p.102-107.
- MASTERS, B. S. S., WILLIAMS Jr., C. H.; KAMIN, H. - The preparation of microsomal TPNH - cytochrome c reductase from pig liver. **Methods in Enzymology**, **X**:565-73, 1967.
- MATTSON, R. H.; CRAMER, J. A.; COLLINS, J. F.; SMITH, D. B.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; WILLIAMSON, P. D.; TREIMAN, D. M.; McNAMARA, J. O.; McCUTCHEN, C. B.; HOMAN, R. W.; CRILL, W. E.; LUBOZYNSKI, M. F.; ROSENTHAL, N. P.; MAYERSDORF, A. - Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. **N. Engl. J. Med.**, **313**:145-51, 1985.
- McNEIL, C. M. & MURRAY, M. - Inhibition of microsomal cytochromes p450 in rat liver by the tricyclic antidepressant drug desipramine and its primary oxidized metabolites. **Biochem. Pharmacol.**, **51**:15-20, 1996.
- McNAMARA, J. O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: Hardman, J.G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W., eds. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9 ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p. 461-86,
- MELISKA, C.J. & TREVOR, A.J.- Differential effects of ketamine on scheduled-controlled responding and motility. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **8**: 679-83, 1978.

- MERCER, H. D. The comparative pharmacology of chloramphenicol. *J.A.V.M.A.*, **176**:923-4, 1980.
- MÉNARD, D.; BERTELOOT, A.; HUGON, J. S. Action of phenobarbital on the ultrastructure and the enzymatic activity of the mouse intestine and the mouse liver. *Histochemistry*, **38**:241-52, 1974.
- MILLER, E. C.; MILLER, J.A.; BROWN, R. R. - The inhibitory effect of methylcholanthrene on rats fed the azo dye 3'-methyl - 4 - dimethylamino - azobenzene. *Cancer Res.*, **11**:274-81, 1952.
- MOHAMMAD, F. K.; AHMED, F. A.; AL KASSIM, N. A. H. - Effect of yohimbine on xylazine - induced diuresis in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, **31**:13-5, 1989.
- MULDER, K. J. & MULDER, J. B. Ketamine and Xilazine Anesthesia in the Mouse. *V.M./S.A.C.*, **74**:569, 1979.
- MURRAY, M. Inhibition and induction of cytochrome p450 2B1 in rat liver by promazine and chlorpromazine. *Biochem. Pharmacol.*, **44**:1219-22, 1992.
- NEBERT, D. W. & GONZALEZ, F.J. - P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**:945-93, 1987.
- NOSSAMAN, B. C.; AMOUZADEH, H. R.; SANGIAH, S. - Effects of chloramphenicol and phenobarbital on and tolerance to xylazine - ketamine anesthesia in dogs. *Vet. Hum. Toxicol.*, **32**:216-9, 1990.
- OKEY, A. B. - Enzyme induction in the cytochrome p - 450 system. *Pharmac. Ther.*, **45**:241-98, 1990.
- OKEY, A. B.; BONDY, G. P.; MASON, M. E.; KAHL, G. F.; EISEN, H. J.; GUENTHNER, T. M.; NEBERT, D. W. - Regulatory gene product of the Ah locus: characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.*, **254**:11636-48, 1979.

- OLIVEIRA, A.C.A.X. - **Efeitos do  $\beta$ -mirceno e outros monoterpenos sobre as monoxigenases hepáticas.** Rio de Janeiro, 1996. [Tese - Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz]
- OMURA, T. & SATO, R. - The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. **J. Biol. Chem.**, **239**:2370-8, 1964 a.
- OMURA, T. & SATO, R. - The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 2. Solubilization, purification, and properties. **J. Biol. Chem.**, **239**:2379-85, 1964 b.
- ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Oxygen activation and transfer. In: **Cytochrome p – 450 : structure, mechanism and biochemistry.** New York, Plenum, 1986. p. 217-71.
- ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. & CORREIA, M.A. - Suicidal destruction of cytochrome p-450 during oxidative drug metabolism. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **23**:481-503, 1983.
- ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. & REICH, N. O. Inhibition of cytochrome p - 450 enzymes. In: Ortiz de Montellano, ed. **Cytochrome P- 450 : structure, mechanism and biochemistry.** New York, Plenum, 1986. p. 273-314.
- PAGE, S. W. - Chloramphenicol : hazards of use and the current regulatory environment. **Austr. Vet. J.**, **68**:1-2, 1991.
- PARK, B. K. & BRECKENRIDGE, A. M. - Clinical implications of enzyme induction and enzyme inhibition. **Clinical Pharmacokinetics**, **6**:1-24, 1981.
- PHILLIPS, A. H. & LANGDON, R. G. - Hepatic triphosphopyridine nucleotide - cytochrome c reductase: isolation, characterization , and kinetic studies. **J. Biol.**

- Chem.**, 237:2652-60, 1962.
- PIEL, M. T.; ALDRETE, A. J.; JONES, G. Influence of enzyme induction on the sleeping time of rats. **Can. Anaes. Soc. J.**, 16:538-46, 1969.
- POLAND, A.; GLOVER, E.; KENDE, A. S. - Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin by hepatic cytosols: evidence that the binding species is a receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. **J. Biol. Chem.**, 251:4936-46, 1976.
- POLAND, A. & KNUTSON, J. C. - 3,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-*p*-dioxin, and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 22:349-59, 1982.
- POLAND, A.; MAK, I.; GLOVER, E.; BOATMAN, R. J.; EBETINO, F. H.; KENDE, A. S. - 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity. **Mol. Pharmacol.**, 18:571-80, 1980.
- POLAND, A.; MAK, I.; GLOVER, E. - Species differences in responsiveness to 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity. **Mol. Pharmacol.**, 20:442-50, 1981.
- REMMER, H. The role of the liver in drug metabolism. **Am. J. Med.**, 49:617, 1970.
- REMMER, H. & MERKER, H. J. Drug - induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug - metabolizing enzymes. **Science**, 14:1657-8, 1963.
- RICHARDSON, H. L. & CUNNINGHAM, L. - The inhibitory effect of methylcholanthrene on rats fed the azo - dye 3' - methyl - 4 dimethylaminoazobenzene. **Cancer Res.**, 11:274, 1951.
- ROBERTSON, L. W.; PARKINSON, A.; SAFE, S. - Induction of both cytochromes p-450 and p-448 by 2,3',4,4',5-pentabromobiphenyl, a component of firemaster. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 92:175-82, 1980.

- RODER, J. D.; AKKAYA, R.; AMOUZADEH, H. R.; SANGIAH, S., BURROWS, G.;  
QUALLS, C. W. - Effects of hepatic p - 450 enzyme inhibitors and inducers on  
the duration of xylazine - ketamine anesthesia in broiler chickens and mice. **Vet.  
Hum. Toxicol.**, **35**:116-8, 1993.
- SAKAGUCHI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; ISHIGURO, T.; TAMURA, H.;  
TAKEUCHI, A - Chemical restraint by metomidine-ketamine and its cardiopulmonary  
effects in pigs. **J. Vet. Med. A.**, **42**:293-9, 1995.
- SCHWARTZ-PORSCHKE, D.; LÖSCHER, W.; FREY, H. H. - Treatment of canine  
epilepsy with primidone. **J.A.V.M.A.**, **181**:592-5, 1982.
- SESARDIC, D.; COLE, K.J.; EDWARDS, R.J.; DAVIES, D.S.; THOMAS, P.E.; LEVIN,  
W.; BOOBIS, A.R. - The inducibility and catalytic activity of cytochromes p-450c  
( p450IA1 ) and p-450d ( p-450IA2 ) in rat tissues. **Biochem. Pharmacol.**,  
**39**:499-506, 1990.
- SETTEPANI, J.A. - The hazard of using chloramphenicol in food animals,. **J.A.V.M.A.**,  
**184**:930-1, 1984.
- SHAVELSON, R. J. - **Statistical reasoning for the behavioral sciences**. 2.ed.  
Boston, Allyn & Bacon, 1988. 744p.
- SHORT, C.R. & STITH, R.D. - Perinatal development of hepatic microsomal mixed  
function oxidase activity in swine. **Biochem. Pharmacol.**, **22**:1309-19, 1973.
- SILVA FILHO, A. P. F.; MONTEIRO L. H. V.; MELLO, J. R. B.; TANNHAUSER, S. L.  
- Emprego da cetamina e xilazina para anestesia em ratos de diferentes faixas  
etárias, em ambos os sexos. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E  
ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA Curitiba, PR, 1994. **Anais**. Curitiba, PR,  
1994. p. 31.

- SIRICA, A. E. & PITOT, H. C. - Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. **Pharmacol. Rev.**, **31**:205-28., 1980.
- SMITH, L. A. & WEBER, A. - Pharmacology of chloramphenicol. **Pediatric Clinics of North America**, **30**: 209-35, 1983.
- STICKROD, G. - Ketamine / xylazine anesthesia in the pregnant rat. **J.A.V.M.A.**, **189**:1040-3, 1979.
- TESKE, R. H. & CARTER, G. G. - Effect of chloramphenicol on pentobarbital-induced anesthesia in dogs. **J.A.V.M.A.**, **159**:777-80, 1971.
- THURMON, J. C.; NELSON, D. R.; CHRISTIE, G. J. - Ketamine anesthesia in swine. **J.A.V.M.A.**, **160**:1325-30, 1972.
- THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J.; - Cardiopulmonary responses of swine to intravenous infusion of guaifenesin, ketamine and xylazine. **A. J. Vet. Res.**, **47**:2138-40, 1986.
- TUKEY, R. H.; NEBERT, D. W.; NEGISHI, M. - Structural gene product of the [ Ah ] gene complex: evidence for transcriptional control of cytochrome P<sub>1</sub>-450 induction by use of a cloned DNA sequence. **J. Biol. Chem.**, **256**:6969 - 74, 1981.
- VAN PELT, L. F. - Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. **J.A.V.M.A.**, **171**:842-4, 1977.
- VOLL, R.; WENTZ, I.; WALD, O. - Observações preliminares sobre o uso de xilazina associado com cloridrato de ketamina nas intervenções cirúrgicas como anestésico geral em cães. In: CONGRESSO ESTADUAL DA SOVERGS, 4, Porto Alegre, 1975. **Anais**. Porto Alegre, 1975. p. 93.
- WALTON, M. I.; WOLF, C. R.; WORKMAN, P. - The role of cytochrome p450 reductase in the reductive bioactivation of the novel benzotriazina di - n - oxide hypoxic cytotoxin 3 - amino - 1, 2, 4 - benzotriazine - 1 - 4 dioxide ( SR 4233, Win 59075

- ) by mouse liver. **Biochem. Pharmacol.**, **44**:251-9, 1992.
- WARTEMBERG, L. W.; PAGE, M. A.; LEONG, J. L. - Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. **Cancer Res.**, **28**:934-7, 1968.
- WATKINS, P. B. - Role of cytochrome p-450 in drug metabolism and hepatotoxicity. **Sem. Liver Dis.**, **10**:239-50, 1990.
- WATSON, A. D. J. Chloramphenicol 2.: clinical pharmacology in dogs and cats. **Austr. Vet. J.**, **68**:2-5, 1991.
- WHITE, P. F.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. - Ketamine: its pharmacology and therapeutic uses. **Anesthesiology**, **56**:119-36, 1982.
- WIEBER, J.; GUGLER, R.; HENGSTMANN, J. H. - Pharmacokinetics of ketamine in man. **Anaesthetist**, **24**:260-3, 1975.
- WILLIAMS, J.F.; BEMENT, W.J.; SINCLAIR, J.F.; SINCLAIR, P.R. - Effect of interleukin 6 on phenobarbital induction of cytochrome p-450IIB in cultured rat hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **178**:1049-55, 1991.
- WORTELBOER, H. M.; DE KRUIF. C. A.; VAN IERSEL, A. A. J.; FALKE, H. E.; NOORDHOEK, J.; BLAAUBOER, B. J. - Comparison of cytochrome p-450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures: the effects of model inducers on apoproteins and biotransformation activities. **Biochem. Pharmacol.**, **42**:381-90, 1991.
- WRIGHT, M. - Pharmacology effects of ketamine and its use in veterinary medicine. **J.A.V.M.A.**, **180**:1462-71, 1982.
- YUNIS, A. A. - Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **28**:83 - 100, 1988.
- ZBINDEN, G. Fine needle aspiration biopsy of the rat liver: cytological,

**cytochemical and biochemical methods.** Oxford, Pergamon, 1980. 68 p.

## ABSTRACT

The cytochrome P - 450 system, including families and sub-families of isoenzymes, catalyzes the metabolism of a great number of endogenous and exogenous substrates and plays a central role on drug detoxification and carcinogen metabolic activation.

Many drugs have the ability of increasing cytochrome P - 450 system enzymatic activity. Others decrease enzymatic activity. The first phenomenon is called enzymatic induction and the second one is defined as enzymatic inhibition.

Sleeping time is the most visible *in vivo* alteration in drug - interaction involving anesthetic agents. Influence of previous administration of phenylbutazone and chloramphenicol on xylazine - ketamine anesthesia in rats, dogs and pigs was studied.

Both phenylbutazone and chloramphenicol have been widely used in veterinary practice.

Phenylbutazone is an antiinflammatory compound and a phenobarbital-like enzyme inductor but less potent than the barbiturate. Chloramphenicol is an antibiotic with inhibitory properties on the cytochrome P - 450 system increasing the effects of drugs like barbiturates, phenytoin, warfarin and digoxin.

Xylazine hydrochloride is an  $\alpha_2$  - adrenergic agonist with analgesic, sedative and muscle relaxant properties. Ketamine hydrochloride is a compound with cataleptic, analgesic and anesthetic properties producing the so called dissociative anesthesia. Xylazine and ketamine have been used in combination to promote anesthesia in different animal species.

Fifty four rats were divided into three groups designed as control (CTL), phenylbutazone (PBZ), and chloramphenicol (CHP), with 18 rats in each group.

Dogs (n=18) and pigs (n=18) were divided into three groups on each species, called CTL group, PBZ group, and CHP group. Each group was formed by six animals.

On the first day of the experiment the animals of CTL, PBZ and CHP groups were anesthetized with xylazine (20 mg . kg<sup>-1</sup> i.p., rats; 1 mg . kg<sup>-1</sup> i.v., dogs and pigs) and ketamine (50 mg . kg<sup>-1</sup> i.p., rats; 10 mg . kg<sup>-1</sup> i.v., dogs and pigs). Latency and duration of righting reflex loss were recorded in rats, dogs and pigs. Walking ability was recorded in pigs.

From the day six to day 10 the animals of CTL, PBZ and CHP groups were injected with physiologic solution, phenylbutazone (125 mg . kg<sup>-1</sup> i.p., rats; 25 mg . kg<sup>-1</sup> i.v., dogs; 25 mg . kg<sup>-1</sup> i.p., pigs) and chloramphenicol (100 mg . kg<sup>-1</sup> i.p., rats; 50 mg . kg<sup>-1</sup> i.v., dogs; 50 mg . kg<sup>-1</sup> i.p., pigs). Physiologic solution was administered i.v in dogs and i.p. in rats and pigs of CTL group.

The procedures of the first day were repeated on the tenth day and the animals were killed.

Rat livers were weighed and pooled by group and experiment. Dog and pig livers were processed individually.

Hepatic microsomes were prepared according GUENGERICH (1994). Liver protein concentration was determined by the method described by LOWRY *et al.* in 1951. Cytochrome P - 450 concentration was measured according OMURA & SATO (1964a). NADPH - cytochrome C reduction reactions were processed as described by PHILLIPS & LANGDON (1962).

Data were analyzed by ANOVA, Student - Newman - Keuls and Pearson tests. The level of significance was established in  $\alpha = 0.05$ .

Sleeping time was decreased by phenylbutazone in rats and increased by chloramphenicol in rats and dogs. Livers were heavier in PBZ group than in the other groups. Reduction of NADPH - cytochrome C was increased in PBZ group in all species, indicating enzymatic induction. The same parameter showed a decrease in CHP group in pigs. There were inverse correlation between sleeping time and enzymatic activity in rats and pigs.