

## Tesis de Posgrado

# Efecto de la prometazina (Fenergan) sobre las enzimas que metabolizan tóxicos y fármacos

Fernandez, Graciela

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Fernandez, Graciela. (1978). Efecto de la prometazina (Fenergan) sobre las enzimas que metabolizan tóxicos y fármacos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1576\\_Fernandez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1576_Fernandez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Fernandez, Graciela. "Efecto de la prometazina (Fenergan) sobre las enzimas que metabolizan tóxicos y fármacos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1576\\_Fernandez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1576_Fernandez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EFFECTO DE LA PROMETAZINA (FENERGAN) SOBRE LAS  
ENZIMAS QUE METABOLIZAN TOXICOS Y FARMACOS

GRACIELA FERNANDEZ

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Químicas

- 1978 -

*Recy*

Agradezco muy especialmente al Dr. José Alberto Castro, Director de esta Tesis, las enseñanzas, la dedicación y el apoyo brindados para la realización de este trabajo.

**Agradezco también:**

**A mis compañeros del Laboratorio de Química  
Bio-Toxicológica, CITEFA, por su cordial  
amistad.**

A mi madre

A mi hermana

## INDICE

Introducción	página 1
Parte experimental	página 25
Resultados	página 34
Discusión	página 60
Bibliografía	página 75

## INTRODUCCION

Los antihistamínicos son sustancias que antagonizan los efectos fármacodinámicos producidos por la histamina.

Este grupo de drogas ha sido obtenido por síntesis y su mecanismo de acción lo ejercen ocupando los sitios receptores sobre las células efectoras bloqueando o impidiendo la respuesta de las mismas a la histamina.

Los antihistamínicos ofrecen gran interés no solamente para el estudio de la acción fisiológica de la histamina sino también desde el punto de vista terapéutico en el tratamiento de enfermedades como la alergia.

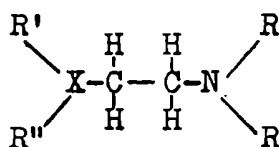
Desde la descripción de la acción de la histamina por Dale y Laidlaw (1910) (1) transcurrieron varios años hasta el descubrimiento de drogas que bloquearan su actividad.

Los primeros intentos fueron realizados por Bovet y Staub (1937) (2) en una serie de aminas con función eterfenólica, y en 1942 Halpern (3) propuso un derivado de la dimetil-amina, el Antergan, que fue el primer antihistamínico usado en terapia.

Luego de la década del cuarenta se obtuvo una información masiva con respecto a la relación estructura actividad y se produjo la síntesis de numerosos compuestos que revelaron tener propiedades antihistamínicas.

La mayoría de los antihistamínicos pueden ser descriptos

por la siguiente fórmula estructural:

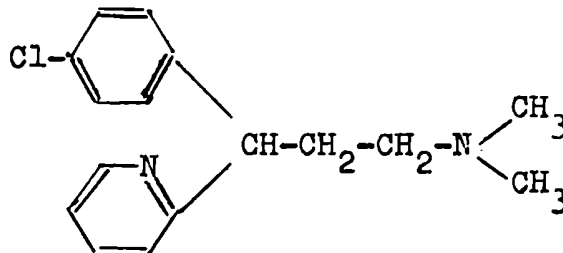


La parte central de esta estructura es una etil amina sustituida  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ , presente también en la histamina.

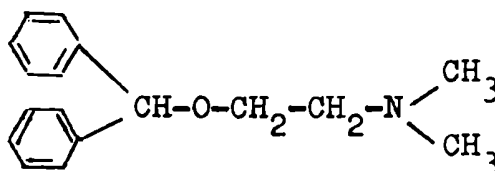
Los  $\text{R}'$  y  $\text{R}''$  pueden ser anillos aromáticos y heterocíclicos; el elemento  $\text{X}$  puede ser un átomo de oxígeno, carbono o nitrógeno.

En general, se pueden clasificar como (4):

1) derivados de la propilamina, donde  $\text{X}$  es un átomo de carbono, por ejemplo la clorfeniramina.



2) derivados de la etanol amina, donde  $\text{X}$  es un átomo de oxígeno, por ejemplo la difenhidramina (Benadryl).



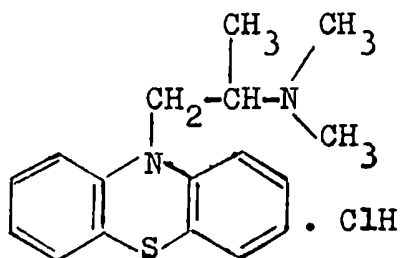
3) derivados de la etilendiamina, donde  $\text{X}$  es un átomo de nitrógeno.

A este grupo corresponde la Prometazina (Fenergan), uno de los antihistamínicos de gran uso en nuestro medio y en otros



países y que es motivo del presente estudio.

Su estructura es la siguiente:



Clorohidrato de 10-(3 dimetil amino isopropil)fenotiazina

Halpern y Ducrot (1946) (5) encontraron que este derivado de la fenotiazina tenía alta actividad antihistamínica.

Este y otros antihistamínicos se administran oralmente y son absorbidos rápidamente en el tracto gastro-intestinal.

El principal sitio de metabolización es el hígado, pero también son metabolizados en parte en riñón y pulmones (6).

Estos compuestos son hidroxilados y conjugados, procesos estos que constituyen una desintoxicación y a su vez conducen a pérdida de actividad farmacológica y facilitan su excreción por los riñones.

La respuesta farmacológica de los antihistamínicos y otras drogas así como su toxicidad son controladas en gran parte por la velocidad a la cual ellas son metabolizadas y excretadas.

De un metabolismo de drogas alterado dependerá el destino metabólico de la droga y también la actividad farmacológica aumentada o disminuida de los metabolitos resultantes. O sea, de la inhibición o estimulación de las enzimas que metabolizan drogas, puede resultar un efecto farmacológico o toxicológico

umentado (7-11).

Los efectos tóxicos asociados con la interacción de drogas también dependen de la frecuencia de uso de una droga, ya sea administrada sola o en combinación con otras.

Los antihistamínicos han encontrado un uso muy extenso y amplio en la terapéutica moderna, involucrando frecuentemente la administración repetida y combinada con otras drogas (6,12).

Si bien muchos compuestos son capaces de acelerar el metabolismo de drogas y acortar la acción de las mismas por incrementar la actividad de las enzimas metabolizantes de drogas, no se dispone de una información detallada de los efectos de los antihistamínicos sobre los componentes del sistema microsomal hepático involucrado en el metabolismo de drogas.

Este sistema es sumamente inespecífico y procesa un gran número de sustancias extrañas al organismo, controlando tanto su degradación a compuestos menos tóxicos como la ocasional activación a compuestos más tóxicos (13).

Un caso típico que ejemplifica como este sistema microsomal hepático controla el efecto farmacológico/toxicológico de un compuesto es el de los barbituratos. Si tomamos el caso de un barbiturato, por ejemplo el pentobarbital, éste produce sobre un animal un efecto de hipnosis. El animal, bajo sus efectos sobre el sistema nervioso central y a una dosis dada, sufre hipnosis durante cierto tiempo. De no existir una

transformación enzimática que destruya el pentobarbital, su efecto sería tan prolongado que el animal moriría, puesto que su liposolubilidad a pH urinario impediría su excreción renal.

Las enzimas microsomales hepáticas antes mencionadas al transformar el pentobarbital en metabolitos farmacológica/toxicológicamente inactivos y excretables por riñón acortan la duración de su efecto. Es decir, cuanto mayor es la capacidad metabolizante del sistema microsomal hepático que transforma sustancias extrañas al organismo, menor es el efecto del barbiturato, o sea el tiempo que el animal está bajo sus efectos hipnóticos. Como el sistema enzimático microsomal es sumamente inespecífico y procesa infinitas drogas, y tóxicos diferentes, el medir los efectos que tienen distintos compuestos sobre el tiempo de hipnosis por un barbitúrico, por ejemplo el pentobarbital, a menudo permite obtener información de tipo más general aplicable a otros compuestos. Esta propiedad se emplea en este estudio.

Durante los últimos doce años, los sistemas enzimáticos localizados en el retículo endoplásmico han sido objeto de numerosos y profundos estudios. Este interés es justificado, ya que se ha demostrado que una amplia variedad de compuestos exógenos son metabolizados en el retículo endoplásmico, el cual es disgregado en la homogenización en partículas llamadas microsomas.

El retículo endoplásmico es un sistema de membranas del

citoplasma, que se elabora a partir de la membrana nuclear y se distinguen en él dos formas:

- 1) una forma reticular rugosa con ribosomas
- 2) una forma tubular, sin gránulos, lisa, desprovista de ribosomas.

Si bien los ribosomas juegan un rol importante en la síntesis de proteínas, ellos no contienen las enzimas específicas para el metabolismo de drogas.

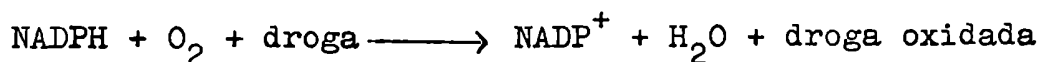
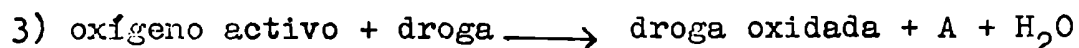
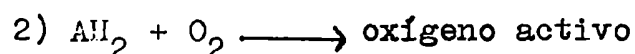
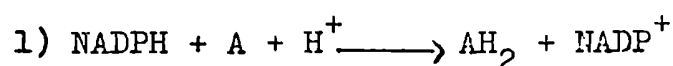
El tratamiento de los microsomas hepáticos con ribonucleasa, la cual destruye los mecanismos de síntesis proteica en ribosomas, no altera la actividad de las enzimas metabolizantes de drogas. Más aún, se ha encontrado que las enzimas ligadas a la superficie lisa metabolizan más rápidamente que la rugosa (14).

La versatilidad de este sistema enzimático es virtualmente única en bioquímica porque cataliza una amplia variedad de reacciones diversas como la oxidación de hidrocarburos saturados y aromáticos, la dealquilación de aminas secundarias y terciarias, la ruptura oxidativa de éteres, la sulfooxidación de tioéteres, la epoxidación de hidrocarburos aromáticos halogenados y alquenos, la conversión de fosfotriésteres a derivados fosfatos.

Los primeros estudios sobre la naturaleza de estas enzimas oxidativas demostraron que requerían NADPH y oxígeno molecular.

El sistema microsomal metabolizante de drogas se piensa como una función oxidasa mixta, mecanismo por el cual el NADPH reduce un componente de microsomas, el cual reacciona con el oxígeno molecular para formar un "oxígeno activo" intermedio.

El oxígeno activo es transferido a la droga (7)



En 1965 Cooper y colaboradores (15) establecieron que el componente reducido es una hemoproteína, llamada citocromo P-450, ya que en su forma reducida da un pico de absorción a 450 nm en presencia de CO.

Una amplia variedad de evidencias que van desde el hallazgo inicial de que el citocromo C inhibe varias reacciones (16) hasta el hallazgo de que un anticuerpo de la NADPH citocromo C reductasa bloquea la hidroxilación de la anilina, han afirmado la creencia de que la NADPH citocromo C reductasa media la reducción del citocromo P-450.

Es decir, las enzimas involucradas en la reacción son la NADPH citocromo C reductasa, una flavoenzima involucrada en la oxidación de NADPH; el citocromo P-450, (el cual en su forma reducida es considerado A en la reacción anterior) y una



En general, se observan dos tipos de cambios espectrales:

1) Tipo I, con un incremento de absorbancia a 385-390 nm y un decrecimiento a 418-427 nm.

Este tipo de cambio espectral lo producen sustancias como el hexobarbital, la aminopirina y la etilmorfina.

2) Tipo II, con un incremento de absorbancia a 425-435 nm y un decrecimiento a 390-395 nm; este cambio espectral es producido por sustancias tales como la nicotinamida, la anilina, DPEA (2,4, dicloro 6 fenil etoxi etil amina).

En general, los compuestos que producen cambios espectrales tipo I o II, son conocidos como droga tipo I o II respectivamente.

Las evidencias que estos cambios espectrales eran producidos por interacción con el citocromo P-450 fueron obtenidas por Imai, Sato y colaboradores (18), quienes comprobaron que:

a) la magnitud del cambio espectral es proporcional al contenido del P-450 en diferentes preparaciones microsomales.

b) el isocianuro de etilo se combina con los microsomas aerobios, produciendo un espectro con un máximo a 434 nm.

La anilina, un compuesto tipo II interfiere competitivamente con la unión del isocianuro de etilo al P-450.

Además, Lu y Coon (19) encontraron que el citocromo P-450 solubilizado y parcialmente purificado se combina con compuestos tipo I y II dando los espectros característicos.

Es de gran interés observar que existe una aparente re-

lación entre la cinética del metabolismo de drogas y la cinética de interacción de las mismas con el citocromo P-450.

Si de acuerdo con el método de Lineweaver y Burk (20), se grafica la densidad óptica del cambio espectral versus la concentración de la droga, se puede derivar una constante de disociación espectral ( $K_s$ ) de la misma forma en que se obtiene  $K_m$  (la constante de Michaelis) para la oxidación de este mismo compuesto, graficando la recíproca de la velocidad versus la recíproca de la concentración.

En numerosos casos se encontró que la  $K_s$  y la  $K_m$  eran similares para un compuesto dado.

En atmósfera de CO las sustancias tipo I aceleran la reducción del citocromo P-450 por el NADPH, pero las sustancias tipo II la desaceleran.

Más aún, en aire la oxidación del NADPH es estimulada por sustratos tipo I, pero no se afecta o es inhibida por sustancias tipo II.

Este hallazgo confirmó que el paso limitante para la oxidación de compuestos tipo I debe ser la reducción del complejo P-450 - sustrato (I), cosa que previamente ya había sido sugerida (21).

Para las sustancias tipo II aún debe ser determinado.

Es altamente probable que la velocidad de oxidación de una droga por los microsomas hepáticos puede ser alterada si se afecta cualquiera de los componentes del sistema, incluyendo



el contenido de P-450, la capacidad de un sustrato para combinarse con el P-450, la cantidad de NADPH citocromo C reductasa, la relación entre NADPH citocromo C reductasa y P-450 y la afinidad del sustrato por el complejo "oxígeno activo - P-450".

Por esta razón, es que se usan una variedad de tests para evaluar los cambios en la velocidad del metabolismo de drogas.

#### Variaciones en el metabolismo de las drogas

En ciertas condiciones el metabolismo de las sustancias exógenas está acelerado, en ciertos casos, por el contrario, está disminuido.

Las actividades de las enzimas microsomales pueden ser modificadas por factores genéticos (22,23), fisiológicos (24, 25), y por factores externos como la exposición a contaminantes ambientales y la administración de drogas.

La administración repetida de una amplia variedad de sustancias puede acelerar el metabolismo de las drogas y acortar la duración de la acción de la droga por incrementar la actividad de las enzimas que metabolizan los tóxicos y fármacos.

La mayoría de los estudios se han hecho con fenobarbital y con los hidrocarburos policíclicos 3-metil colantreno y 3,4 benzopireno.

Luego del descubrimiento de la inducción por estas sustancias se comprobó que el fenobarbital y los hidrocarburos poli-

cíclicos ejercían sus efectos por distintos mecanismos.

El fenobarbital administrado a ratas intensifica la mayoría de las reacciones catalizadas por el citocromo P-450, incluyendo el metabolismo de etil morfina, hexobarbital, aminopirina, acetanilida y el 3,4 benzopireno; incrementa la actividad de la NADPH citocromo C reductasa, el contenido de P-450 y la velocidad de reducción del P-450 y la magnitud de los cambios espectrales tipo I y II.

La administración de 3 metil colantreno estimula un grupo más limitado de reacciones, aumenta el contenido de P-450 pero no la actividad de la NADPH citocromo C reductasa ni la velocidad de reducción del P-450. Incrementa la magnitud de los cambios espectrales tipo II, pero no modifica o decrece los cambios espectrales tipo I (26).

Además, el máximo del complejo citocromo P-450 está alrededor de los 448 nm más bien que en los 450 nm, y el coeficiente de extinción es más alto que en los microsomas de los animales usados como control.

Imai y colaboradores (27) encontraron que el isocianuro de etilo se combina con el citocromo P-450 reducido dando picos a 430 y 455 nm y que la altura del máximo a 430 decrece cuando aumenta el pH y la altura a 455 nm aumenta, y estas alturas se igualan a  $\text{pH} = 7,4-7,5$ .

Con la administración de 3 metil colantreno, la altura de los máximos se iguala a  $\text{pH} = 6,9$  en lugar de  $\text{pH} = 7,4$ .

Estos hallazgos llevaron a la conclusión que los hidrocarburos policíclicos inducen la síntesis de una variante de citocromo P-450, llamado P-448.

Iu y colaboradores (28) aislaron y purificaron el citocromo P-450 de ratas tratadas con fenobarbital y el P-448 de ratas tratadas con 3 metil colantreno. Ellos encontraron que los citocromos purificados eran diferentes con respecto a sus propiedades inmunológicas, catalíticas, espectrales y presentaban distinta movilidad electroforética.

Arcos y colaboradores (29) demostraron que muchos hidrocarburos policíclicos incrementan el tamaño del hígado con un aumento proporcional en las proteínas totales del hígado; si bien el 3 metil colantreno incrementa el contenido total de proteínas no cambia la cantidad de proteínas por gramo de hígado.

Gelboin (30) y Kato y colaboradores (31) examinaron los mecanismos por los cuales el metil colantreno y el fenobarbital estimulan la síntesis proteica.

El sistema microsomal que incorpora aminoácidos puede ser descrito operacionalmente como consistente de dos partes: el RNA mensajero y el sitio de incorporación de aminoácidos microsomal, esto es el complejo proteico de RNA microsomal donde el mensajero " programa " la incorporación .

De acuerdo con estos experimentos, se sugiere que el 3 metil colantreno produce más RNA mensajero, y el fenobarbital induce un incremento en el contenido de RNA mensajero microso-

mal, y el número total de los sitios de unión microsomales para el RNA mensajero.

Se ha estudiado el efecto de los inhibidores de la síntesis proteica sobre la inducción producida por el fenobarbital y los hidrocarburos policíclicos.

La etionina bloquea la síntesis de proteínas por convertirse en S adenosil etionina y previene la síntesis de ATP (32).

La prevención de la síntesis de proteína por este inhibidor es compleja, porque puede ocurrir a diferentes niveles tales como la activación de aminoácidos, en la síntesis del RNA mensajero o RNA de transferencia, o la síntesis del polipéptido (33).

La puromicina bloquea la síntesis a nivel microsomal por prevenir la transferencia de RNA soluble unido a aminoácidos a la cadena polipeptídica (34).

La actinomicina D es un inhibidor de la síntesis de RNA dependiente de DNA (35).

Se ha encontrado que la etionina previene la inducción de la benzopireno hidroxilasa y la hidroxilación de acetyl amino-fluoreno (36,37).

La puromicina inhibe completamente el aumento de actividad de la benzopireno hidroxilasa producida por el 3 metil colantreno, y también la inducción producida por el fenobarbital en la N-demetilación, en la actividad de la NADPH citocromo C

reductasa y el contenido de P-450 (30,38).

Se encontró también que la administración de actinomicina D bloquea el aumento de la síntesis de P-450 y de proteínas microsomales (39).

Si bien el aumento cuantitativo de una enzima puede obtenerse por incremento de su síntesis, también puede lograrse por la inhibición de su degradación, o por los dos procesos simultáneamente (40).

Hasta hace treinta años se consideraba generalmente la célula como una máquina química en la cual los nutrientes exógenos se acumulaban para proveer energía, hasta que se comprobó que los componentes celulares están sujetos a un recambio metabólico, siendo sintetizados y reemplazados continuamente.

Sin embargo, hasta ahora, la degradación continua de los componentes celulares ha recibido una menor atención en los trabajos de investigación. Como consecuencia, se han hecho menores progresos en la comprensión de los mecanismos y significación biológica de la degradación.

Si bien la continua degradación de las proteínas celulares parece en primera instancia un suceso que no favorece la economía de la célula, recientes estudios han señalado diversas funciones importantes que cumple el recambio proteico.

1) Una función importante del catabolismo proteico es probablemente la remoción de proteínas anormales, las cuales pueden provenir por mutaciones, errores en la expresión genética,

desnaturalización o modificaciones químicas.

La degradación de los componentes celulares anormales es especialmente importante en células que crecen lentamente (por ejemplo: la mayoría de los tejidos de mamíferos), las cuales a diferencia de las bacterias, no pueden diluir tales proteínas por crecimiento rápido.

2) El continuo recambio de proteínas puede incrementar significativamente la capacidad del organismo a adaptarse a los cambios que pueden ocurrir en su entorno.

Por ejemplo, en el hígado de mamíferos, durante el ayuno son sintetizadas las enzimas apropiadas para las reacciones catabólicas (ejemplo: las enzimas gluconeogénicas), mientras que muchas de las enzimas involucradas en procesos anabólicos son degradadas más rápidamente (ejemplo: las proteínas ribosomales) (41).

3) La degradación proteica es otro camino de ayuda para el organismo a soportar tiempos difíciles.

En todos los organismos las proteínas celulares constituyen un reservorio de energía que puede ser movilizado en tiempo de menor ingestión calórica. Esto es, en mamíferos los reservorios de proteínas en músculo e hígado proveen de aminoácidos que pueden ser oxidados o convertidos en glucosa. La provisión de tales aminoácidos se regula hormonalmente a tra-

vés de efectos tanto en sus velocidades de síntesis como en la degradación.

Por ejemplo, la insulina, que es probablemente la hormona más importante que afecta el balance proteico en la mayoría de los tejidos, se encontró que retarda el catabolismo proteico (42) en músculo cardíaco, hígado y tejido adiposo.

Ahora está bien establecido que las proteínas celulares (ya sean solubles, de organelas o unidas a membrana) pueden ser sintetizadas y degradadas muchas veces durante el lapso de vida de la célula.

Las proteínas, en las células de mamíferos, son degradadas a aminoácidos a velocidades características.

Por ejemplo, las proteínas de hígado de rata tienen un promedio de vida de 3,5 días, pero la vida media de una enzima puede variar entre 11 minutos y 19 días.

La explicación más simple para esta marcada diferencia en la estabilidad es que la vida media de la proteína, así como sus propiedades catalíticas y reguladoras es un rasgo inherente de la estructura proteica. En efecto, existe ahora evidencia suficiente como para concluir que la selectividad del proceso degradativo reside en la conformación proteica individual.

Esta afirmación está sostenida por cuatro tipos de evidencias:

- 1) Alteraciones en la conformación normal de las proteínas pueden afectar marcadamente las velocidades de degradación proteica; como ya se ha mencionado una función útil de la degrada-

ción es la eliminación de proteínas anormales y potencialmente dañinas.

Hay numerosas evidencias de que en las células de bacterias y en las células animales se pueden hidrolizar selectivamente las proteínas anormales. Por ejemplo, la incorporación de análogos de valina y lisina en la hemoglobina de los reticulocitos conduce a un rápido catabolismo de esta proteína (43).

2) La velocidad degradativa de las proteínas se correlaciona con su tamaño.

Se ha encontrado que las proteínas de mayor tamaño molecular se degradan más rápidamente que las pequeñas (44,45).

Se ha sugerido que una posible base para la correlación entre tamaño molecular y velocidad degradativa es que las proteínas de mayor tamaño son más susceptibles a la degradación proteolítica (46).

Otra razón sería que la conformación nativa de las proteínas de mayor tamaño tendería a ser menos estable y por lo tanto tienden más a desnaturalizarse, lo que las haría más susceptibles al ataque por las proteasas.

Además, las proteínas de mayor tamaño pueden contener, con mayor probabilidad, errores en la secuencia de aminoácidos lo cual alteraría la conformación proteica, lo que conduciría a su rápida degradación.

3) La interacción de las proteínas con moléculas pequeñas



puede cambiar la conformación proteica y su velocidad de degradación.

Se conoce un cierto número de ejemplos en células de mamíferos donde la velocidad de catabolismo proteico cambia como respuesta a la adición de sustratos, coenzimas y otros factores que se unen a los polipéptidos. Hay muchas pruebas que indican que estos efectos sobre la degradación son una consecuencia de la alteración que inducen los ligandos en la conformación proteica.

4) La velocidad del catabolismo proteico aparece relacionada con la sensibilidad a las proteasas in vitro.

Como ya se mencionó, las células animales y bacterianas pueden degradar selectivamente las proteínas anormales. Goldberg (47) ha demostrado que varias condiciones que inducen a la formación de proteínas anormales y por lo tanto promueven su degradación también incrementan la sensibilidad del promedio de las proteínas celulares a una variedad de endoproteasas.

Ha sido largamente reconocido que los polipéptidos desnaturalizados son mucho más rápidamente hidrolizados por enzimas proteolíticas que en su conformación nativa (48,49).

El desdoblamiento de ciertos polipéptidos puede incrementar la sensibilidad proteolítica en dos o tres órdenes de magnitud. Este efecto, que está bien documentado podría explicar la degradación selectiva de las proteínas en las células (47).

De acuerdo con este modelo simple, las proteínas normales

deben participar de ciertos rasgos conformacionales, los cuales previenen su rápida hidrólisis; las desviaciones de tal conformación las haría entonces más sensibles a la maquinaria degradativa.

Además, las velocidades de degradación varían bajo diferentes condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en bacterias y tejidos de mamíferos, las velocidades promedio del catabolismo proteico incrementan reversiblemente durante el ayuno (50).

Similarmente, las velocidades promedio de la degradación proteica en músculo pueden ser influenciadas por el cambio en los nutrientes (51), hormonas (por ejemplo: insulina) (52), denervación (53) y actividad contráctil (52).

Se ha informado frecuentemente que los inhibidores de la síntesis proteica también puede reducir la degradación proteica tanto en células animales como en bacterias. Estos efectos inesperados solo pudieron ser demostrados en células con estados nutricionales pobres.

Es altamente improbable que los inhibidores de la síntesis proteica puedan inhibir la maquinaria degradativa. Inhibidores con distintos sitios de acción y estructura pueden todos reducir la degradación, y ninguno puede inhibir la proteólisis en extractos libres de célula (54,55).

Es posible que estos inhibidores bajen el catabolismo proteico en células ayunadas por prevenir la síntesis de una proteasa, que es responsable de la degradación aumentada.

Alternativamente, estos inhibidores pueden prevenir la síntesis de un polipéptido que mejora la degradación durante el ayuno, ya sea por estimulación de proteasas ya existentes o por incrementar la susceptibilidad de las proteínas celulares a esas enzimas degradativas.

Uno de los obstáculos en la comprensión de la degradación proteica han sido las dificultades metodológicas involucradas en la medición de este proceso.

Un método comunmente usado para estimar la velocidad degradativa involucra el análisis de la velocidad a la cual la concentración de una enzima cambia de un estado estacionario a otro.

Por medición de la concentración enzimática a diferentes tiempos (por ejemplo, durante la inducción por una hormona) se calcula la velocidad de degradación proteica. Este método tiene sus inconvenientes, ya que se hacen muchas aproximaciones, por ejemplo: que la velocidad de síntesis y de degradación son constantes durante la adaptación enzimática, y que la velocidad de pérdida de enzima, luego de remover el inductor es equivalente a la velocidad de degradación proteica.

Otra alternativa para la medición de la degradación de ciertas proteínas (histona, colágeno) que contienen aminoácidos únicos formados por modificaciones post-translacionales ( como por ejemplo arginina metilada), la medición de la producción de dichos aminoácidos permite una estimación de la degradación proteica.

Las técnicas más difundidas en la actualidad son las que se basan en el uso de isótopos.

El método más comúnmente usado involucra una única administración intraperitoneal o intravenosa de un isótopo precursor de la proteína, normalmente un aminoácido.

El decaimiento de la actividad específica de la proteína o de la cantidad total de la proteína radioactiva es tomado como una medida de la velocidad de degradación proteica, con la suposición que las nuevas proteínas que son sintetizadas, no son radioactivas.

Esta situación ideal no es fácil de alcanzar experimentalmente, dado que el aminoácido liberado por degradación proteica en el organismo puede ser reutilizado en una nueva síntesis.

El grado de reutilización de los aminoácidos después de la incorporación en la proteína y la liberación en el pool intracelular es difícil de estimar. Más de un cincuenta por ciento de los aminoácidos del pool intracelular del hígado de rata derivan de la degradación proteica (56).

La reutilización isotópica puede ser minimizada, teóricamente por el uso de un isótopo cuya probabilidad de reutilización es pequeña. En el hígado de animales ureolíticos la  $^{14}\text{C}$  guanidino L-arginina aparece como tal isótopo (57).

La forma isotópica de la arginina tiene reutilización mínima debido a la gran cantidad de arginasa del hígado. Esto es, el isótopo administrado es rápidamente hidrolizado a urea marcada,

la cual es excretada; o sea que la arginina marcada que reingresa al pool de aminoácidos libres es también hidrolizada rápidamente, y por lo tanto no es reutilizada.

Otra técnica isotópica se basa en administración continua de un precursor marcado cuya actividad específica es constante.

La velocidad de degradación es determinada por la velocidad a la cual la incorporación se aproxima a su valor máximo. Teóricamente el isótopo saturaría instantáneamente el pool de aminoácidos libres de donde la proteína es sintetizada. Este requerimiento es una de las mayores limitaciones de este método ya que la velocidad a la cual la proteína marcada reemplaza a la no marcada es función no solo de la velocidad de degradación de la proteína sino también de la velocidad a la cual el isótopo satura el pool apropiado de aminoácidos libres.

En este estudio se ha intentado visualizar cuáles pueden ser las consecuencias que la administración de un antihistamínico (ejemplo: el Fenegan o Prometazina) puede tener cuando un paciente recibe simultáneamente otros fármacos o está expuesto a otros compuestos de naturaleza tóxica.

Como se explicó en otra parte de esta introducción, se tomó el tiempo de hipnosis por pentobarbital como una medida de respuesta a un fármaco cuya duración es inversamente proporcional a la actividad de las enzimas que metabolizan sustancias extrañas de microsomas hepáticos.

En este estudio se verifica el efecto que tiene una sola

dosis del antihistamínico así como los que tiene la administración repetida.

Se intentan entender los efectos observados en términos de las interacciones que la prometazina tiene con el sistema de la oxidasa de función mixta tanto in vivo como in vitro.

También se intenta explicar las variaciones que se producen en términos más generales que involucran los papeles que desempeñan los procesos de síntesis y degradación de proteínas.

Finalmente, se intenta destacar la relevancia farmacológica y toxicológica de las observaciones efectuadas.

## PARTE EXPERIMENTAL

Compuestos usados

La 10-(3 dimetil isopropil) fenotiazina (prometazina) fue obtenida de Laboratorios Wyeth y era grado farmacéutico.

El clorohidrato de puromicina fue adquirido a Sigma Chemical Co.; la Actinomicina D fue adquirida a Laboratorios Merck.

La DL - Leucina ( 1 -  $^{14}\text{C}$  ) (actividad específica 21,9 mCi/mmol) y la L - ( $^{14}\text{C}$  guanidino) arginina (actividad específica 23,10 mCi/mmol) (  $\text{H}_2\text{N}\overset{*}{\text{C}}(\text{NH})\text{NHNH}(\text{CH}_2)_3 \text{CHNH}_2 \text{COOH}$  ) fueron compradas a New England Nuclear.

El pentobarbital sódico y el fenobarbital sódico fueron de grado farmacéutico. Todas las demás sustancias, enzimas y cofactores empleados fueron de la mejor calidad obtenible comercialmente.

Animales y su tratamiento

En todos los experimentos se usaron ratas albinas macho cepa Sprague Dawley (180-260 gramos). El alimento se les retiró entre las doce y catorce horas antes de ser sacrificadas, pero se les proveyó agua a voluntad.

La prometazina se les administró vía intraperitoneal, disuelta en ClNa 0,9 % en una dosis de 50 mg/kg. Las ratas control recibieron cantidades equivalentes de solución fisiológica.

En la determinación del tiempo de hipnosis producido por

el pentobarbital, éste se les administró en forma intraperitoneal disuelto en ClNa 0,9 %, en una dosis de 40 mg/kg, treinta minutos después de administrada la prometazina.

El fenobarbital fue administrado en una dosis diaria de 80 mg/kg, durante tres días o en una única dosis de 100 mg/kg como se indica en los respectivos experimentos.

La Actinomicina D fue administrada una vez al día en una dosis de 80  $\mu$ g/kg, siete a ocho horas antes que la prometazina o el fenobarbital.

La puromicina fue dada una vez al día en una dosis de 125 mg/kg, siete u ocho horas antes que la prometazina.

La DL - Leucina ( $1-^{14}\text{C}$ ) se le administró en solución fisiológica que contenía  $3,4 \times 10^7$  dpm/ml, en una dosis de  $17 \times 10^7$  dpm/kg (actividad específica: 21,9 mCi/mmol).

La L - ( $^{14}\text{C}$  guanidino) arginina se les administró disuelta en solución fisiológica que contenía  $17 \times 10^6$  dpm/ml, en una dosis de  $85 \times 10^6$  dpm/kg (actividad específica: 23,10 mCi/mmol).

Los animales fueron sacrificados por decapitación en una guillotina Harvard.

Se los dejó desangrar brevemente y posteriormente se extrajo con rapidez el hígado, el cual fue pesado y procesado.

En los casos en que se tomaron muestras de sangre los animales fueron sometidos a anestesia superficial con éter; la sangre fue extraída de la vena cava inferior con una jeringa heparinizada.



Todas las manipulaciones del hígado y las operaciones subsiguientes se llevaron a cabo entre 0° y 4° C.

#### Tiempo de hipnosis

Luego de inyectar al animal con el barbitúrico (pentobarbital), se toma como tiempo de hipnosis al lapso transcurrido desde que el animal pierde su reflejo de enderezamiento hasta que lo vuelve a recuperar.

#### Separación de los microsomas

La aislación de las fracciones microsomales para la determinación de etil morfina N-demetilasa, anilina hidroxilasa, NADPH citocromo C reductasa, citocromo P-450 y P-450 reductasa, fue realizada por el siguiente método: el hígado, una vez extraído del animal, fue homogeneizado en un volumen igual a cuatro veces su peso con una solución de CLK 1,15 % con un homogeneizador de Teflon-vidrio Potter Elvehjem. El homogenato se centrifugó a 9.000 x g durante veinte minutos. La fracción sobrenadante fue luego centrifugada durante una hora a 105.000 x g en una ultra centrífuga preparativa Spinco modelo L.

El pellet microsomal se resuspendió en 13 mililitros de una solución de CLK 0,15 M - 0,025 M Tris-ClH pH= 7,5.

En esta resuspensión se determinaron anilina hidroxilasa, etil morfina N-demetilasa, NADPH citocromo C reductasa, citocromo P-450 y P-450 reductasa por los métodos que se detallan más adelante.

Para la determinación de proteínas marcadas se utilizó la misma técnica para la separación de la fracción microsomal excepto que el hígado, una vez extraído del animal, fue homogeneizado en un volumen igual a dos veces su peso con una solución de sacarosa 0,3 M - EDTA 3 mM.

Los microsomas así separados fueron luego resuspendidos en 2 ml de la solución de sacarosa - EDTA.

#### Determinaciones enzimáticas y ensayos

##### Anilina hidroxilasa (AH):

Se determinó la actividad de la anilina hidroxilasa en microsomas hepáticos de acuerdo con el método descrito por Imai, Ito y Sato (58), que se basa en la medición del p-amino fenol formado por la p-hidroxilación de la anilina.

La composición final de la mezcla de incubación es la siguiente: buffer tris 100 mM pH= 7,4,  $Cl_2$  Mg 5 mM isocitrato de sodio 8 mM NADP 0,33 mM, isocítrico deshidrogenasa 0,36 unidades/ml, clorhidrato de anilina 10 mM.

La actividad se expresa en nanomoles de p-amino fenol formado en 15 minutos a 37° C por miligramo de proteína.

##### Etil morfina N-demetilasa (EM-asa):

Fue medida en microsomas hepáticos de acuerdo con el procedimiento descrito por Castro y Gillette (59), excepto que la concentración de etil morfina en la mezcla de incubación fue 10 mM.

La actividad está expresada en nanomoles de formaldehído producido en 15 minutos a 37° C por miligramo de proteína.

#### NADPH citocromo C reductasa

Se midió la actividad de la citocromo C reductasa en suspensiones microsomales de acuerdo con el método descrito por Phillips y Langdon (60).

Se basa en la medición de la velocidad de reducción del citocromo C, que en su forma reducida tiene un máximo pronunciado a 550 nm, el cual está ausente en el espectro de la forma oxidada.

La composición final de la mezcla de incubación fue: citocromo C 0,05 M, CNK 1 mM, 50  $\mu$ l de sistema generador de NADPH compuesto por : 0,2 ml de buffer tris 0,3 M pH= 7,4; 0,2 ml de  $Cl_2$  Mg 1 M, 124 mg de isocitrato de sodio, 20 mg de NADP y 0,6 ml de isocítrico deshidrogenasa en glicerol obteniéndose una concentración final de NADPH 0,9 mM.

La concentración de proteínas fue de alrededor de 8 mg/ml. La actividad se expresó en nmoles de citocromo C reducido/min/mg de proteína a 37° C.

#### Determinación de citocromo P-450 (P-450):

El contenido de P-450 se determinó en un espectrofotómetro Aminco Chance, según el método descrito por Schenkman y colaboradores (61), que se basa en la absorción a 450 nmetros del complejo formado por el citocromo P-450 reducido con el

monóxido de carbono.

La muestra de suspensión microsomal (obtenida como se detalló anteriormente) se divide en dos partes y a una de ellas se le burbujea CO durante un minuto. Se coloca la muestra en dos cubetas del espectrofotómetro, utilizando la que no fue burbujeada como blanco.

Se le agrega a ambas cubetas ditionito de sodio (reductor) y se mide la diferencia de absorbancia entre 450-490 nm.

El resultado se expresa como nmoles de P-450/mg de proteína, valiéndose del coeficiente de extinción de  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (62).

#### Determinación de P-450 reductasa (P-450 reductasa)

La velocidad de reducción del citocromo P-450 por el NADPH fue determinada en un espectrofotómetro Aminco Chance según el método descrito por Gigon y colaboradores (63).

Se utilizó una celda anaeróbica Aminco (AL 65085) para trabajar en atmósfera de CO. La suspensión de microsomas hepáticos de rata se obtuvo como se detalla en procesamiento de órganos.

Tres mililitros de dicha suspensión saturados con CO fueron reducidos con el sistema generador de NADPH de la misma composición que el utilizado para citocromo C reductasa.

La velocidad de reducción de citocromo P-450 se calculó a partir de la velocidad inicial de incremento en absorbancia

a 450 nm y se expresó en nmoles de P-450 reducido a 25° C por miligramo de proteína por minuto.

Determinación de los cambios espectrales producidos por interacción de la prometazina con el P-450 de microsomas hepáticos

Fueron determinados según el método descrito por Schenkman y colaboradores (61). Los microsomas hepáticos suspendidos en solución buffer tris 0,025 M - ClH - ClK 0,15 M pH = 7,5 se agregaron a ambas cubetas de un espectrofotómetro Aminco Chance y se registró la línea de base correspondiente a igual absorbancia de luz.

La línea de base se restó del cambio en absorbancia producida por la adición de prometazina a una de las cubetas y posteriormente se graficó el espectro diferencial.

Para obtener la constante espectral se registraron los espectros después de cada adición de prometazina y se graficó la concentración dividida la diferencia de absorbancia entre 430 y 490 nm en función de la concentración y se calculó la  $K_s$  (61) de acuerdo con el método de Lineweaver y Burk (20).

Incorporación de  $^{14}\text{C}$  en proteínas microsomales

Para medir la incorporación de  $^{14}\text{C}$  in vivo a proteínas microsomales se utilizó el método descrito por Díaz Gómez y colaboradores (64).

Se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión microsomal (obtenida como se detalló en separación de microsomas) y se le

agregó 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se centrifugó a 9.000 x g diez minutos a 0° C. Se resuspendió el precipitado con 5 ml de TCA al 5 % y se lo calentó treinta minutos a 80°-90° C en baño de agua. Se dejó enfriar y se centrifugó a 9.000 x g diez minutos a 0° C. Se lavó luego tres veces por resuspensión y posterior centrifugación con 5 ml de TCA al 5 %.

Posteriormente, se lavó de la misma forma con etanol: éter: cloroformo (2:2:1:), con acetona y finalmente con éter.

Luego de secado en estufa a 40° C, se tomaron 10 mg de proteína y se le agregó 1 ml de ácido fórmico, 5 ml de butilcellosolve 40 % en tolueno y 15 ml de 2,5 difenil oxazol (PPO) 8 g/l en tolueno butilcellosolve 3:1.

La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Beckman L S 133.

Al número de cuentas obtenidas en cada caso se le hizo la corrección que corresponde debido a la atenuación (quenching) mediante el método que usa el cociente de canales y también se le restó el valor correspondiente a la solución de PPO solo.

### Barbitúricos

Para el dosaje de barbitúrico, el método empleado es el descrito por Truhaut y colaboradores (65) que se fundamenta en la medición del espectro de absorción del mismo en el ultravioleta.

Se realiza una primera extracción del barbitúrico de plasma con éter en medio de buffer  $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K} - \text{PO}_4 \text{HK}_2$  (pH= 8) seguido por una solubilización en fase acuosa con un buffer de bicarbonato hidróxido de sodio (pH= 11). Se realiza luego una purificación por extracción con éter en medio clorhídrico y una redisolución en el buffer a pH= 11.

Se mide la absorbancia a 260 y 240 nm, restando la absorbancia obtenida a 260 de la obtenida a 240 nm. El resultado se expresa en  $\mu\text{g}$  de barbitúrico/ml de plasma.

#### Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en las suspensiones microsomales fueron determinadas de acuerdo con el método de Lowry y colaboradores (66).

#### Análisis estadístico

La significación de la diferencia entre dos valores promedio se determinó por el test de t (67).

Todo experimento en el cual estuviera involucrado la comparación entre cuatro valores medios, la significación fue determinada por análisis de variancia bimodal de acuerdo con el método de Brownlee (68).

## RESULTADOS

Efecto de la administración de prometazina sobre el tiempo de hipnosis producido por el pentobarbital

Se toma la duración del tiempo de hipnosis como un índice indirecto de la capacidad general del animal de metabolizar drogas por hidroxilación.

La administración de prometazina treinta minutos antes que el pentobarbital produce una prolongación significativa sobre el tiempo de hipnosis.

El efecto de prolongación fue aún observado cuando fueron dadas dos dosis de prometazina (una en cada día) y el pentobarbital fue administrado treinta minutos luego de la segunda.

El incremento en el tiempo de hipnosis fue menos marcado en este caso.

Se determinaron los niveles de pentobarbital en plasma. Para ello se procedió de la siguiente forma: se le administró la prometazina (tiempo cero), a los treinta minutos el pentobarbital, y a los sesenta minutos se le extrajo sangre, determinándose la concentración de barbitúricos de acuerdo con el método descrito en la parte experimental. No se encontró diferencia en las ratas tratadas con respecto a los controles ( controles  $16,2 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$ ; tratadas  $16,0 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$ ).

Si se da una inyección diaria de prometazina durante más de dos días, la respuesta al pentobarbital cambia radicalmen-



te. En efecto, a partir del segundo día de administración hasta el cuarto día se produjo un acortamiento significativo en la duración del tiempo de hipnosis (Tabla 1).

#### Interacción de la Prometazina in vitro con el citocromo P-450 y la citocromo P-450 reductasa de microsomas hepáticos

La interacción de la prometazina con una suspensión microsomal produce un cambio espectral tipo I, como se muestra en la figura 1.

La constante espectral obtenida fue  $K_{sp} : 2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$  y el cambio espectral máximo  $0,0157 \Delta$  absorbancia/mg (figura 2).

La etil morfina y el pentobarbital, los cuales son compuestos tipo I utilizados en concentración saturante (3 mM y 13 mM respectivamente), fueron capaces de prevenir la producción del cambio espectral producidos por la prometazina.

El proceso de reducción del P-450 en presencia de la prometazina es acelerado considerablemente.

La actividad de la P-450 reductasa en ausencia de prometazina fue de  $1,62 \pm 0,11$  nmoles de P-450 reducido/mg proteína/minuto. Cuando se le agregó prometazina a la mezcla de incubación, en una concentración final 0,5 mM, la actividad obtenida fue  $2,04 \pm 0,18$  nm de P-450 reducido/mg proteína/minuto. Ambos valores son el resultado de tres mediciones.

#### Efecto de la prometazina sobre la actividad de la etil morfina

TABLA 1

Efecto de la administración de prometazina sobre el tiempo de hipnosis producido por el pentobarbital

Duración del tratamiento <sup>a</sup>	Tiempo de hipnosis en minutos			% de control
	Control	Prometazina		
Días				
0	95 ± 10	170 ± 18	b	179
1	69 ± 6	98 ± 14	b	142
2	107 ± 33	47 ± 6	b	44
3	78 ± 32	47 ± 12	b	60
4	99 ± 22	51 ± 10	b	52

<sup>a</sup>

Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de prometazina diariamente en una dosis de 50 mg/kg.

Para determinar el tiempo de hipnosis por pentobarbital, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (40 mg/kg) a diferentes días del tratamiento con prometazina y treinta minutos después de la última dosis de prometazina.

Los controles recibieron solución fisiológica.

Fueron utilizados ocho animales por grupo.

<sup>b</sup>

P < 0,01

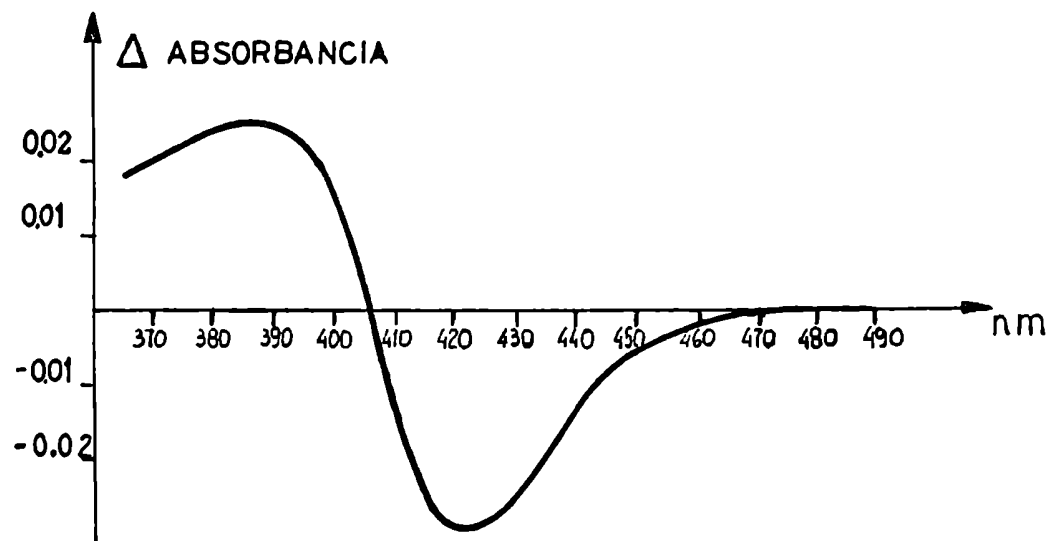


Figura 1: Interacción espectral de prometazina en microsomas hepáticos

Los microsomas hepáticos fueron puestos en el espectrofotómetro en dos cubetas de cuarzo (2,5 mg proteína/ml en buffer Tris 0,025 M - ClH - ClK 0,15 M pH = 7,5).

Después de establecer la línea de base se adicionó prometazina en una concentración 23,4  $\mu$ M a 117  $\mu$ M y se registró el espectro.

El espectro registrado corresponde a una concentración de prometazina 117  $\mu$ M.

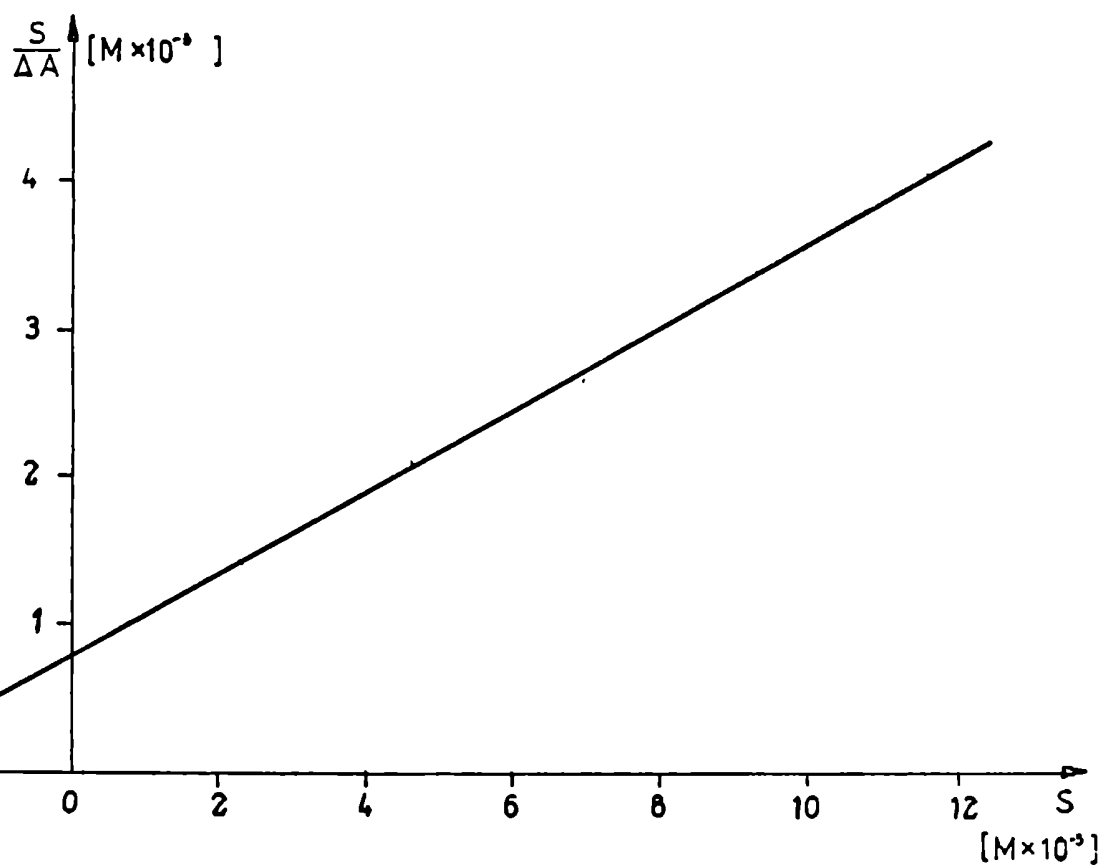


Figura 2 : Determinación de la constante espectral de prometazina

Para la determinación de la constante espectral ( $K_s$ ) se utilizaron las mismas condiciones experimentales que las detalladas para la figura 1.

### N-demetilasa in vitro

La adición de prometazina en una concentración de 0,5 mM a la mezcla de incubación que contiene microsomas, sistema generador de NADPH y etil morfina, inhibe considerablemente la actividad de la EM-asa.

Los resultados ilustrados en la figura 3 corresponden a la representación gráfica de la ecuación de Lineweaver y Burk (20).

El  $K_s$  y el  $K_i$  es 0,38 mM; la V máxima y la  $V_i$  máxima son 20 y 9,5 nmoles de formaldehído/mg proteína/15 minutos respectivamente.

### Efecto de la administración de prometazina sobre la actividad de etil morfina N-demetilasa, citocromo C reductasa y contenido de citocromo P-450 de microsomas hepáticos

Se administró una dosis de prometazina (50 mg/kg, intraperitoneal) y se determinó tres horas más tarde la actividad de la EM-asa, citocromo C reductasa y contenido de P-450, encontrándose que no existía una diferencia significativa entre el grupo control y los animales tratados (Tabla 2).

### Efecto de la administración repetida de prometazina sobre la actividad de la etil morfina N-demetilasa y la anilina hidroxilasa

La inyección diaria de prometazina (50 mg/kg, ip) durante

TABLA 2

Efecto de la administración de prometazina sobre la actividad de etil morfina N-demetilasa, citocromo C reductasa y contenido de citocromo P-450 de microsomas hepáticos

Tratamiento <sup>a</sup>	EM-asa nmoles formaldehído/mg prot/15 min $\pm$ DS	Citocromo C reductasa nmoles/mg prot/min $\pm$ DS	P-450 nmoles/mg prot. $\pm$ DS
Control	43 $\pm$ 4	153 $\pm$ 25	0,50 $\pm$ 0,01
Prometazina	46 $\pm$ 1	146 $\pm$ 18	0,51 $\pm$ 0,01

<sup>a</sup>

Los animales recibieron una inyección de prometazina (50 mg/kg, intraperitoneal) y fueron sacrificados tres horas más tarde. Los controles recibieron solución fisiológica. Todos los animales fueron ayunados catorce - dieciséis horas antes del sacrificio.

Fueron usados seis animales por grupo.

El efecto de la prometazina sobre todos los parámetros aquí descritos no fue significativamente distinto de los controles ( P > 0,05)

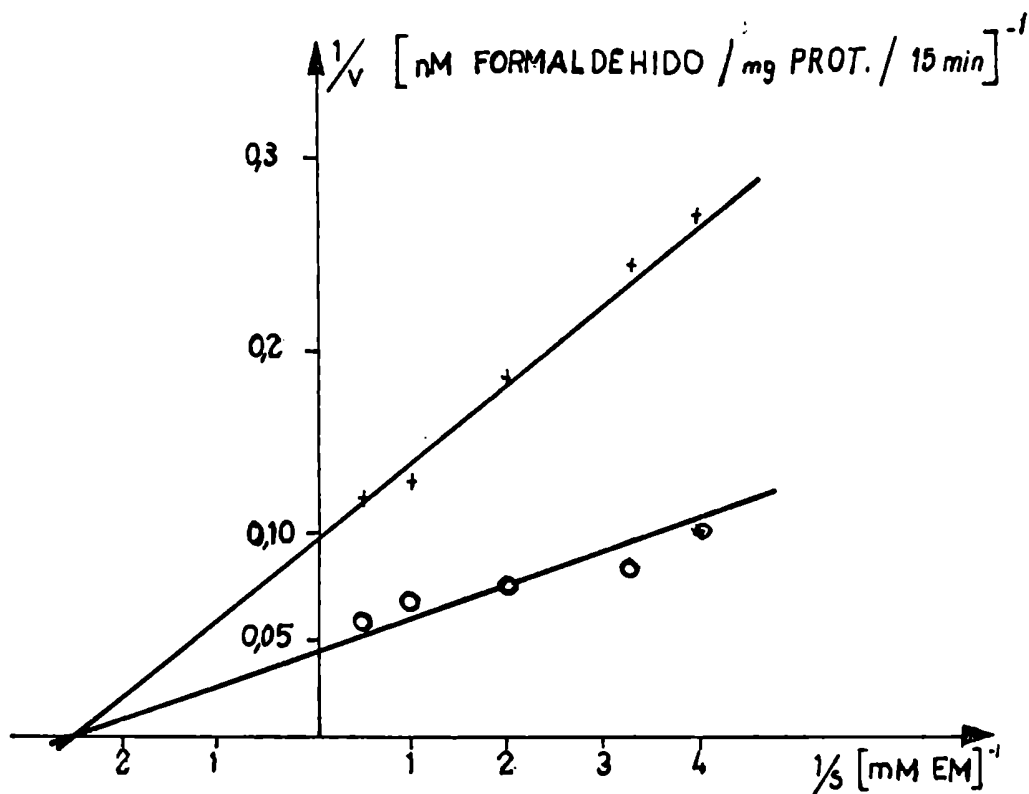


Figura 3: Inhibición no competitiva de la EM-asa por prometazina.

La suspensión microsomal ( 22 mg proteína/ml ) y la prometazina fueron incubadas simultáneamente en presencia de etil morfina ( concentración final entre 0,25 mM a 2 mM ) durante 15 minutos a 37° C.

cuatro días causa un pronunciado incremento en la actividad de la etil morfina N-demetilasa, que es una enzima microsomal. La etil morfina N-demetilasa interviene en el metabolismo de la etil morfina, un sustrato tipo I, produciendo la hidroxilación de la misma.

La actividad en el grupo tratado se incrementó al doble que en el grupo control.

La actividad de la anilina hidroxilasa, la enzima microsomal que metaboliza la anilina (que es un sustrato tipo II) produciendo una para-hidroxilación, permanece sin cambio.

En contraste, por administración del conocido inductor de estas enzimas, el fenobarbital, se incrementó significativamente la actividad de la anilina hidroxilasa y la etil morfina N-demetilasa (Tabla 3).

Efecto de la administración repetida de prometazina sobre el contenido de P-450 microsomal y sobre la actividad de la P-450 reductasa y citocromo C reductasa

La administración diaria de prometazina durante cuatro días produce un incremento en el contenido de citocromo P-450 de microsomas hepáticos; también incrementa la actividad de la P-450 reductasa y de la citocromo C reductasa.

La relación de citocromo P-450 a P-450 reductasa es 2,9 en los animales controles, mientras que en el grupo tratado con prometazina dicha relación es 4,1 (Tabla 4).



TABLA 3

Efecto de la administración repetida de prometazina sobre la actividad de la etil morfina N-demetilasa (EM-asa) y anilina hidroxilasa (AH) de microsomas hepáticos

Tratamiento	<sup>a</sup> EM-asa nmoles de formaldehído/mg protefna/15 minut.	% de Control	AH nmoles de p-amino fe-nol/mg prot./15 minutos	% de Control
Control	34 ± 11	100	4,21 ± 0,78	100
Prometazina	63 ± 11 <sup>b</sup>	187	4,63 ± 1,62	109
Fenobarbital	71 ± 14 <sup>b</sup>	209	7,30 ± 1,95 <sup>b</sup>	173

<sup>a</sup> Los animales recibieron una inyección ip diariamente de prometazina (50 mg/kg) por cuatro días y fueron sacrificados en la mañana del quinto día de iniciación del tratamiento. El fenobarbital sódico (80 mg/kg, ip) fue dado una vez al día durante tres días y los animales fueron sacrificados la mañana del cuarto día.

Continuación leyenda Tabla 3

Todos los animales fueron ayunados catorce-dieciséis horas antes del sacrificio. Los controles recibieron solución fisiológica y fueron tratados similarmente.

Fueron empleados ocho animales por grupo en el experimento con prometazina, mientras que en el experimento con fenobarbital fueron empleados cuatro animales por grupo.

b

$P < 0,01$

TABLA 4

Efecto de la administración repetida de prometazina sobre el contenido de citocromo P-450, las actividades de la P-450 reductasa y la citocromo C reductasa de microsomas hepáticos

	Control	Prometazina <sup>a</sup>	% de control
Contenido de P-450 (nmoles/mg prot. ± DS)	0,58 ± 0,12	1,07 ± 0,12 <sup>b</sup>	184
P-450 reductasa (nmoles/mg prot./ min ± DS)	1,69 ± 0,34	4,38 ± 1,13 <sup>b</sup>	259
Citocromo C reductasa (nmoles mg prot./min ± DS)	204,3 ± 26,1	286,1 ± 23,6 <sup>b</sup>	140

<sup>a</sup>

La administración de prometazina fue la misma que la descrita en la Tabla 3.

Fueron usados ocho animales por grupo.

<sup>b</sup>

P < 0,01

El incremento en el contenido de citocromo P-450 y en la actividad de la etil morfina N-demetilasa se evidenció ya al día siguiente de la primera dosis, y fue incrementándose luego con la administración repetida (Tabla 5).

El aumento en la actividad de la NADPH citocromo C reductasa fue evidente luego de la segunda dosis de prometazina, haciéndose luego más notoria con la administración de las sucesivas dosis (Tabla 6).

#### Efecto de la administración repetida de prometazina sobre el peso del hígado y el contenido de proteína microsomal

La administración de una dosis diaria de prometazina durante cuatro días no produce un aumento del peso del hígado por 100 gramos de peso, pero causa un incremento significativo en la proteína microsomal por gramo de hígado (Tabla 7).

#### Efecto de la Actinomicina D y la Puromicina en ratas tratadas con prometazina

El efecto de estos dos bien conocidos inhibidores de síntesis de proteínas fue probado en ratas tratadas con prometazina.

Ambos inhibidores fueron capaces de bloquear el aumento de contenido de citocromo P-450 producido por la administración repetida de prometazina, pero no sobre la actividad de la etil morfina N-demetilasa (Tablas 8 y 9).

TABLA 5

Efecto de diferentes número de dosis de prometazina sobre el contenido de citocromo P-450 (P-450) y la actividad de la etil morfina N-demetilasa de microsomas hepáticos <sup>a</sup>

Dosis	P-450 nmol/mg protefina		EM-asa nmoles formaldehido/ mg protefina/15 minutos		% de Control
	Control	Prometazina	Control	Prometazina	
1	0,45 ± 0,10	0,65 ± 0,10 <sup>b</sup>	28,2 ± 8,4	38,6 ± 7,4 <sup>b</sup>	136
2	0,54 ± 0,08	0,74 ± 0,18 <sup>b</sup>	15,2 ± 4,5	23,1 ± 5,0 <sup>b</sup>	152
3	0,49 ± 0,09	0,76 ± 0,07 <sup>b</sup>	25,4 ± 7,0	48,9 ± 9,1 <sup>b</sup>	192
4	0,58 ± 0,12	1,07 ± 0,12 <sup>b</sup>	34,0 ± 11,0	63,0 ± 11,0 <sup>b</sup>	187

<sup>a</sup> Todos los animales recibieron una dosis diaria de prometazina (50 mg/kg) y fueron sacrificados a la mañana del día siguiente a la última dosis. Todos los animales fueron ayunados catorce - dieciséis horas antes del sacrificio. Los controles

Continuación leyenda Tabla 5

recibieron solución fisiológica y fueron tratados similarmente.

Fueron empleados seis animales por grupo.

b

$P < 0,05$

TABLA 6

Efecto de diferentes número de dosis de prometazina sobre la actividad de la citocromo C reductasa microsomal <sup>a</sup>

Dosis	Citocromo C reductasa nmoles/mg proteína/min.		% Control
	Control	Prometazina	
1	92,2 ± 19,0	97,9 ± 30,0	106
2	165,0 ± 19,4	187,7 ± 13,7 <sup>b</sup>	113
3	149,4 ± 32,9	193,0 ± 34,3 <sup>b</sup>	129
4	204,3 ± 26,1	286,1 ± 23,6 <sup>b</sup>	140

<sup>a</sup>

El tratamiento con prometazina es como se indica en la Tabla 5.

Fueron usados seis animales por grupo.

<sup>b</sup>

$P < 0,05$

TABLA 7

Efecto de la administración repetida de prometazina sobre el peso de hígado y contenido de proteína microsomal

Tratamiento <sup>a</sup>	Peso de hígado / 100 g de peso $\pm$ DS	Contenido de proteína microsomal mg/g de hígado $\pm$ DS
Control	3,40 $\pm$ 0,27	28,91 $\pm$ 1,91
Prometazina	3,61 $\pm$ 0,20	31,65 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>

El tratamiento con prometazina es como se indica en Tabla 3.  
Fueron usados diez animales por grupo.

<sup>b</sup>

P < 0,01



TABLA 8

Efecto de la puromicina sobre el aumento del contenido de P-450 y la actividad de la etil morfina N-demetilasa microsomales producido por pretratamiento con prometazina

Tratamiento <sup>a</sup>	P-450 nmol/mg proteína	EM-asa nmoles de formaldehído/ mg proteína/ 15 minutos
Control	0,60 ± 0,11	33,2 ± 6,8
Prometazina	0,85 ± 0,09 <sup>b</sup>	51,8 ± 8,6 <sup>b</sup>
Puromicina	0,37 ± 0,04 <sup>b</sup>	11,6 ± 4,2 <sup>b</sup>
Puromic.+ Promet.	0,38 ± 0,07 <sup>b,c</sup>	17,0 ± 4,8 <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>

Los animales recibieron una inyección diaria ip de prometazina (50 mg/kg) y puromicina (125 mg/kg) durante cuatro días. La puromicina fue dada siempre siete - ocho horas después de la prometazina.

Los animales fueron sacrificados la mañana del quinto día y sus hígados fueron procesados como se describe en Métodos.

<sup>b</sup>

P < 0,05 comparado con el control.

<sup>c</sup>

El valor de P para el efecto de la puromicina sobre el incremento producido por la prometazina en el contenido de

Continuación leyenda Tabla 8

P-450 obtenido por análisis de variancia fue  $< 0,05$  y para EM-asa  $> 0,05$ .

El incremento de la actividad de la EM-asa producido por la prometazina en controles fue 156 y los tratados con puromicina fue 146.

La dosis administrada de Actinomicina D no tuvo efecto sobre la acción de prometazina sobre la citocromo C reductasa, en cambio bloquea efectivamente el efecto inductor del fenobarbital sobre el citocromo P-450 (Tablas 10 y 11).

Efecto de la administración repetida de la prometazina sobre la incorporación de  $^{14}\text{C}$  Leucina en proteínas microsomales

La administración repetida de prometazina no evidenció un incremento en la incorporación de  $^{14}\text{C}$  Leucina en proteínas microsomales en ratas tratadas con prometazina (con una dosis diaria) de uno a cuatro días (Tabla 12).

Efecto de la administración de prometazina sobre la degradación de proteínas microsomales

Administrando una sola dosis de prometazina a animales tratados previamente con ( $^{14}\text{C}$  guanidino) arginina se encontró que había una diferencia significativa en la desaparición de la radioactividad de las proteínas microsomales, encontrándose una mayor marcación en las ratas tratadas con prometazina con respecto a las ratas utilizadas como controles (Tabla 13).

TABLA 9

Efecto de la administración de Actinomicina D sobre el aumento del contenido de P-450 y etil morfina N-demetilasa microsomas por pretratamiento con prometazina

Tratamiento	P-450 nmol/mg proteína	EM-asa nmoles de formaldehido/ mg proteína/ 15 minutos
Control	0,46 $\pm$ 0,04	17,7 $\pm$ 3,0
Prometazina	0,74 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	35,7 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup>
Actinomicina D	0,32 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	11,1 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
Actin.D+Promet.	0,39 $\pm$ 0,04 <sup>b,c</sup>	19,3 $\pm$ 3,2 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>

Los animales recibieron una inyección ip diaria de prometazina de 50 mg/kg y Actinomicina D (80  $\mu$ g/kg) durante cuatro días.

La Actinomicina D fue dada siempre siete - ocho horas después de la prometazina. Los animales fueron sacrificados la mañana del quinto día y los hígados fueron procesados como se describe en Métodos.

<sup>b</sup>

P < 0,05 comparados contra el control.

<sup>c</sup>

El valor de P sobre el efecto total de la Actinomicina D so-

Continuación leyenda Tabla 9

bre el incremento producido en el P-450 la actividad de la EM-asa obtenido por análisis de variancia fue  $< 0,05$  y  $> 0,05$  respectivamente. El % de incremento en la actividad de la EM-asa provocada por la prometazina con respecto al control fue 201 y en los tratados con Actinomicina D fue 173 %.

TABLA 10

Efecto de la administración de Actinomicina D sobre el aumento de contenido del P-450 microsomal producido por pretratamiento con fenobarbital

Tratamiento <sup>a</sup>	P-450 nmol/mg proteína
Control	0,45 ± 0,08
Fenobarbital	0,82 ± 0,17 <sup>b</sup>
Actinomicina D	0,31 ± 0,08 <sup>c</sup>
Actinomicina D + Fenobarbital	0,47 ± 0,08 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>

El fenobarbital fue administrado en una sola inyección ip en una dosis de 100 mg/kg y los animales fueron sacrificados cuatro días después. La Actinomicina D fue dada en forma ip durante cuatro días en una dosis de 80 mg/kg.

<sup>b</sup>

P < 0,01 comparado con los controles

<sup>c</sup>

P < 0,05 comparado con los controles

<sup>d</sup>

El valor de P para el efecto global de la Actinomicina D sobre el aumento del contenido de P-450 inducido por el fenobarbital obtenido por análisis de variancia fue < 0,05

TABLA 11

Efecto de la administración de Actinomicina D sobre el aumento de actividad de la citocromo C reductasa producido por pretratamiento con prometazina

Tratamiento	Actividad de la citocromo C reductasa nmoles/mg proteína/min $\pm$ DS
Control	164 $\pm$ 28
Prometazina	222 $\pm$ 14 <sup>b</sup>
Actinomicina D	113 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
Act. D + Prometazina	151 $\pm$ 18 <sup>c</sup>

a Administración de prometazina y Actinomicina D como en tabla 9.

b  $P < 0,05$  comparado con control

c El valor de P para el efecto global de la Actinomicina D sobre el incremento producido por la prometazina en la actividad de la citocromo C reductasa obtenido por análisis de la variancia fue  $> 0,05$

TABLA 12

Efecto de la administración repetida de prometazina en la incorporación de Leucina en proteínas microsomales

Tratamiento <sup>a</sup>	<sup>14</sup> C Leucina incorporada en proteínas microsomales dpm/mg prot. <sup>±</sup> DS	
	Días	Control
1	2847,2 <sup>±</sup> 304,6	2807,0 <sup>±</sup> 219,2 <sup>c</sup>
2	3276,3 <sup>±</sup> 273,7	3193,8 <sup>±</sup> 459,7 <sup>c</sup>
3	3453,0 <sup>±</sup> 248,2	3435,8 <sup>±</sup> 250,2 <sup>c</sup>
4	3032,5 <sup>±</sup> 226,8	3052,0 <sup>±</sup> 136,6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>

La prometazina fue administrada en dosis diaria como se indica en la Tabla 1.

<sup>b</sup>

<sup>14</sup>C Leucina ( $33 \times 10^7$  dpm/kg) fue administrada veinticuatro horas después de la última dosis de prometazina o solución fisiológica.

Los animales fueron sacrificados doce horas después de la administración de <sup>14</sup>C Leucina y sus hígados fueron procesados para la aislación de proteínas microsomales y contados como se indica en Métodos.

Fueron empleados seis animales por grupo.

<sup>c</sup>

P > 0,05



TABLA 13

Efecto de la administración de prometazina sobre la degradación de proteínas microsomales

Tratamiento <sup>a</sup>	( <sup>14</sup> C guanidino) arginina incorporada en proteína microsomal ( dpm/mg proteína $\pm$ DS)	% Control
Control	86,6 $\pm$ 7,1	
Prometazina	128,6 $\pm$ 13,0 <sup>b</sup>	148

<sup>a</sup>

Los animales fueron ayunados 12-14 horas antes de ser sacrificados. Los hígados fueron procesados para la aislación de proteínas microsomales como se indica en Métodos.

La <sup>14</sup>C guanidino arginina fue dada 48 horas antes del sacrificio ( ocho de la mañana del primer día en una dosis de 85 x 10<sup>6</sup> dpm/kg, ip).

La prometazina fue administrada a las ocho de la noche del segundo día, doce horas antes que los animales fueran sacrificados ( ocho de la mañana del tercer día).

Fueron usados seis animales por grupo.

<sup>b</sup>

P < 0,05

## DISCUSION

La administración previa de prometazina tiene un efecto bifásico sobre el tiempo de hipnosis por pentobarbital que depende de la frecuencia de su administración.

En efecto, cuando el animal recibe una sola o dos dosis de prometazina, la acción de una posterior inyección de pentobarbital es mucho más larga. En cambio, si se administran tres o más dosis (una por día) el efecto es el opuesto, es decir, se acorta significativamente el efecto del pentobarbital. Si se considera que tal cual se anticipara en la Introducción, el tiempo de hipnosis producido por un barbitúrico como el pentobarbital suele reflejar variaciones en el proceso del metabolismo del mismo en microsomas de hígado (no siempre como veremos más adelante), los resultados arriba señalados sugieren que la prometazina podría producir un efecto bifásico sobre las oxidasas de función mixta de microsomas de hígado tal cual lo hacen otros compuestos (69), inhibiendo a tiempos cortos o única dosis e intensificando su acción a tiempos largos o dosis repetidas. Es por ello que para el análisis de su acción se dividirá este análisis en dos partes. Una que tienda a interpretar los efectos después de una sola dosis que resultan en la prolongación del efecto del pentobarbital. La otra, la que ocurre cuando el animal recibe varias dosis (ejemplo : cuatro) y que

resulta en un acortamiento significativo de la duración del efecto del pentobarbital.

Cuando el animal recibe una sola dosis de prometazina no se producen cambios en el contenido de ninguno de los componentes del sistema de la oxigenasa de función mixta de microsomas hepáticos tres horas después de haberla administrado. En efecto, el contenido de P-450, citocromo C reductasa y etil morfina N-demetilasa no varían tres horas después de una única dosis de prometazina, aunque sí lo hace 24 horas después. Este experimento excluye posibles efectos sobre el metabolismo de drogas tipo barbiturato medidos por daño a componentes del sistema microsomal, por ejemplo el P-450 del tipo descrito en literatura para sustancias como el tetracloruro de carbono, el secobarbital, la dimetilnitrosamina, la tioacetamida, el N hidroxiacetilaminofluoreno y otros compuestos (70-73).

De haber ocurrido esos efectos también hubiese podido explicar la prolongación del efecto del pentobarbital después de una sola dosis de prometazina. El que no ocurra ese tipo de interacciones destructivas irreversibles, obliga entonces a analizar otro tipo de posibilidades.

La primera pregunta a responder es si la prometazina es capaz de inhibir a las enzimas que metabolizan de modo inespecífico sustancias extrañas al organismo, tales como el pentobarbital o la etil morfina (es el mismo sistema enzimático, solo

que por razones de facilidad y precisión de técnicas se usa medir metabolismo de etilmorfina por demetilación, EM-asa).

Nuestros resultados indican que en efecto, la prometazina inhibe no competitivamente a la EM-asa. Ello lo hace, no obstante, a concentraciones más altas que las que ocurren in vivo en microsomas después de dosis como la inyectada. En efecto, resultados previos del laboratorio de Slater (74) detectaron concentraciones del orden de  $1,6 \mu\text{molar}$  que son más bajas que las aquí empleadas.

También se detectaron interacciones con el citocromo P-450 tal cual lo revelan los cambios espectrales tipo I que produce la prometazina al actuar sobre sus funciones microsomales.

Según estudios de otros autores la producción de cambios espectrales tipo I evidencia interacción con la porción apo proteína del P-450 (61). Esta interacción es competitiva con la que produce el pentobarbital o la etilmorfina que también causan cambio espectral tipo I. Para explicar cómo esta interacción competitiva con la etilmorfina podría explicar una inhibición no competitiva de la EM-asa puede ser importante tener en cuenta que la EM-asa mide el proceso global de metabolismo en el cual la formación del complejo con el P-450 no es el paso limitante sino el proceso de reducción del P-450.(21)

La prometazina ejerce sobre éste último un efecto de sentido opuesto y ello complica la interpretación. También pueden

tener que ver en el efecto de la prometazina sobre la EM-asa las acciones que se sabe tiene ese compuesto sobre membranas (75-77), las cuales a su vez son soporte de la EM-asa. A pesar de que todas estas interacciones aquí descritas podrían explicar los efectos de una sola dosis de prometazina sobre el efecto del pentobarbital in vivo, ellas parecen no tener gran importancia. En efecto, si la prolongación de la acción del pentobarbital se debiera a que la prometazina inhibe su metabolismo en el hígado, entonces los niveles en sangre de pentobarbital en animales pretratados con prometazina debieran ser más altos que en los no tratados y ello no sucede. Esto sugiere que el efecto potenciador de la prometazina sobre la hipnosis por pentobarbital se ejerce al nivel del sistema nervioso central o sea el receptor de la acción de los barbitúricos. En este sentido es importante destacar la conocida acción depresora que tienen tanto el pentobarbital como los antihistamínicos, entre ellos, la prometazina (6).

Los efectos inhibidores directos antes apuntados pueden tener importancia en estudios in vitro o in vivo si la dosis recibida por alguna razón es muy alta (accidental, suicida, etc).

El efecto de acortamiento de la acción hipnótica del pentobarbital que ocurre cuando el animal ha sido pretratado con dosis diarias repetidas de prometazina, sugiere que está aumentada la capacidad del sistema microsomal hepático que metaboliza en esta condición experimental

Así parece también indicarlo el haber encontrado que el metabolismo de otro sustrato que como el pentobarbital es tipo I, caso de la etilmorfina, está aumentado considerablemente después de tratar repetidamente con prometazina. Este aumento de la EM-asa parece deberse a que en esas condiciones experimentales está significativamente incrementado el contenido de P-450 y la actividad de la P-450 reductasa ya sea medida como tal o usando citocromo C como sustrato. Ambos, el P-450 y la reductasa son componentes esenciales del sistema transportador de electrones microsomales que metaboliza el pentobarbital, la etilmorfina y un sinnúmero de otros compuestos (78-80).

El hecho de que el tratamiento repetido con prometazina aumenta el contenido de proteína microsomal (aunque no el peso del hígado por 100 gramos de peso corporal), hace que la capacidad global hepática para metabolizar sustancias extrañas esté considerablemente aumentada.

El aporte del proceso de síntesis de proteínas es necesario para el aumento de contenido de P-450 microsomal que se observa después de la administración repetida de prometazina. Ello queda claramente evidenciado por el hecho que tanto la actinomicina D como la puromicina bloquean el efecto de la prometazina.

La actinomicina D inhibe la síntesis de proteína por bloquear la síntesis de m-RNA que requiere DNA y lo hace porque

se une con gran afinidad al DNA (35).

La puromicina, en cambio, actúa sobre el proceso de traslación e inhibe la síntesis de proteína porque del mismo modo que un AA-tRNA, puede servir de aceptor de la cadena peptídica naciente que está unida al ribosoma como peptidil-t<sub>RNA</sub> (34).

Ni la actinomicina D ni la puromicina son capaces de bloquear en cambio el aumento de actividad de la citocromo C reductasa que produce la administración repetida de prometazina. Ello parece sugerir que, en contraste con lo observado para el caso del aumento del P-450 microsomal, en este caso la síntesis de proteína no desempeña ningún papel.

Una posibilidad de explicar este efecto de la prometazina podría derivar del conocido efecto que tiene este compuesto sobre las membranas biológicas y que es de tipo detergente (75-77).

Se sabe que otros compuestos que son capaces de interactuar con membranas ya sea como detergentes o como solventes son capaces de activar a la citocromo C reductasa microsomal (60).

Otra posible interpretación del fenómeno de aumento de actividad de la citocromo C reductasa por administración repetida de prometazina, podría ser que ya sea la prometazina o alguno de sus metabolitos facilitara el flujo de electrones del NADPH al citocromo C mediado por la enzima. De algún modo esta posibilidad ha sido observada en nuestros experimentos sobre los efectos de la prometazina sobre el proceso de reducción

del P-450 por la P-450 reductasa ( que es idéntica con la citocromo C reductasa).

El hecho de que el incremento de contenido de P-450 microsomal que produce la administración repetida de prometazina requiera el aporte del proceso de síntesis de proteína no significa necesariamente que este proceso esté acelerado por efecto de la droga.

Ello, en efecto, no es así, tal cual lo evidencian los estudios sobre incorporación de leucina marcada en proteínas microsomales hepáticas de animales pretratados con prometazina. En esos estudios no se observó diferencia entre la incorporación obtenida en animales controles o tratados. El aumento de contenido de P-450 microsomal se produce porque mientras el proceso de síntesis de proteína hace su aporte habitual el proceso de degradación de proteínas está desacelerado por acción de la administración repetida de la prometazina. Ello queda claramente evidenciado en los experimentos en los cuales las proteínas microsomales hepáticas fueron premarcadas con  $^{14}\text{C}$  guanidino-arginina. La estabilidad de la marca fue significativamente mayor en los animales tratados con prometazina que en los controles.

Resumiendo, la síntesis de proteína es necesaria aunque no está acelerada porque provee la cantidad habitual de P-450 y éste se acumula porque es degradado a menor velocidad que a la



que suele hacerlo. En lo que respecta al mecanismo por el cual la prometazina inhibe los procesos de degradación proteica, podrían ser de interés los efectos descritos por varios autores que tiene la prometazina sobre la membrana lisosomal con la consiguiente estabilización de la misma (76). Ello es particularmente relevante por cuanto se cree que los lisosomas desempeñan un papel de importancia en los procesos degradativos celulares (81-84).

Otra posibilidad existente es que la prometazina inhiba algunas proteasas de importancia en los procesos degradativos celulares. Esta posibilidad no debe considerarse muy remota, dado que en estudios anteriores de nuestro laboratorio se observó que la prometazina así como otros antihistamínicos inhibía competitiva y reversiblemente la colinesterasa (85,86).

Esta enzima comparte su respuesta a varios inhibidores competitivos con otras esterases y otras proteasas (87,88) algunas de las cuales podrían estar involucradas en procesos degradativos.

En lo que respecta a cual es la importancia de los presentes estudios desde el punto de vista toxicológico-farmacológico conviene tener en cuenta en este punto varios antecedentes.

Uno es que: cualquier producto que modifique la absorción, distribución, excreción, metabolismo, la interacción de un fármaco o tóxico con su receptor y/o con receptores inespecíficos

también modificará la intensidad y/o la duración y a veces también la naturaleza de su respuesta toxicológica o farmacológica (89,90).

Otro es, que frecuentemente el factor más importante que regula la respuesta farmacológica-toxicológica de un compuesto es el proceso de metabolismo del fármaco o tóxico en el hígado a través del sistema de la oxidasa de función mixta de microsomas (89,90).

Con estos antecedentes en mente se puede decir que estos presentes estudios sugieren fuertemente que la administración de prometazina con exposición simultánea a otros fármacos o tóxicos puede tener consecuencias indeseables o peligrosas y aún letales.

Analizando primero el caso de la dosis única de prometazina puede verse que por un lado tuvo efectos depresores propios que sumados a los del barbitúrico podrían llegar a provocar la muerte de un individuo expuesto a ambos compuestos. Este efecto, aunque no vinculado a transformaciones metabólicas del tóxico es sin duda el más importante como riesgo después de dosis únicas.

Otro, menos importante o probable, es que por ingestión de dosis elevadas accidentales (error o accidente por ponerla al alcance de los niños) bloquee el metabolismo desintoxicante de otro compuesto ( fármaco o tóxico) a que el individuo se viera expuesto. Las consecuencias pueden variar desde algunos incon-

venientes hasta la muerte.

Más inesperadas e imprevisibles podrían ser las consecuencias de la exposición de un individuo a tóxicos o fármacos, que en vez de destruirse por metabolismo hepático se activan, si éste estuvo sometido a tratamiento previo repetido con el antihistamínico prometazina.

Es importante destacar que ésta no es una posibilidad remota o utópica. Muchos individuos reciben en determinadas circunstancias dosis repetidas de antihistamínicos ( resfríos, alergias, etc) y a su vez también pueden recibir otros fármacos o, más impredecible aún, estar expuestos a tóxicos en sus tareas (obreros de industria, rociadores de insecticidas, etc).

A su vez la cantidad de compuestos que se activan por metabolismo hepático cubre una amplia gama, contándose entre ellos solventes como el tetracloruro de carbono, intermediarios químicos como el bromobenceno, insecticidas como varios clorados y fosforados, fármacos como el acetaminofeno, la furosemida, la isoniazida e iproniazida , etc (91,92).

El hecho de que la administración repetida de prometazina conduzca a un aumento significativo de la capacidad metabólica de la oxidasa de función mixta microsomal hepática, como aquí se demostró hace que esté también aumentada la capacidad de activar a dichos tóxicos a los metabolitos responsables de sus efectos y por lo tanto aumentar su toxicidad.

Otra consecuencia de la administración repetida de prometazina no tan peligrosa como la anterior, pero de todos modos indeseable es que podría acortar o disminuir la intensidad de efectos farmacológicos útiles de compuestos que se destruyen por metabolismo hepático. Este caso sería mucho más común que el apuntado anteriormente por ser la mayor parte de los fármacos destruidos por metabolismo (78) y se visualiza fácilmente con los ejemplos de barbitúricos y con anticoagulantes.

Si un paciente necesitara recibir anestesia por barbitúricos (por ejemplo: pentotal) y hubiese recibido previamente tratamiento repetitivo intenso con prometazina, sucedería que las dosis habituales no le harían efecto y ello desorientaría al médico o le causaría dificultades por ejemplo, durante una operación.

Otro caso es el de los anticoagulantes tipo dicumarol.

Muchos pacientes reciben este tipo de compuesto para prolongar el tiempo de coagulación sanguínea. Si el individuo estuvo expuesto a tratamiento repetitivo con prometazina el médico podría encontrarse con el hecho de que el paciente no le respondiera al tratamiento, por ser el anticoagulante rápidamente destruido en el hígado.

Este tipo de problemas es conocido para el caso de pacientes que recibieron anticoagulantes y previamente habían estado en tratamiento con hipnóticos (93,94).

En resumen: se estima que tanto la administración en dosis única como repetitiva del antihistamínico prometazina junto con otros compuestos o junto con exposición a tóxicos, puede conducir a problemas que oscilan entre indeseables a graves.

Ellos derivarían de las aquí demostradas interacciones de la prometazina con el sistema de la oxidasa de función mixta de microsomas hepáticos, así como de otros efectos directos.

Por lo tanto, se considera de importancia asegurar de que toda exposición combinada de prometazina con otros fármacos o tóxicos es no riesgosa antes de que ocurra.

## RESUMEN

Se estudió el efecto de la administración única o repetida de prometazina (Fenergan) sobre los componentes del sistema enzimático de microsomas hepáticos que metabolizan tóxicos y fármacos; el citocromo P-450 y la citocromo C reductasa (P-450 reductasa). También se observaron los efectos que la administración única o repetida de prometazina tiene sobre la acción hipnótica del pentobarbital y se trató de entender las interacciones observadas en términos de los efectos que la prometazina ejerce sobre el metabolismo desintoxicante del pentobarbital mediado por las enzimas antes mencionadas.

Se encontró que una única dosis de prometazina prolonga significativamente el tiempo de hipnosis por pentobarbital y no cambia el contenido de P-450 o la actividad de la citocromo C reductasa. El efecto prolongador observado parece deberse a una acción aditiva de efectos depresores sobre el sistema nervioso central de la prometazina y el pentobarbital. Si la dosis de prometazina fuese alta también podrían actuar efectos inhibidores detectados en este estudio de este compuesto sobre las enzimas que metabolizan fármacos y tóxicos de microsomas hepáticos.

Si el animal recibe más de dos dosis (una diaria) de prometazina, entonces el efecto hipnótico del pentobarbital se acorta y ello parece claramente deberse a que en esas condiciones aumenta el contenido de citocromo P-450, citocromo C reductasa

y la actividad global del sistema para desintoxicar al organismo de pentobarbital (medida a través de la actividad de la etilmorfina N-demetilasa).


El aumento de contenido de P-450 microsomal se logra por el aporte del proceso de síntesis de proteína aunque éste no está acelerado tal cual lo demuestran los estudios de incorporación de  $^{14}\text{C}$  - leucina en animales tratados y controles.

Los estudios de efectos de la prometazina sobre el proceso de degradación proteica medidos con  $^{14}\text{C}$  guanidino - arginina sugieren que en el aumento de contenido de citocromo P-450 microsomal el bloqueo de los procesos degradativos por la prometazina desempeña un papel importante. El aumento de actividad de la citocromo C reductasa por efecto de la administración de prometazina no depende de los procesos de síntesis o degradación proteica y podría deberse ya sea a una acción tipo detergente de la prometazina sobre la enzima o alternativamente a que ésta funcionaría como acelerador del transporte de electrones entre el NADPH y el citocromo C.

Los resultados obtenidos revisten potencial importancia en toxicología y farmacología, puesto que la exposición simultánea de un individuo a tóxicos o fármacos y a prometazina podría generar interacciones que van desde la consecuencia leve hasta una de tipo grave. Ello se debe a que al interactuar la prometazina sobre las enzimas de microsomas hepáticos que desintoxican algunos compuestos y potencian a otros, ella estaría

modulando los efectos de los mismos. El uso frecuente de este antihistamínico en terapéutica hace más probable que ocurran este tipo de interacciones y por lo tanto estos resultados sugieren que se tenga particular cautela cuando se la emplea combinada con otros compuestos o cuando el individuo está expuesto a otros agentes tóxicos.

  
Lic. Graciela Fernández

  
Dr. José A. Castro



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dale, H.H. y Laidlaw, P.P., *J. Physiol Lond.* 41, 318, (1910).
- 2.- Bovet, D. y Staub, A.M., *C.R. Soc. Biol. París*, 124, 547, (1937) .
- 3.- Halpern, B.N., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 68, 339, (1942).
- 4.- Wilson, A. y Schild, J.; *Applied Pharmacology*, novena edición, J. y A. Churchill Ltd. Londres, pág. 94 (1961).
- 5.- Halpern, B.N. y Ducrot, R., *C.R. Soc. Biol. París*, 140, 361, (1946).
- 6.- Goodman, L.S. y Gilman, A., *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, Mc Millan Co., New York, pág. 635, (1970).
- 7.- Gillette, J.R., *Prog. Drug. Res.*, 6, 11, (1963).
- 8.- Anders, M.W., *Ann. Rev. Pharmacol.*, 11, 37, (1971).
- 9.- Conney, A.H. y Burns, J.J. *Adv. Pharmacol.*, 1, 31, (1961).
- 10.- Fouts, J.R., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 104, 875, (1963).
- 11.- Mannering, G.J., *Metabolism*, 20, 228, (1971).
- 12.- Sollman, T., *A Manual of Pharmacology and its Applications to Therapeutics and Toxicology*, W.B. Saunders, Filadelfia pág. 557, (1964).
- 13.- Mitchell, J.R. y Jollows, D.J., *Gastroenterology*, 68, 392 (1975).
- 14.- Albretch, R., *Therapie*, 27, 751, (1972).
- 15.- Cooper, D.Y., Levin, S. , Narasimhulu, S., Rosenthal, O., Estabrook, R.W., *Science*, 147, 400, (1965).

- 16.- Gillette, J.R., Brodie, B.B. y La Du, B.N., J. Pharmacol Exp. Therap., 119, 532, (1958).
- 17.- Mannering, G.J., Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition ( B.N. La Du, H.G. Mandel, E. Leong Way eds) The Williams and Wilkins, Co., Baltimore, pág. 206 (1971).
- 18.- Imai, Y. y Sato, R., J. Biochem. 62, 239 (1967).
- 19.- Lu, A.Y.H. y Coon, M.J., J. Biol. Chem., 243, 1331 , (1968).
- 20.- Lineweaver, H. y Burk, D., J. Amer. Chem. Soc. 56, 658, (1934).
- 21.- Castro, J.A., Greene, F., Gigon, P., Sasame, H. y Gillette, J.R., Biochem. Pharmacol, 19, 2461, (1970).
- 22.- Gram, T.E., Rogers, L.A. y Fouts, J.R., J. Pharmacol. Exp. Ther., 155, 493, (1967).
- 23.- Miller, E.C., Miller, J.A. y Enomoto, M., Cancer Res. 24, 2018, (1964).
- 24.- Kato, R. y Gillette, J.R., J. Pharmac. Exp. Therap., 150 279, (1965).
- 25.- Gigon, P., Gram, T.E. y Gillette, J.R., Molec. Pharmacol. 5 , 109, (1969).
- 26.- Gillette, J.R., Annals of the N.Y. Academy Sciences, 179, 43, (1971).
- 27.- Imai, Y. y Sato, R. , Biochem Biophys. Res. Comun., 23, 5, (1966).

- 28.- Lu, A.Y.H., Levin, W., Ryan, D., West, S.B., Thomas, P., Kawalek, J., Kuntzman, R., y Conney, A.H., en *Anticonvulsant Drugs and Enzyme Induction*. Associated Scientific Publishers, pág. 169, (1976).
- 29.- Arcos, J.S. Conney, A.H. y Buu Hoi, N.P., *J. Biol Chem*, 236, 1291, (1961).
- 30.- Gelboin, H. V. y Blackburn, N., *Biochem Biophys. Acta* 72, 657, (1963).
- 31.- Kato, R., Jondorf, W.R., Loeb, L.A., Ben T., Gelboin, H. B., *Mol. Pharmacol*, 2, 171, (1966).
- 32.- Villa - Trevino, S., Shull, K.H., Farber, E., *J. Biol. Chem.* , 238, 1757, (1963).
- 33.- Gelboin, H.V. en *Fundamentals of Drug Metabolism and Disposition* ( Bert. N. La Du, H.G. Mandel, E. Leong Way eds) The Williams and Wilkins Co. Baltimore, pág. 292, (1971).
- 34.- Yarmolinsky, M.B. y de la Haba, G.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45, 1721, (1959).
- 35.- Reich, E., Franklin, R.M., Shaktin, A.J. y Tatum, E.L., *Science* 134, 556 (1961).
- 36.- Conney, A.H., Miller, E.C. y Miller, J.A., *J. Biol. Chem.*, 228, 753, (1957).
- 37.- Cramer, J.W., Miller, J.A. y Miller, E.C., *J. Biol. Chem.* 235, 250, (1960).
- 38.- Orrenius, S. y Ericsson, J.L.E., *J. Cell. Biol.* 28, 181, (1966).

- 39.- Jervell, K.F., Christoffersen, T. y Morland, J., Arch. Biochem. 111, 15 (1965).
- 40.- Jick, H. y Shuster, L., J. Biol. Chem, 241, 5366, (1966).
- 41.- Hirsch, C.A. y Hiatt, H.H., J. Biol. Chem, 241, 5936, (1966).
- 42.- Mortimore, G.E. y Mondon, C.E., J. Biol. Chem., 245, 2375, (1970).
- 43.- Rabinowitz, M. y Fisher, M.J., Biochem. Biophys. Acta 91, 313, (1964).
- 44.- Dice, J. F., Dehlinger, P.J., Schinke, R.T., J. Biol. Chem 246, 2574, (1972).
- 46.- Goldberg, A.L. y St. John, A.C., Ann. Rev. Biochem, 45, 748, (1976).
- 47.- Goldberg, A.L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2640, (1972).
- 48.- Bennet, J.C., Methods Enzymol. 11, 211, (1967).
- 49.- Ripley, J.A., Methods Enzymol., 11, 905, (1967).
- 50.- Recheigl, M., Jr., Enzymologia, 34, 23, (1968).
- 51.- Goldberg, A., Howell, E.M., Li, J.B., Martel S., Prouty, W., Fed. Proc., 33, 1112, (1974).
- 52.- Goldberg, A., Dice, J.F., Ann. Rev. Biochem., 43, 835, (1974).
- 53.- Goldberg, A.L., J. Biol. Chem., 244, 3223, (1969).
- 54.- Willets, N.S., Biochem J., 103, 462, (1967)

- 55.- Brostrom, C.O., Jeffay, H., Biol. Chem., 245, 4001, (1970).
- 56.- Gan, J.C., Jeffay, H., Biochem. Biophys Acta 148, 448, (1967).
- 57.- Schinke, R.T., Mammalian Protein Metabolism, vol 4, pag. 32 (H.N. Munro Ed.) Academic Press (1970).
- 58.- Imai, J., Ito, A., y Sato, R., J. Biochem. (Tokyo), 60, 417, (1966).
- 59.- Castro, J.A. y Gillette, J.R., Biochem. Biophys. Res. Comun 28, 426, (1967).
- 60.- Phillips, A.H. y Langdon R., J. Biol. Chem. 237, 2652, (1962).
- 61.- Schenkman, J., Remmer, H. y Estabrook, R., Mol Pharmacol 3, 113, (1967).
- 62.- Omura, T. y Sato, R., J. Biol. Chem. 239, 2370 (1964).
- 63.- Gigon, P., Gram, T. y Gillette, J.R., Mol Pharmacol 5, 109, (1969).
- 64.- Díaz Gómez, M.I., Castro, J.A., Ferreyra, E.C. de, D'Acosta N. y Castro C.R. de, Toxicology Appl. Pharmacol., 25, 524, (1973).
- 65.- Truhaut, R., Boiteau H. y Puisieux, F., Arch.Mal. Prof. 25, 315, (1964).
- 66.- Lowry, O., Rosebrough, N. Farr, A. y Randall R., J. Biol. Chem 193, 265, (1951).
- 67.- Bancroft, H., Introducción a la Bioestadística, Eudeba,

- Buenos Aires, pág. 205, (1960).
- 68.- Brownlee, K.A., *Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering*, Wiley, New York, pág. 378, (1960).
- 69.- Kato, R., Chiesara, E. y Vassanelli, P., *Biochem Pharmacol* 13, 69, (1964).
- 70.- Castro, J.A., Sasame, H., Sussmann, H. y Gillette, J.R., *Life Sci.* 7, 129, (1968).
- 71.- Sasame, H., Castro, J.A. y Gillette, J.R., *Biochem Pharmacol* 17, 1759, (1968).
- 72.- Barker, E. y Smuckler, E.A. , *Mol Pharmacol* 8, 318, (1972).
- 73.- Thorgeirsson, S., Sasame, H., Potter, W., Nelson, W., Jollow, D. y Mitchell, J.R., *Fed. Proc.* 32, 305, (1973).
- 74.- Slater, T.F., *Biochem. J.*, 106, 155, (1968).
- 75.- Bangham, A.D., Rees, K.R. y Shotlander, *Nature* 193, 754, (1962).
- 76.- Judak, J.D. en "Enzymes and Drug Action (J.L. Mongar y A V S de Renck eds) J y A Churchill Ltd., Londres, pág. 359, (1962).
- 77.- Jain, M. y Wu, N., *Biochem Biophys Res. Comun.*, 81, 1412, (1978).
- 78.- Gillette, J.R., *Advances in Pharmacol* 4, 219, (1966).
- 79.- Siler Masters, B.S., Nelson, E.B., Schacter, B.A., Baron Y. y Isaacson, E., *Drug Met. Disp.* 1, 121 , (1973).

- 80.- Coon, M.J., White, R.E., Nordblon, G.D., Ballou, D.P. y Guengerich, F.P., *Croatica Chemica Acta*, 49, 163, (1977).
- 81.- Rubro, V. y Grisolia, S., *F E B S Letters* 75, 281, (1977).
- 82.- Ray, D., Cornelli, E., y Schneider D., *Biochem Biophys Res. Commun* 71, 1246, (1976).
- 83.- Neely, A.N. y Mortimore, G.E., *Biochem Biophys. Res. Commun* 59, 680, (1974).
- 84.- Dean, R.T., *Nature* 257, 414, (1975).
- 85.- Díaz Gómez, M.I. y Castro, J.A. *Biochem Pharmacol* 20, 929, (1971).
- 86.- Fernández, G., Díaz Gómez, M.I. y Castro, J.A. *Toxicol Appl. Pharmacol*, 31, 179, (1975).
- 87.- Heath, D.F., *Organophosphorus Poisons*, Pergamon Press, pág. 177, (1961).
- 88.- Eto, M., *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*, C R C Press, Cleveland, Ohio (1974).
- 89.- Goldstein, A., Aronow, L. y Kalman, S.M., *Principles of Drug Action* (Harper y Rows eds) New York, pág. 218, (1968).
- 90.- De Bruin, A., *Biochemical Toxicology of Environmental Agents*. Elsevier (1976).
- 91.- Gillette, J.R., Mitchell, J.R. y Brodie, B.B. *Ann. Rev. Pharmacol*, 14, 271, (1974).

- 92.- Mitchell, J.R., Nelson, S., Thorgeirosen, S., Mc Murtry, R.J. y Dybing, E., Progress in Liver Deseages 5, 259, (1976).
- 93.- Cucinell, S.A., Conney, A.H., Sansur, M. y Burns, Y., Clin, Pharmacol Therap 6, 420, (1965).
- 94.- Ikeda, M., Conney, A.H. y Burns, Y.Y., J. Pharmacol Exptl. Ther., 162, 338, (1968).