

UCH-FC
MA6-B
L645

METABOLISMO DE XENOBIOTICOS EN RATA WISTAR Y *OCTODON DEGUS*;
METABOLISMO DE MORFINA

Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con Mención en
Bioquímica

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

MARIA EUGENIA LETELIER MUÑOZ

Directores de tesis: Dr. Emilio Sánchez Q.
Dra. Eugenia del Villar M.

OCTUBRE, 1982

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la Candidata

MARIA EUGENIA LETELIER MUÑOZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Bioquímica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido en el día 27 de Julio de 1982.

Profesor Patrocinante de Tesis:

Dr. Emilio Sánchez

.....

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Sergio Iturri



Dr. Antonio Morello



Dr. Hermann Niemeyer F.



A Luis Fernando, por su constante
motivación,
A mis hijos.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los Profesores Emilio Sánchez Q. y Eugenia del Villar M. y financiada por el Proyecto B-184-804 del Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional de la Universidad de Chile.

Quisiera expresar mi reconocimiento y gratitud,
A los Dres. Emilio Sánchez Q y Eugenia del Villar M.,
por su permanente estímulo, paciencia y guía.

Al Dr. Antonio Morello y Sra. Yolanda Repetto por su
inapreciable guía y enseñanzas y, por el gran apoyo y ayuda
que me han brindado.

A la Sra. Titina Cerda, por su generosa e inagotable
paciencia durante la transcripción mecanográfica de este traba
bajo.

Al Sr. José Mondaca, por la confección de los dibujos
de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

	pág.
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCION	1
Procesos de biotransformación y sus efectos sobre la acción de fármacos	1
Reacciones de Fase I	1
Reacciones de Fase II	3
- Glucuronilaciones	4
- Conjugaciones con glutati6n	5
Diferencias de especie	7
Prop6sitos de este trabajo	10
Resultados principales	11
II. MATERIALES Y METODOS	12
Reactivos utilizados	12
Animales de experimentaci6n	13
Efectos farmacol6gicos producidos por pentobarbital	13

	pág.
Estudios realizados <i>in vivo</i> con	
morfina	14
- Obtención de las muestras de tejidos	14
- Determinación de morfina en sangre	15
- Determinación de la radiactividad	
total en cerebro	15
- Determinación de morfina y sus meta-	
bolitos polares en hígado y riñón	16
Fraccionamiento subcelular del hígado	17
Determinación de proteínas	18
Determinación de citocromo P-450 en	
microsomas hepáticos	18
Actividades enzimáticas de conjugación	19
- Conjugación de morfina con UDPGA	19
- Conjugación de p-nitrofenol con UDPGA	21
- Conjugación de 1-cloro-2,4-dinitroben	
ceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno con	
GSH	22
Actividades oxidativas catalizadas por	
el sistema microsomal del citocromo P-450	24
- N-desmetilación de morfina	24
- N-desmetilación de aminopirina	26
- Hidroxilación de naftaleno	28
- Hidroxilación de anilina	29

	pág.
- O-desmetilación de p-nitroanisol	31
Cálculos estadísticos	32
 III. RESULTADOS	
Efectos farmacológicos del pentobarbital en rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	34
Niveles sanguíneos de morfina en rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	36
Niveles de morfina en cerebro	36
Metabolismo <i>in vivo</i> de morfina	39
Contenido de proteínas hepáticas	40
Actividades enzimáticas de conjugación	44
Conjugación de morfina y p-nitrofenol con UDPGA	44
Conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno con GSH	48
Reacciones catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P-450	52
- N-desmetilación de morfina y aminopirina ..	52
- Hidroxilación de anilina	55
- Hidroxilación de naftaleno y O-desmetilación de p-nitroanisol	55

	pág.
IV. DISCUSION	62
Efectos farmacológicos producidos por pentobarbital	63
Metabolismo de morfina	63
Actividades enzimáticas de conjuga ción	66
-Conjugación de p-nitrofenol con UDPGA	66
-Conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno con GSH	67
Reacciones catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P-450	68
V. BIBLIOGRAFIA	71

LISTA DE TABLAS

		pág.
TABLA I	Efectos farmacológicos producidos por pentobarbital en rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	35
TABLA II	Niveles sanguíneos de morfina en rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	37
TABLA III	Niveles de morfina total en cerebro de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	38
TABLA IV	Niveles de morfina no metabolizada en hígado y riñón de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	41
TABLA V	Niveles de metabolitos polares de morfina en hígado y riñón de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	42
TABLA VI	Razones entre las concentraciones de morfina no metabolizada y las de sus metabolitos polares encontradas en hígado y riñón de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	43
TABLA VII	Contenido de proteínas hepáticas de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	45

TABLA VIII	Hidroxilación de anilina en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	56
TABLA IX	Hidroxilación de naftaleno en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	57
TABLA X	O-desmetilación de p-nitro-anisol en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	58
TABLA	Resumen	60

LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de morfina con UDPGA en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	46
FIGURA 2. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de p-nitrofenol con UDPGA en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	47
FIGURA 3. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno con GSH en fracción citosólica hepática de rata Wistar	49
FIGURA 4. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobeceno con GSH en fracción citosólica hepática de <i>Octodon degus</i>	50
FIGURA 5. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de 1,2-dicloro-4-nitroben <u>en</u> ceno con GSH en fracción citosólica hepática de rata Wistar y <i>O. degus</i>	51

	pág.
FIGURA 6. Gráficos de dobles recíprocos de la N-desmetilación de morfina en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	53
FIGURA 7. Gráficos de dobles recíprocos de la N-desmetilación de aminopirina en microsomas hepáticos de rata Wistar y <i>Octodon degus</i>	54

ABREVIATURAS

NADP	=	Nicotinamida adenindinucleótido-fosfato
NADPH	=	Nicotinamida adenindinucleótido-fosfato reducido
ATP	=	Adenosin-trifosfato
ADP	=	Adenosin-difosfato
UDPGA	=	Acido uridindifosfoglucurónico
UDPGT	=	Uridindifosfoglucuroniltransferasa
UDP	=	Uridindifosfato
GSH	=	Glutación reducido
GST	=	Glutación-S-transferasa
PNP	=	p-nitrofenol
TRIS	=	Tris(hidroximetil)aminometano
TCA	=	Acido tricloroacético
G-6-P	=	Glucosa-6-fosfato
pAP	=	p-Aminofenol

RESUMEN

En este trabajo se hace una comparación entre la rata Wistar y el *Octodon degus*, comunmente llamado degu, de los efectos farmacológicos del pentobarbital y del metabolismo de la morfina y varios xenobióticos.

La administración intraperitoneal de una dosis de pentobarbital (40 mg/Kg de peso corporal) produce un tiempo de sueño más corto y menor depresión respiratoria en el degu que en la rata.

La velocidad de transformación de la morfina *in vivo* parece ser mayor en el degu que en la rata. Esto se refleja en los menores niveles sanguíneos y hepáticos de morfina no metabolizada y en los mayores niveles renales de metabolitos polares de morfina del degu.

Las velocidades de todas las reacciones enzimáticas estudiadas expresadas en nmoles de producto formado/min/g de hígado fresco y en nmoles de producto formado/min/100 g de peso animal, fueron mayores en el degu que en la rata. Sin embargo, las velocidades de glucuronilación de morfina y p-nitrofenol expresadas en nmoles de producto formado/min/mg de proteína microsómica, fueron iguales en ambos roedores. Tampoco se observaron diferencias significativas en las velocidades de N-desmetilación de morfina y aminopirina e hidroxilación de

anilina de ambos roedores, cuando ellas se expresaron en nmoles de producto formado/min/nmol de citocromo P-450. Las velocidades de conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno con GSH, hidroxilación de naftaleno y O-desmetilación de p-nitroanisol fueron mayores en el degu que en la rata, cualquiera fuera la forma de expresión de ellas.

Aunque las actividades específicas de las UDP-glucuroniltransferasas estudiadas expresadas por mg de proteína microsómica y las de algunos citocromos P-450 expresadas por nmol de citocromo P-450 parecen ser similares, la capacidad para metabolizar drogas por hígado y por animal sería mayor en el degu. Esto se puede explicar por los mayores contenidos de proteína microsómica, citocromo P-450 y proteína citosólica por gramo de hígado fresco existente en el degu en relación con la rata.

Las Km aparentes para la glucuronilación de morfina y p-nitrofenol y para la N-desmetilación de morfina y aminopirina fueron iguales en ambos roedores. Las Km aparentes para la conjugación con GSH de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno fueron 0,37 mM y 0,48 mM en el degu y 0,15 mM y 1,7 mM en la rata, respectivamente.

Los valores de las Km aparentes parecen indicar que las especificidades en cuanto a las afinidades por el sustrato de las UDP-glucuroniltransferasas para morfina y p-nitrofenol y de los citocromos P-450 para morfina y aminopirina,

son similares en ambos roedores. En cambio las especificidades de la glutation-S-transferasas para 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno posiblemente sean diferentes.

Las mediciones efectuadas en este trabajo corresponden a promedios de las actividades de las distintas enzimas que constituyen las UDP-glucuroniltransferasas y glutation-S-transferasas, así como los citocromos P-450. Podría ocurrir que existieran diferencias en la proporción relativa de estas enzimas en ambos roedores, que no fueron investigadas.

En general, podemos decir que el degu posee una mayor capacidad metabolizante de drogas que la rata, cuya explicacion puede residir en el mayor contenido de las enzimas responsables. Así, podría explicarse la mayor tolerancia a morfina y al pentobarbital del degu y posiblemente a otros fármacos que no han sido investigados.

ABSTRACT

In this work, comparative studies between Wistar rat and the Chilean Caviomorph *Octodon degus*, which common name is degu, are presented on the pharmacological effects of pentobarbital and on the metabolism of morphine and various xenobiotics.

An intraperitoneal dose of pentobarbital (40 mg/Kg body weight) produced a shorter sleeping time and smaller respiratory depression on the degu when compared to that observed with the rat. These results suggest that pentobarbital biotransformation is greater in the degu.

In *in vivo*, the metabolism of morphine was also greater in the degu than in the rat. This is shown by lower levels of unchanged morphine in blood and in hepatic tissues and also by higher amounts of polar metabolites in the kidney of the degu.

The velocities of all the reactions studied expressed as nmoles of product formed/min/g of fresh liver and as nmoles of product formed/min/100 g of animal weight, were higher in the degu than in the rat. However, the velocities of morphine and p-nitrophenol glucuronidation expressed as nmoles of product formed/min/mg of microsomal protein were similar in both rodents. No significant differences were observed in the velocities of morphine and aminopyrine N-demethylation

and aniline hydroxylation in both rodents when these were expressed as nmoles of product formed/min/nmol of P-450 cytochrome. If any of the expressions used, the conjugation velocities of 1-Cl-2,4-dinitrobenzene with GSH, the naphthalene hydroxylation and p-nitroanisole O-demethylation were higher in the degu than in the rat.

In spite of the fact that UDP-glucuronyltransferases specific activities expressed per mg of microsomal protein and some of the P-450 cytochrome expressed per nmol of P-450 cytochrome are similar, the ability to metabolize drugs per liver and per whole animal could be higher in the degu. This can be explained because the microsomal protein, the P-450 cytochrome and the cytosolic protein per gram of fresh liver are higher in the degu than in the rat.

The apparent K_m of morphine and aminopyrine N-demethylation were similar in both rodents. The apparent K_m of 1-Cl-2,4-dinitrobenzene and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene conjugation with GSH were 0.37 mM and 0.18 mM in the degu and 0.15 mM and 1.7 mM in the rat, respectively.

The apparent K_m values seem to indicate that the specificities related to the substrate affinities of morphine and p-nitrophenol UDP-glucuronyltransferases and the P-450 cytochromes for morphine and aminopyrine are similar in both rodents. However, the glutathione-S-transferases specificities for 1-Cl-2,4-dinitrobenzene and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene

might be different.

The measurements done in this work correspond to the mean of the different enzyme activities of UDP-glucuronyl-transferases, glutathione-S-transferases and P-450 cytochromes. Might occur the existence of differences in the relative ratio of these enzymes in both rodents that were not investigated.

In general, we can say that the degu has a higher drugs metabolizing ability than the rat. The explanation may reside in a higher content of the responsible enzymes. This may explain the higher tolerance to morphine and pentobarbital in the degu and possibly to other drugs that have not been studied at this moment.

I. INTRODUCCION

PROCESOS DE BIOTRANSFORMACION Y SUS EFECTOS SOBRE LA ACCION DE FARMACOS. Los procesos de biotransformación son la causa principal por la cual los xenobióticos, entre ellos los fármacos, pierden sus efectos farmacológicos o tóxicos en el organismo (1). Muchos de los xenobióticos son lipofílicos y al ser metabolizados se transforman en compuestos hidrosolubles, fácilmente excretables (2). Los fármacos pueden ser metabolizados a través de diversas reacciones enzimáticas, pero no todas ellas conducen a un metabolito terminal, es decir, excretable como tal y farmacológicamente inactivo. De aquí que desde el punto de vista de la Farmacología, el metabolismo de los fármacos se ha dividido en dos fases sucesivas que se describen a continuación.

REACCIONES DE FASE I. Estas reacciones involucran hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, desalquilaciones y modificaciones similares de la molécula administrada. Los metabolitos provenientes de estas vías metabólicas deben, generalmente, sufrir posteriores transformaciones para ser eliminados del organismo (3, 4).

Los tipos de reacciones de mayor importancia farmacológica y toxicológica de fase I, son los catalizados por el

sistema oxidativo del citocromo P-450. Dado que los sustratos de estas reacciones se caracterizan por su gran lipofilicidad, si no fueran hidroxilados se acumularían en los tejidos o, como es el caso del hexobarbital y el pentobarbital, ejercerían su efecto farmacológico por tiempos prolongados (5). Se ha demostrado, además, que algunos diol-epóxidos productos de las reacciones de hidroxilación no se eliminan de la célula y son los mayores agentes mutagénicos y cancerogénicos (6, 7, 8), que se encuentran unidos covalentemente a los ácidos nucleicos y proteínas celulares (9, 10).

Por otra parte, una gran variedad de fármacos que actúan a nivel de sistema nervioso central, como son los opioides, anfetaminas y benzodiazepinas, sufren N-desalquilación como vía mayoritaria en su biotransformación (11). El descubrimiento de receptores de este tipo de fármacos y los estudios de unión entre ellos (12, 13, 14), han permitido establecer la influencia directa que tienen los grupos N-alquilos en sus respuestas biológicas (15, 16).

En estas reacciones el citocromo P-450 cataliza la transferencia de un átomo de oxígeno, desde el oxígeno molecular a una molécula orgánica. El otro átomo de oxígeno es reducido a agua. Los electrones involucrados en la reducción se obtienen del NADPH, reacción que es catalizada por la enzima NADPH-citocromo P-450-reductasa (17, 18).

El sistema oxidativo del citocromo P-450 ha sido identificado en la mayoría de los tejidos de todas las especies de mamíferos (19). Su localización subcelular preferente es el retículo endoplásmico (18, 19, 20). Se ha encontrado además en las mitocondrias y en la membrana nuclear (21, 22).

Este sistema metaboliza un amplio espectro de compuestos que incluyen fármacos, pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y algunos sustratos endógenos como los esteroides (23, 24, 25). Muchos de estos compuestos aumentan la actividad específica de oxidación para distintos sustratos en forma diferencial (21, 22, 23). En la actualidad, se han purificado a homogeneidad varios citocromos P-450 y los componentes del sistema: la NADP-citocromo P-450-reductasa o citocromo P-450-reductasa y los fosfolípidos, entre los que se han identificado la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (17, 18, 26, 27, 28). Todos los citocromos P-450 purificados catalizan más de una reacción, pero poseen mayor actividad para uno de los sustratos.

REACCIONES DE FASE II. Las reacciones mayoritariamente involucradas en esta fase son las conjugaciones. Los metabolitos formados en estas reacciones son inactivos y polares, por lo que son fácilmente excretados por la orina (29).

Las reacciones de conjugación comprenden: glucuronilaciones, conjugaciones con glutatión, glicosilaciones, sulfataciones, acetilaciones, conjugaciones con aminoácidos y

metilaciones, siendo las dos primeras las vías más comunes en los procesos de destoxificación (29). En estas reacciones, moléculas endógenas polares se conjugan con los productos de las reacciones de la fase I o con el compuesto original, si posee un grupo conjugable (30).

a. *Glucuronilaciones.* Estas reacciones son catalizadas por la enzima UDP-glucuroniltransferasa (E.C. 2.4.1.17), que transfiere una molécula de ácido glucurónico desde el UDPGA a un compuesto orgánico llamado en general aglicona, dando como producto un glucurónido.

La UDP-glucuroniltransferasa se ha localizado en todo el reino animal y en la mayoría de los tejidos (31). A nivel subcelular, más del 90% de la actividad glucuroniltransferásica está asociada con el retículo endoplásmico (31, 32). Ultimamente, también se ha encontrado en la membrana nuclear (33). Esta enzima es inducible por barbituratos y compuestos carcinogénicos como el 3-metilcolantreno y el benzo [a] pireno. Estos compuestos aumentan la actividad específica de glucuronilación para distintos sustratos en forma diferencial (34, 35). Estos resultados y otros obtenidos con inhibidores, indujeron a diversos grupos de investigadores a postular la existencia de distintas UDP-glucuroniltransferasas e iniciar los estudios de purificación de estas enzimas (36, 37, 38). En la actualidad, se han purificado a homogeneidad varias UDP-glucuroniltransferasas (38, 39, 40) y, al igual

que los citocromos P-450 purificados, todas ellas catalizan más de una reacción con mayor actividad para uno de los sustratos.

Los sustratos de la UDP-glucuroniltransferasa incluyen alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, aminas, iminas y tioles. Se han establecido 4 categorías de glucurónidos: O-, N-, S- y C-glucurónidos (30, 32). Todos los glucurónidos formados biosintéticamente son glicósidos de β -D-glucopiranósidouronatos. La unión del residuo glucurónico produce pérdida total de la actividad farmacológica y aumenta la polaridad de la aglicona. El grupo carboxilo presente en el residuo glucurónico y que existe en la forma no protonada al pH de la mayoría de los líquidos fisiológicos, permite la formación de sales, lo cual facilita la excreción de esos meta-bolitos en la orina y/o la bilis (29).

b. *Conjugaciones con Glutation.* Estas reacciones son catalizadas por un grupo de enzimas llamadas glutation-S-transferasas (E.C. 2.5.1.18) y forman como producto S-conjugados de glutation.

Los S-conjugados pueden ser excretados como tal por la bilis o, posteriormente, metabolizados a ácidos mercaptúricos (41) y eliminados por la bilis o la orina.

Las glutation-transferasas se encuentran distribuidas tanto en el reino animal como vegetal (42, 43). En los mamíferos se han localizado en la mayoría de los tejidos

(44) y a nivel subcelular, en el retículo endoplásmico, citosol, matriz mitocondrial y núcleo (42, 45).

Las glutatión-transferasas representan el grupo de proteínas más versátiles que participan en el proceso de inactivación y detoxificación de drogas. Todas las funciones detoxificantes de estas proteínas, son el resultado de la capacidad que poseen de unirse a un número elevado de compuestos hidrofóbicos (42). Diferentes grupos de investigadores han demostrado que las glutatión-transferasas pueden unirse covalentemente a compuestos electrofílicos tóxicos, como carcinógenos del tipo colorantes azo, hidrocarburos aromáticos e intermediarios de las reacciones de hidroxilación, sin participación del GSH. Esta unión inactiva la enzima y al sustrato y representa un mecanismo de detoxificación adicional de la célula (46, 47, 48, 49). Las glutatión-transferasas pueden cumplir además, una función de transporte, uniéndose reversiblemente diversos sustratos tóxicos con el objeto de conducirlos a los sitios donde ellos pueden ser metabolizados y excretados. Así, por ejemplo, la bilirrubina que es un compuesto muy poco soluble en los líquidos fisiológicos, es transportada en la circulación por la albúmina; sin embargo, en el hepatocito, la célula donde se conjuga con UDPGA, la albúmina no puede transportarla y la bilirrubina precipitaría si la glutatión-transferasa no fuera capaz de unirla (50).

DIFERENCIAS DE ESPECIE. El estudio de las diferencias de especie observadas en relación con los efectos que los fármacos producen en el organismo, requiere la consideración de varios procesos tales como la absorción, la distribución y la excreción. Todos ellos ocurren al mismo tiempo, pueden variar independientemente o simultáneamente y ser la causa de las diferencias de susceptibilidad o fármacos entre especies observadas. Los orígenes de estas variaciones generalmente radican en diferencias en el metabolismo de los fármacos. Las causas pueden ser incapacidad de algunas especies de llevar a cabo parcial o totalmente ciertas reacciones metabólicas individuales (53), y variaciones en la extensión relativa de dos o más reacciones, que compiten entre sí por un mismo compuesto (54). Se comprende que cualquier variación en el metabolismo de un fármaco, afecta la permanencia de él en el organismo, y, por lo tanto, la duración e intensidad de su actividad biológica.

Al respecto, estudios de algunas acciones de la morfina sobre el sistema nervioso central en diferentes mamíferos han demostrado que el *Octodon degus*, un caviomorfo chileno comunmente llamado degu, presenta tolerancia natural a este fármaco (55). Así por ejemplo, la administración intraperitoneal de morfina en dosis de 80 mg/Kg no produce cambios conductuales en el degu, mientras que en la rata produce la típica depresión y catatonía. A la misma dosis, la morfina

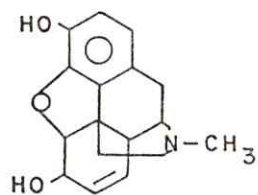
no produce analgesia en el degu y en la rata produce el efecto máximo (permanencia de 45 segundos sobre el plato caliente). Por otra parte, una dosis de 20 mg/Kg de morfina provoca en la rata un alto aumento de voltaje con actividad aguda en el electrocortigiograma, mientras una dosis de 60 mg/Kg no produce efecto en el 50% de los degus estudiados.

Asímismo, la morfina en dosis de 3,2 mg/Kg i.v. no produce efecto sobre las contracciones peristálticas del ileum del degu ; mientras 0,8 mg/Kg i.v. produce inhibición de las contracciones peristálticas por aumento de la tensión intraluminal en el cuy, otro caviomorfo.

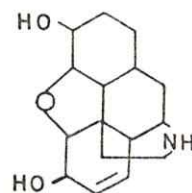
En los mamíferos, la morfina es transformada preferentemente a través de dos vías metabólicas: la conjugación con UDPGA en su OH-fenólico y la N-desmetilación oxidativa. Estas reacciones son catalizadas, respectivamente, por la UDP-glucuroniltransferasa y el sistema oxidativo del citocromo P-450.

En la mayoría de los mamíferos, aproximadamente un 50% de la morfina administrada se elimina como glucurónido (30, 56). Este metabolito no presenta actividad farmacológica y una vez formado, es rápidamente excretado por la orina (56). El % de N-desmetilación se ha estimado aproximadamente en un 20% (56, 57). La normorfina, metabolito resultante de esta reacción enzimática, presenta los mismos efectos farmacológicos de la morfina; la extensión e intensidad de

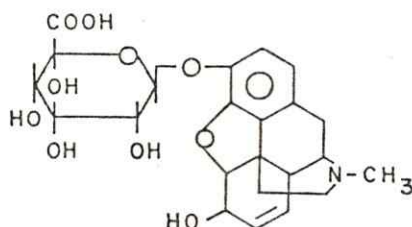
ellos depende de la vía de administración y de su biotransformación (3, 37, 57).



MORFINA



NORMORFINA



GLUCURONIDO DE MORFINA

Es necesario hacer notar además, que drogas que inhiben el metabolismo de la morfina, aumentan los niveles sanguíneos de este fármaco y son sinergistas de sus efectos farmacológicos (58, 59). Es válido por lo tanto, considerar la posibilidad que la tolerancia a la morfina observada en el *Octodon degus* en relación con la rata Wistar, pueda deberse, al menos en parte, a diferencias en las vías metabólicas de este fármaco.

PROPOSITOS DE ESTE TRABAJO. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el grado de generalidad que pudiera tener la mayor capacidad metabolizante de drogas del *Octodon degus* en relación con la rata Wistar. Por esto se estudió la tolerancia a otro fármaco, el pentobarbital, cuyos mecanismos de acción y de destoxificación son diferentes a los de la morfina.

Variaciones en el metabolismo de un fármaco pueden determinar diferencias en los efectos que produce en el organismo. Por ello nos interesó estudiar el metabolismo *in vivo* de la morfina y la glucuronilación y N-desmetilación de ella en microsomas hepáticos, en ambos roedores. El metabolismo *in vivo* de la morfina se estudió midiendo en forma comparativa la morfina no metabolizada y sus metabolitos polares, en homogeneizados de hígado y riñón de animales tratados con una dosis de morfina y sacrificados a tiempos variables después del tratamiento.

Con el propósito de investigar si las posibles diferencias que se encontraran en el metabolismo de la morfina afectaban también a otros xenobióticos, se estudiaron en microsomas hepáticos diversas reacciones enzimáticas catalizadas por la UDP-glucuroniltransferasa y el sistema oxidativo del citocromo P-450, así como la glutatión-S-transferasa en el sobrenadante de 105000 x g o fracción citosólica hepática.

RESULTADOS PRINCIPALES. El *Octodon degus* presenta tolerancia a Pentobarbital en relación con la rata Wistar. La morfina es metabolizada *in vivo* e *in vitro* más rápidamente por el degu que la rata. Similares resultados se obtuvieron en el estudio del metabolismo *in vitro* de los diversos xenobióticos analizados, como son: p-nitrofenol, 1-Cl-2,4-dinitrobenceno, aminopirina, amilina, naftaleno y p-nitroanisol

Las diferencias metabólicas observadas en favor del degu se podrían explicar principalmente, por el mayor contenido de las enzimas metabolizantes de drogas presentes en el hígado de este roedor, en relación con la rata.

Estos resultados pueden explicar en parte, la tolerancia a la morfina y al pentobarbital observada en el degu en relación con la rata.

II. MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS UTILIZADOS

Iris Base, p-nitrofenol, UDPGA (sal de amonio) albúmina de bovino fracción V, NADP, G-6-P, G-6-P deshidrogenasa, GSH, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, acetyl-acetona y 2,6-dicloroquinonclorimida, se obtuvieron de Sigma Chemical Company. Formaldehído, aminopirina, naftaleno, anilina, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, fenol, acetato de etilo, p-aminofenol, α -naftol, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y acetato de amonio, se obtuvieron de Merck, Darmstadt. Dicloroetileno, alcohol amílico, alcohol isoamílico, cloruro de magnesio y éter etílico, se obtuvieron de Fisher Scientific Company. Carbonato de sodio se obtuvo de Matheson Coleman. Ditionito de sodio se obtuvo de May y Baker Ltd. England. Morfina·HCl y pentobarbital sódico se obtuvieron de Laboratorios Mallinckrodt. Morfina·HCl [C^{14}]N-CH₃ (57 mCi/mmol) se obtuvo de Amersham Searle Corporation. Aquasol se obtuvo de New England Nuclear. p-nitroanisol, 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno, se obtuvieron de Aldrich Chemical Company.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En estos estudios se emplearon ratas de la cepa Wistar y *Octodon degus*, caviomorfo chileno de la familia Octodontidae, comunmente llamado degu. Los animales se obtuvieron del vivero del Departamento de Farmacología de la División Norte de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Los animales utilizados fueron machos de tres a cinco meses de edad cuyos pesos fluctuaron entre 190 y 220 gramos. Fueron mantenidos con una dieta normal (pellet Purina) y agua *ad libitum* y a una temperatura ambiente de 21°C.

EFFECTOS FARMACOLOGICOS PRODUCIDOS POR PENTOBARBITAL

En estos experimentos cada animal se inyectó por vía intraperitoneal, con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/Kg de peso corporal. El vehículo de inyección fue agua destilada y el volumen inyectado, 0,2 ml por cada 100 gramos de peso corporal.

Los efectos medidos fueron:

- a. El tiempo de latencia de sueño que se determinó midiendo el tiempo transcurrido desde el momento de la inyección hasta que el animal perdió el reflejo de enderezamiento.
- b. El tiempo de sueño que se determinó midiendo el tiempo transcurrido desde el momento en que el animal perdió el reflejo de enderezamiento hasta que lo recuperó.
- c. La frecuencia respiratoria que se determinó contando el

número de respiraciones por minuto durante el tiempo de sueño.

ESTUDIOS REALIZADOS IN VIVO CON MORFINA

Se utilizaron grupos de tres animales, tanto de ratas Wistar como de *Octodon degus*. Los animales de cada grupo se inyectaron por vía subcutánea con una dosis de clorhidrato de morfina [C^{14}]-N-metil de 7,5 mg por Kg de peso corporal (0,25 μ Ci/ μ mol). El vehículo de inyección fue agua destilada y el volumen inyectado, 0,2 ml por cada 100 gramos de peso corporal. A continuación, los animales de cada grupo se sacrificaron por decapitación a intervalos de 30, 60 y 120 min después de la administración de morfina.

OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE TEJIDOS

Las muestras de sangre se recolectaron del cuello de los animales al ser decapitados y se recibieron en tubos heparinizados (5,00 Unidades de heparina/0,1 ml de sangre).

El cerebro, el hígado y los riñones se extirparon, pesaron y cortaron en pequeños trozos. De esta forma, cada órgano se suspendió en 4 volúmenes de agua destilada (4°C) que contenía gotas de alcohol isoamílico y se homogeneizó en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón. La homogeneización se efectuó a 200 rpm.

DETERMINACION DE MORFINA EN SANGRE

En esta determinación se usó la técnica radiactiva de Yeh y Woods (60), modificada por Del Villar *et al.* (61).

Para realizar esta determinación, alícuotas de 0,2 ml de sangre heparinizada se mezclaron con 0,2 ml de clorhidrato de morfina (1 mg/ml) y 0,8 ml de K_2HPO_4 al 40% P/V; se extrajeron dos veces con 5,0 ml de dicloroetileno: alcohol amílico (70:30). La extracción con esta mezcla de solventes fue del 95% de la morfina existente en las muestras de sangre.

A continuación, alícuotas de 2,5 ml de la fase orgánica se transfirieron a tubos de conteo, se mezclaron con 10 ml de Aquasol (mezcla de centelleo para muestras líquidas acuosas y orgánicas) y se contaron en un contador de centelleo Nuclear Chicago Mark I, con una eficiencia para $[C^{14}]$ de 75%.

DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD TOTAL EN CEREBRO

En estas determinaciones se utilizó la técnica radiactiva desarrollada por Shean Jang Liu (62, 63). La radiactividad total que representa la morfina y sus metabolitos, se cuantificó en alícuotas de homogeneizados de tejido solubilizadas.

Para ello, alícuotas de 0,5 ml de homogeneizado de cerebro se mezclaron con 1,0 ml de Protosol (solubilizador de tejidos) y se incubaron durante 6 horas a 50°C con agitación

constante. Al término de este período, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se mezclaron con 10 ml de Aquasol y se contaron en un contador de centelleo Mark I.

Los valores de radiactividad total obtenidos se corrigieron por el "quenching", el que se determinó agregando 10 µl de clorhidrato de morfina [C^{14}]N-metil (10.000 cpm) por gramo de tejido homogeneizado (aproximadamente 5,0 ml de homogeneizado) como standard interno. La eficiencia del conteo en las muestras fue del 84%.

DETERMINACION DE MORFINA Y SUS METABOLITOS POLARES EN HIGADO Y RINON

En estas determinaciones se utilizó la técnica radiactiva de Yeh y Woods (60), modificada por Del Villar *et al.* (61).

Para ello, alícuotas de 2,0 ml de homogeneizado de hígado o riñón se mezclaron con 2,0 ml de K_2HPO_4 al 40% P/V y se extrajeron dos veces con 10 ml de dicloroetileno: alcohol amílico (70:30).

Con el objeto de cuantificar la morfina no metabolizada extraída en la fase orgánica, alícuotas de 2,5 ml de esta fase se mezclaron con 10 ml de Aquasol y se contaron en un contador de centelleo Mark I.

Del mismo modo, alícuotas de 1,0 ml de la fase acuosa que contenía los metabolitos polares de la morfina, se mezclaron con 6,0 ml de agua destilada y 10 ml de Aquasol; se

agitaron vigorosamente para formar un gel homogéneo y transparente y se contaron en un contador de centelleo Mark I.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DEL HIGADO

Los animales usados en estos estudios se mantenían en ayunas durante 15 horas previas al sacrificio, con agua *ad libitum*. En cada experimento se utilizaron grupos de 4 animales de ratas Wistar y degu y se procesaron en forma paralela, usando la metódica descrita en Baron y Tephly (64).

Los animales se sacrificaron por decapitación. A continuación, los hígados se perfundieron *in situ* con 4 volúmenes de 25 ml de NaCl 0,9% y se extirparon y limpiaron de tejido conectivo y vasos sanguíneos. A diferencia de la rata, el degu posee vesícula biliar, que debe extirparse.

Los órganos de cada grupo de animales se pesaron y cortaron en pequeños trozos y se prepararon homogeneizados totales al 20% en KCl 1,15%. La homogeneización se realizó en forma manual en un homogeneizador Douncen Wheaton tipo B, realizando 15 pases.

El homogeneizado total así preparado, se centrifugó a 9.000 x g durante 20 min en una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC 2-B, para sedimentar células intactas, núcleos y mitocondrias. El sedimento se eliminó y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante 1 hr en una

ultracentrífuga Beckman modelo L3-50. El sedimento de esta centrifugación o fracción microsómica, se utilizó para medir las actividades enzimáticas catalizadas por el sistema oxidativo microsómico del citocromo P-450 y la UDP-glucuroniltransferasa, y el sobrenadante o fracción citosólica, para medir la actividad glutatión-transferásica.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas de las fracciones microsómicas y citosólicas, se determinaron por el método de Lowry (65), utilizando albúmina bovina como estándar.

DETERMINACION DE CITOCROMO P-450 EN MICROSOMAS HEPATICOS

Esta determinación se realizó utilizando el método de Omura y Sato (66, 67). Este método aprovecha la capacidad del monóxido de carbono de coordinarse con el citocromo P-450 reducido.

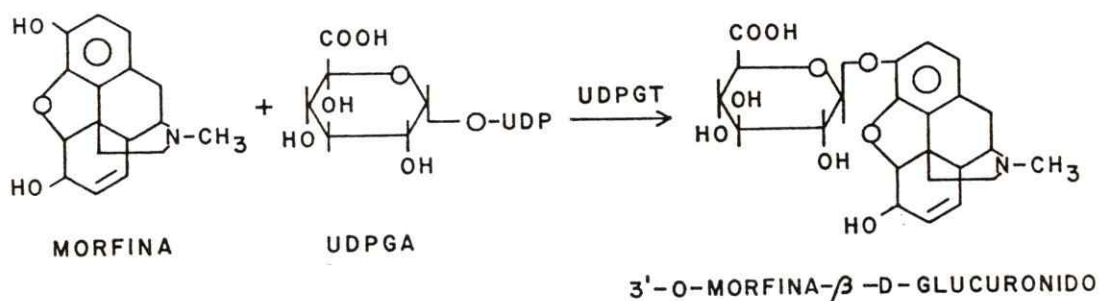
La fracción microsómica se suspendió en buffer fosfato 0.1 M pH 7,5. En dos cubetas, referencia y muestra, se colocó 1,0 ml de suspensión microsómica (aproximadamente 0,5 mg de proteína por ml) y 0,5 mg de diotinito de sodio, este último para reducir al citocromo P-450. Después de establecer la línea base, se burbujeó monóxido de carbono en la cubeta muestra durante 30 - 60 segundos y se inscribió el espectro entre 390 y 500 nm. Se utilizó para ello, un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu, modelo UV 210. El

contenido de citocromo P-450 se calculó midiendo el incremento de absorbancia entre 450 y 490 nm y aplicando el coeficiente de extinción molar $91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ descrito por Omura y Sato (67).

Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (18°C).

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE CONJUGACION

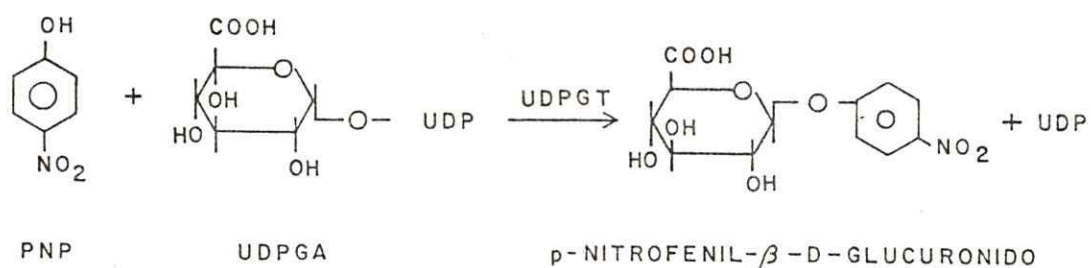
1. *Conjugación de morfina con UDPGA.* La reacción enzimática es la siguiente:



La actividad glucuroniltransferásica para morfina, se determinó midiendo el glucurónido formado en la reacción enzimática por el método de Yeh y Woods (60), modificado por Del Villar *et al.* (61). Esta técnica utiliza clorhidrato de morfina [C^{14}]N-metil como sustrato.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 0,5 ml): TRIS 50 mM, pH 8,0; MgCl_2 5,0 mM; UDPGA 5,0 mM; 1,0 mg de proteína microsómica hepática.

2. Conjugación de *p*-nitrofenol con UDPGA: la reacción es la siguiente:



La actividad glucuroniltransferásica se midió determinando el PNP remanente en la mezcla de reacción, por el método de Isselbacher *et al.* (72). El PNP en medio alcalino, absorbe fuertemente a 400 nm y esta propiedad se pierde al ser conjugado con UDPGA.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 0,5 ml): TRIS 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 5,0 mM; concentraciones variables de PNP desde 0,1 a 1,0 mM; 1 mg de proteína microsomal hepática y UDPGA 5,0 mM.

Se utilizó como blanco un sistema que contenía los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero se omitía el UDPGA.

La reacción se inició agregando a las muestras el UDPGA. Las muestras y los blancos se incubaron durante 12

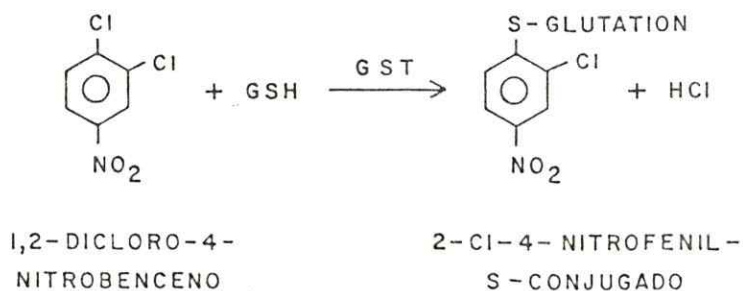
min a 37°C en un baño termorregulado con agitación constante. La reacción se detuvo agregando 1,5 ml de TCA 4,5% P/V y las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos.

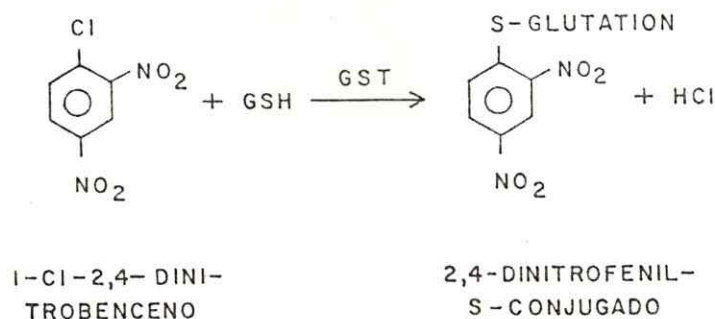
A continuación, alícuotas de 0,5 ml de los sobrenadantes se alcalinizaron con 2,0 ml de NaOH 5,0 M y se leyó la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro Beckman DU.

La cantidad de PNP remanente en las muestras, se calculó utilizando los blancos como standard. La concentración de PNP de los blancos correspondía a la inicial. El método sigue la ley de Lambert-Beer.

La cantidad de p-nitrofenilglucurónido formada en la reacción enzimática, se calculó por diferencia entre la concentración inicial de PNP del blanco y la remanente en la muestra al término del ensayo enzimático.

3. *Conjugación de 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno con GSH:* las reacciones enzimáticas son las siguientes:





La actividad glutatión-transferásica, se determinó utilizando el método de Habig *et al.* (73), modificado por Repetto y Morello (74). La conversión de los sustratos en conjugados de glutatión, produce un cambio en las propiedades espectrales que se aprovecha para cuantificar la reacción.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 1,0 ml): buffer fosfato 0,1 M, pH 6,5; GSH 4,0 mM; 5,0 μg de proteína citosólica y concentraciones variables de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno ó de 1,2-dicloro-4-nitrobenceno.

Se utilizó como blanco, un sistema que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, pero se omitía la proteína citosólica. La reacción se inició agregando el sustrato. El ensayo enzimático se realizó a 25°C.

La velocidad de reacción se determinó midiendo en forma continua el aumento de absorbancia a 340 nm. Para esto, se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu, Modelo UV210 equipado con inscriptor.

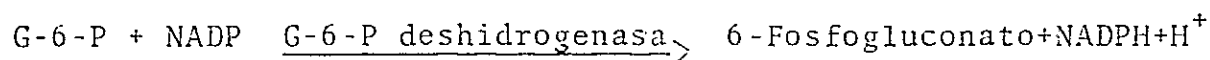
La concentración de conjugado formado en la reacción enzimática, se calculó aplicando los coeficientes de extinción

molar de los conjugados descritos por Habig: $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el conjugado del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y $8,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el conjugado del 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (73).

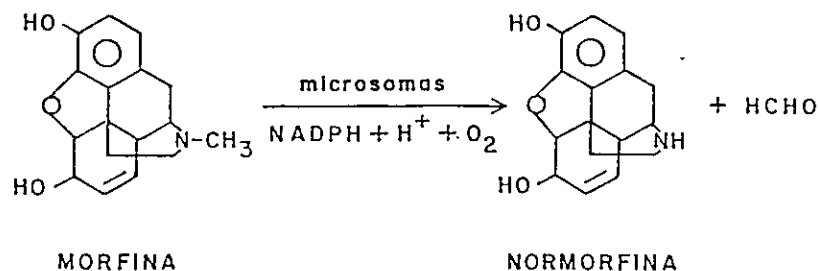
El tiempo de incubación y la concentración de proteína utilizados para medir cada una de las actividades de conjugación descritas, fueron directamente proporcionales a la concentración de producto formado.

ACTIVIDADES OXIDATIVAS CATALIZADAS POR EL SISTEMA MICROSOMAL DEL CITOCROMO P-450

Todas las actividades oxidativas ensayadas, se midieron acoplado a la mezcla de reacción el sistema generador de NADPH de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (66), que funciona de acuerdo a la reacción siguiente:



1. *N*-desmetilación de morfina: la reacción es la siguiente:



La actividad N-desmetilante de los microsomas hepáticos, se determinó midiendo el formaldehído producido en la reacción enzimática. Para ello, se desarrolló un método radiactivo que supera la sensibilidad del método colorimétrico de Nash (69).

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 1,0 ml): TRIS 35 mM, pH 8,0; $MgCl_2$ 3,5 mM; G-6-P 0,1 M; NADP 10 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 unidades; clorhidrato de morfina [C^{14}] N-metil en concentraciones variables desde 0,25 a 2,0 mM (actividad específica: 500 cpm/nmol) y 1,5 mg de proteína microsómica.

Se utilizó como blanco un sistema que contenía los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero se omitía la G-6-P deshidrogenasa.

La reacción se inició agregando la suspensión microsómica. La mezcla se incubó durante 20 min a $37^\circ C$ con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 0,5 ml de TCA al 10%, las que se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos.

A continuación, alícuotas de 1,0 ml de los sobrenadantes se mezclaron con 0,5 ml de NaOH 0,41 N, 0,5 ml de clorhidrato de morfina 0,1% y 2,0 ml de K_2HPO_4 al 40%. Las mezclas se extrajeron dos veces durante 5 min con 10 ml de dicloroetileno: alcohol amílico (70:30). La fase orgánica se eliminó por aspiración. El $HC^{14}OH$ que permanece en la fase acuosa se

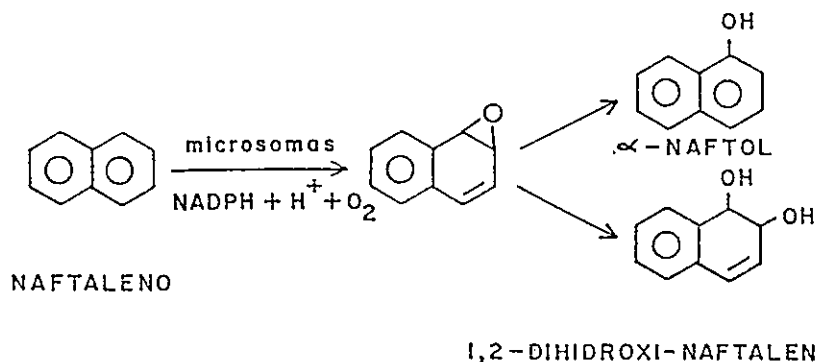
La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 1,0 ml): TRIS 35 mM, pH 8,0; $MgCl_2$ 3,5 mM; G-6-P 0,1 M; NADP 10 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 unidades; aminopirina en concentraciones variables desde 0,4 a 8,0 mM y 1.0 mg de proteína microsómica hepática.

Se utilizó como blanco un sistema que contenía la misma composición de la mezcla de reacción, pero se omitía la G-6-P deshidrogenasa. La reacción se inició agregando la suspensión microsómica. La mezcla se incubó durante 20 min a 37°C con agitación constante.

La reacción se detuvo precipitando las proteínas con TCA al 10%, las que se separaron por centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de 10 ml, se mezclaron con 0,5 ml de 2,4-pentanodiona (100 μ l de 2,4-pentanodiona: 25 ml de CH_3COONH_4 4 M) y se dejaron reposar durante 2 hrs a temperatura ambiente y en la oscuridad. Al término de este período, se leyó la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro Beckman DU.

La concentración de HCHO existente en las muestras se determinó utilizando HCHO como standard. Para determinar la linealidad del método, se realizó una curva standard. Las concentraciones usadas fluctuaron entre 10 y 100 nmoles, rango útil para los fines del ensayo enzimático. El gráfico de absorbancia versus concentración de HCHO fue lineal.

3. *Hidroxilación de Naftaleno*: la reacción es la siguiente:



La actividad hidroxilante microsómica se determinó utilizando la técnica colorimétrica de Booth y Boyland (71). El diol formado se transforma en α-naftol y la velocidad de reacción total se expresa en nmoles de α-naftol.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 1,0 ml): buffer fosfato 95 mM, pH 7,5; MgCl_2 10 mM; NADP 1,25 mM; G-6-P 25 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 unidades; Naftaleno 2,4 mM y 2,0 mg de proteína microsómica hepática.

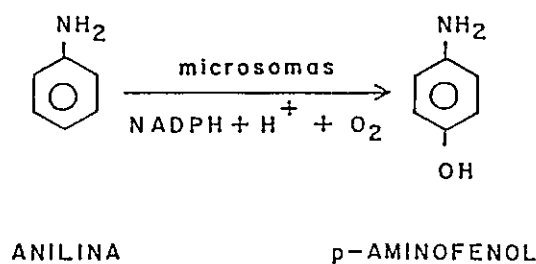
La reacción se inició agregando la G-6-P deshidrogenasa. La mezcla se incubó durante 10 min a 37°C con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 0,1 ml de HCl concentrado. A continuación, se calentó en baño de agua a 100°C durante 10 min; se enfrió a temperatura ambiente y se le agregó 3,0 ml de acetato de etilo. Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min y se centrifugó a 2.000 rpm por 5 min para acelerar la separación de ambas fases.

La fase orgánica se transfirió a un tubo de 25 ml con tapa y se mezcló con 0,2 ml de 2,6-dicloroquinonclorimida al 0,1% en etanol y 1,0 ml de Na₂CO₃ al 10% P/V. La mezcla se agitó durante 3 min y se centrifugó a 2.000 rpm. A continuación se midió la absorbancia de la fase orgánica a 605 nm.

La cantidad de α -naftol presente en las muestras, se determinó utilizando α -naftol como standard.

Para determinar la linealidad del método, se realizó una curva standard. Las concentraciones de α -naftol utilizadas fluctuaron entre 20 y 200 nmoles, rango útil para los fines del ensayo enzimático. El gráfico de absorbancia versus concentración de α -naftol fue lineal.

4. *Hidroxilación de Anilina*: la reacción enzimática es la siguiente:



La actividad hidroxilante de los microsomas hepáticos se determinó por el método de Imai, *et al.* (71). El p-aminofenol formado en la reacción enzimática se copula con fenol y el producto que es el fenol-indofenol, se mide espectrofotométricamente.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 1,0 ml): TRIS 65 mM, pH 7,5; $MgCl_2$ 6,5 mM; NADP 10 mM; G-6-P 100 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 unidades; anilina 8,0 mM y 3,0 mg de proteína microsómica hepática.

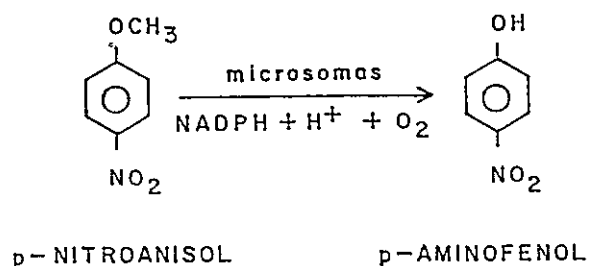
La reacción se inició agregando la suspensión microsómica. La mezcla se incubó durante 20 min a 37°C con agitación constante. La reacción se detuvo agregando a la mezcla de reacción 0,5 ml de TCA al 10% para precipitar las proteínas, las que se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo de 10 ml y se mezcló con 0,5 ml de Na_2CO_3 al 10%; 1,0 ml de fenol al 2% en NaOH 0,2 N y 2 gotas de NaOH 3 N. Se dejó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir el desarrollo de color y se leyó la absorbancia a 630 nm.

La cantidad de p-aminofenol formada en la reacción enzimática se determinó utilizando p-aminofenol como standard.

La linealidad del método se comprobó realizando una curva standard de p-aminofenol. Las concentraciones utilizadas fluctuaron entre 10 y 100 nmoles, rango útil para los fines del ensayo enzimático.

5. *O*-desmetilación de *p*-nitroanisol: la reacción enzimática es la siguiente:



La actividad *O*-desmetilante de los microsomas se determinó mediante el método de Isselbacher (72), que utiliza las propiedades espectrales del *p*-nitrofenol en medio básisico.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 0,6 ml): buffer fosfato 50 mM; pH 7,5; MgCl₂ 4 mM; NADP 4 mM; G-6-P 40 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 unidades; *p*-nitroanisol 5 mM; 2,0 mg de proteína microsómica hepática.

La reacción se inició agregando la G-6-P deshidrogenasa. La mezcla se incubó durante 20 min a 37°C, con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 2,4 ml de TCA 0,1 M, separándolas por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se mezclaron con 0,1 ml de NaOH 10 M y se leyó la absorbancia a 400 nm.

La cantidad de p-nitrofenol formada en la reacción enzimática se determinó utilizando p-nitrofenol como estándar.

La linealidad del método se comprobó realizando una curva estándar de p-nitrofenol. Las concentraciones utilizadas fluctuaron entre 10 y 100 nmoles de p-nitrofenol, rango útil para los fines del ensayo enzimático.

El tiempo de incubación y la concentración de proteínas utilizados en cada una de las actividades oxidativas medidas, fueron directamente proporcionales a la concentración de producto.

CALCULOS ESTADISTICOS. Los valores se expresaron como el promedio de los valores obtenidos de cada experimento \pm las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios calculadas de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$s = \sqrt{\frac{\sum X^2 - n \bar{X}^2}{n - 1}}$$

Para asegurar una mejor estimación de la variabilidad común a ambos universos de los que se extrajeron las muestras (ratas Wistar y *Octodon degus*), se combinaron las variaciones de ambas muestras de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$s_c = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Este valor se usó para determinar el valor de \underline{t} el que se calculó de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{sc \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Los grados de libertad correspondieron al valor obtenido de la suma algebraica: $n_1 + n_2 - 2$

La significancia de las diferencias de los resultados obtenidos entre la rata Wistar y el *Octodon degus* (p) se obtuvo de la Tabla publicada en Fisher y Yates. Statistical Tables for Biological and Agricultural Research, Edimburgo, Oliver and Boyd Ltd. 1938.

III. RESULTADOS

EFFECTOS FARMACOLOGICOS DEL PENTOBARBITAL EN RATA WISTAR Y OCTODON DEGUS. El pentobarbital es un depresor del sistema nervioso central, que pierde su efecto en el organismo solamente al ser biotransformado. Este fármaco es hidroxilado en su cadena alifática lateral a través del sistema oxidativo microsómico del citocromo P-450. Por esto, nos interesó medir comparativamente algunos efectos farmacológicos producidos por este fármaco en la rata Wistar y en el *O. degus*.

Los resultados se presentan en la Tabla I. El tiempo de latencia de sueño y el tiempo de sueño, fueron respectivamente 8,4 y 34,4 min en el degu y 2,3 y 72,5 en la rata.

Además de los efectos hipnóticos señalados, el pentobarbital produce depresión respiratoria. Las frecuencias respiratorias medidas durante el período de sueño, fueron 97 respiraciones por minuto en el degu y 60,5 en la rata. Las frecuencias respiratorias normales fueron 110 respiraciones por min en la rata y 100 en el degu.

Estos resultados indican que el degu presenta tolerancia al pentobarbital en relación con la rata.

TABLA I

EFFECTOS FARMACOLOGICOS PRODUCIDOS POR PENTOBARBITAL EN RATA
WISTAR Y OCTODON DEGUS

Efectos	Rata Wistar	<i>Octodon degus</i>	p	Razón <i>O. degus</i> /R.Wistar
Tiempo de Latencia (min).	2,3 ± 0,43	8,4 ± 1,78	<0,001	3,65
Tiempo de Sueño (min).	72,5 ± 6,83	34,4 ± 4,92	<0,001	0,47
Frecuencia Respiratoria (respiraciones por min).				
Tratados	60,5 ± 7,79	97,0 ± 14,9	<0,005	1,60
Controles	110 ± 12,0	100 ± 10,0		

Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/kg de peso, según se describió en Materiales y Métodos.

Las mediciones de tiempo de latencia, tiempo de sueño y frecuencia respiratoria, se realizaron según se describió en Materiales y Métodos.

Los valores indicados representan el promedio de 6 animales ± las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

NIVELES SANGUINEOS DE MORFINA EN RATA WISTAR Y *Octodon degus*. Los niveles sanguíneos de morfina se midieron a los 30, 60 y 120 min después del tratamiento de los animales con una dosis subcutánea de morfina (7,5 mg/Kg de peso corporal).

Los resultados se muestran en la Tabla II. A los 30 y 60 min no se observaron diferencias significativas en las concentraciones sanguíneas de morfina en ambos roedores. Sin embargo, a los 120 min esta concentración fue significativamente mayor en la rata que en el degu.

NIVELES DE MORFINA EN CEREBRO. Diferencias de especie en la concentración de morfina en el cerebro, órgano en el cual se localizan los receptores de opioides, determinan importantes variaciones en la actividad biológica de éste fármaco. Por esta razón, se midió la radiactividad morfínica total presente en el cerebro a los 30, 60 y 120 min después del tratamiento de los animales con una dosis subcutánea de morfina [C^{14}] - N-metil de 7,5 mg/Kg (0,25 μ Ci/ μ mol).

Los resultados se muestran en la Tabla III. Los valores de radiactividad morfínica total en el cerebro fueron significativamente menores en el degu que en la rata, en los tres tiempo estudiados.

TABLA II

NIVELES SANGUINEOS DE MORFINA EN RATA WISTAR Y OCTODON DEGUS

Animal	Concentración de morfina ($\mu\text{g/ml}$ de sangre).					
	30 min		60 min		120 min	
		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
Rata Wistar	1,69 \pm 0,20		1,01 \pm 0,08		0,39 \pm 0,028	
<i>Octodon degus</i>	1,62 \pm 0,21	>0,6	0,99 \pm 0,05	>0,6	0,26 \pm 0,037	<0,01

Los animales se inyectaron con una dosis subcutánea de morfina de 7,5 mg/Kg de peso. El tratamiento de los animales, la obtención de las muestras de sangre y la determinación de morfina, se realizaron utilizando las técnicas descritas en Materiales y Métodos.

La concentración de morfina representa la radiactividad soluble en solventes orgánicos, expresada en μg equivalentes de morfina/ml de sangre.

Los valores indicados representan el promedio de 5 animales \pm las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

TABLA III

NIVELES DE MORFINA TOTAL EN CEREBRO DE RATA WISTAR Y OCTODON
DEGUS

Animal	Radiactividad total (μg equivalentes de morfina/g de cerebro fresco)					
	30 min		60 min		120 min	
		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
Rata Wistar	$0,46 \pm 0,019$	$<0,05$	$0,47 \pm 0,019$	$<0,01$	$0,48 \pm 0,040$	$<0,05$
<i>Octodon Degus</i>	$0,29 \pm 0,078$		$0,38 \pm 0,022$		$0,35 \pm 0,053$	

Los animales se inyectaron con una dosis subcutánea de morfina de 7,5 mg/Kg de peso. El tratamiento de los animales, la obtención de las muestras de cerebro y la determinación de la radiactividad total, se realizaron utilizando las técnicas descritas en Materiales y Métodos.

La radiactividad total está expresada en μg equivalentes de morfina/g de tejido fresco.

Cada valor representa el promedio de 3 animales \pm la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

METABOLISMO IN VIVO DE MORFINA. El hígado y el riñón son, respectivamente, los órganos que metabolizan y excretan mayoritariamente los fármacos. Uno de los criterios utilizados para determinar diferencias metabólicas *in vivo*, es la comparación de las concentraciones del fármaco administrado como de sus metabolitos en esos órganos.

Con este objeto, se midieron las concentraciones de morfina y las de sus metabolitos polares, en muestras de hígado y riñón obtenidas a los 30, 60 y 120 min después del tratamiento de los animales con una dosis de morfina [C^{14}] N-metil de 7,5 mg/Kg (0,25 μ Ci/ μ mol).

En la Tabla IV se muestran las concentraciones de morfina no metabolizada. Estos valores, corresponden a la radiactividad extraíble en solventes orgánicos y están expresados en μ g equivalentes de morfina por gramo de tejido fresco. En el hígado, las concentraciones de morfina no metabolizada fueron mayores en la rata que en el degu, en los tres tiempos estudiados. En el riñón, la concentración de morfina fue mayor en la rata sólo a los 30 minutos. A los 60 y 120 min no se observaron diferencias significativas entre ambos roedores.

Las concentraciones de metabolitos polares de morfina se presentan en la Tabla V. Los valores representan la radiactividad soluble en agua y están expresados en μ g equivalentes de morfina por gramo de tejido fresco. En el hígado, las

concentraciones de metabolitos polares de morfina fueron mayores en la rata que en el degu, en los tres tiempos estudiados. En el riñón, en cambio, estas concentraciones fueron mayores en el degu que en la rata, a excepción de los 30 min de tratamiento, tiempo en el cual no se observaron diferencias significativas entre ambos roedores.

Las razones entre los niveles de un fármaco y los de sus metabolitos en diferentes tejidos, dan información sobre la permanencia de éste fármaco en el organismo. Los resultados obtenidos de las razones hepáticas y renales entre las concentraciones de morfina no metabolizada y las de sus metabolitos polares, se muestran en la Tabla VI. En el hígado, las razones obtenidas a los 30 y 60 min de tratamiento, fueron iguales en ambos roedores. No obstante, la razón obtenida a los 120 min fue mayor en la rata que en el degu. En el riñón en cambio, estas razones fueron mayores en la rata en los tres tiempos estudiados.

CONTENIDO DE PROTEINAS HEPATICAS. La Tabla VII muestra las concentraciones obtenidas por gramo de hígado fresco y por 100 g de peso animal de: proteína microsómica, citocromo P-450 y proteína citosólica en la rata Wistar y *Octodon-degus*. Las concentraciones de estas proteínas fueron mayores en el degu, cualquiera fuera la forma de expresión de ellas. Así, las concentraciones expresadas por g de hígado y por

TABLA IV

NIVELES DE MORFINA NO METABOLIZADA EN HIGADO Y RIÑÓN DE RATA
WISTAR Y OCTODON DEGUS

		Concentración de morfina ($\mu\text{g/g}$ de tejido fresco)			
		30 min	60 min	120 min	
HIGADO					
Rata Wistar	$1,60 \pm 0,369$	p	$1,53 \pm 0,143$	p	$0,845 \pm 0,130$
		$<0,01$		$<0,01$	$<0,01$
<i>Octodon degus</i>	$0,81 \pm 0,020$		$0,97 \pm 0,163$		$0,396 \pm 0,020$
RIÑÓN					
Rata Wistar	$15,02 \pm 2,60$	p	$9,95 \pm 1,77$	p	$3,39 \pm 0,340$
		$<0,05$		$>0,2$	$>0,2$
<i>Octodon degus</i>	$8,78 \pm 0,90$		$7,96 \pm 0,95$		$2,84 \pm 0,625$

Los animales se inyectaron con una dosis subcutánea de morfina de 7,5 mg/Kg de peso. El tratamiento de los animales, la obtención de las muestras y la cuantificación de morfina, se realizaron utilizando las técnicas descritas en Materiales y Métodos.

La morfina representa la radiactividad soluble en solventes orgánicos expresada en μg equivalentes de morfina/g de tejido fresco.

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos \pm la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

TABLA V

NIVELES DE METABOLITOS POLARES DE MORFINA EN HIGADO Y RIÑON DE RATA WISTAR Y *OCTODON DEGUS*

		Concentración de metabolitos polares de morfina (μg equivalentes de morfina/g de tejido fresco)					
		30 min		60 min		120 min	
			<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
HIGADO							
Rata Wistar	5,83 \pm 1,260			5,43 \pm 0,171		3,66 \pm 0,105	
			<0,05				<0,01
<i>Octodon degus</i>	3,60 \pm 0,320			3,32 \pm 0,242		2,40 \pm 0,380	
							<0,02
RIÑON							
Rata Wistar	5,84 \pm 1,840			4,83 \pm 0,57		3,06 \pm 0,125	
			>0,5				<0,05
<i>Octodon degus</i>	5,58 \pm 1,580			12,16 \pm 1,97		4,76 \pm 0,520	
							<0,05

Los animales se inyectaron con una dosis subcutánea de morfina de 7,5 mg/Kg de peso. El tratamiento de los animales, la obtención de las muestras y la cuantificación de los metabolitos polares de morfina se realizaron, utilizando las técnicas descritas en Materiales y Métodos.

Las concentraciones de metabolitos polares de morfina representan la radiactividad soluble en agua, expresada en μg equivalentes de morfina/g de tejido fresco.

Cada valor representa el promedio de 3 animales \pm la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios

TABLA VI

RAZONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE MORFINA NO METABOLIZADA Y LAS DE SUS METABOLITOS POLARES ENCONTRADAS EN HIGADO Y RIÑON DE RATA WISTAR Y *OCTODON DEGUS*

	30 min		60 min		120 min	
HIGADO		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
Rata Wistar	0,28 ± 0,081	>0,4	0,28 ± 0,022	>0,6	0,24 ± 0,016	<0,01
<i>Octodon degus</i>	0,24 ± 0,025		0,29 ± 0,065		0,16 ± 0,014	
RIÑON						
Rata Wistar	2,58 ± 0,620	<0,05	1,78 ± 0,125	<0,001	1,18 ± 0,075	<0,001
<i>Octodon degus</i>	1,55 ± 0,276		0,66 ± 0,021		0,59 ± 0,095	

Cada valor representa el promedio obtenido de las razones entre los µg de morfina/g de tejido fresco (Tabla IV) y los µg de metabolitos polares de morfina/g de tejido fresco (Tabla V) ± la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios. N=3.

100 g de peso animal de proteína microsómica fueron 1,8 y 1,5 veces superior, el citocromo P-450 3,96 y 3,37 veces superior y la proteína citosólica 1,56 y 1,32 veces superior en el degu que en la rata, respectivamente.

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE CONJUGACION

a. Conjugación de morfina y p-nitrofenol con UDPGA. Las Figuras 1 y 2 muestran el estudio cinético comparado de la actividad glucuroniltransferásica para morfina y p-nitrofenol, respectivamente.

Las K_m aparentes para la glucuronilación de morfina y p-nitrofenol fueron iguales en ambos roedores. Asimismo, las V_{max} aparentes expresadas en nmoles de glucurónido formado/min/mg de proteína microsómica (Figuras 1 y 2, Paneles A), no fueron significativamente diferentes en ambos roedores ($p > 0,4$). Sin embargo, como el contenido de proteína microsómica por gramo de hígado fresco del degu fue aproximadamente dos veces el de la rata, al expresar las velocidades de glucuronilación en nmoles de glucurónido formado/min/g de hígado fresco, las V_{max} aparentes para la glucuronilación de morfina y p-nitrofenol fueron, respectivamente, 19 y 31,5 en el degu y 10,5 y 17,5 en la rata (Figuras 1 y 2, Paneles B).

TABLA VII

CONTENIDOS DE PROTEINAS HEPATICAS DE RATA WISTAR Y *OCTODON*
DEGUS

	Rata Wistar	<i>Octodon</i> <i>degus</i>	p	Razón <i>O. degus</i> /R. Wist
Peso Hígado/100 g de peso animal (g)	4,61 ± 0,549	3,98 ± 0,537	< 0,05	0,86
Prot. Microsómicas mg de prot/g hígado	3,45 ± 0,21	6,24 ± 0,42	< 0,001	1,81
mg de prot/100 g peso animal	15,53 ± 1,98	23,24 ± 2,75	< 0,001	1,49
nmoles de cit. P-450/mg prot.	0,69 ± 0,08	1,45 ± 0,08	< 0,001	2,10
nmoles de cit. P-450/g de hígado fresco	2,30 ± 0,26	9,12 ± 2,30	< 0,001	3,96
nmoles de cit. P-450/100 g peso animal	9,89 ± 1,46	33,35 ± 5,14	< 0,001	3,37
Prot. Citosólica				
mg de prot/g hígado fresco	41, 0 ± 5,20	64,0 ± 7,39	< 0,001	1,56
mg de prot/100 g de peso animal	184,96 ± 21,62	243,66 ± 25,83	< 0,01	1,32

El fraccionamiento celular y las determinaciones de proteína y citocromo P-450, se realizaron utilizando las técnicas descritas en Materiales y Métodos.

Cada valor representa el promedio de 6 experimentos ± la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

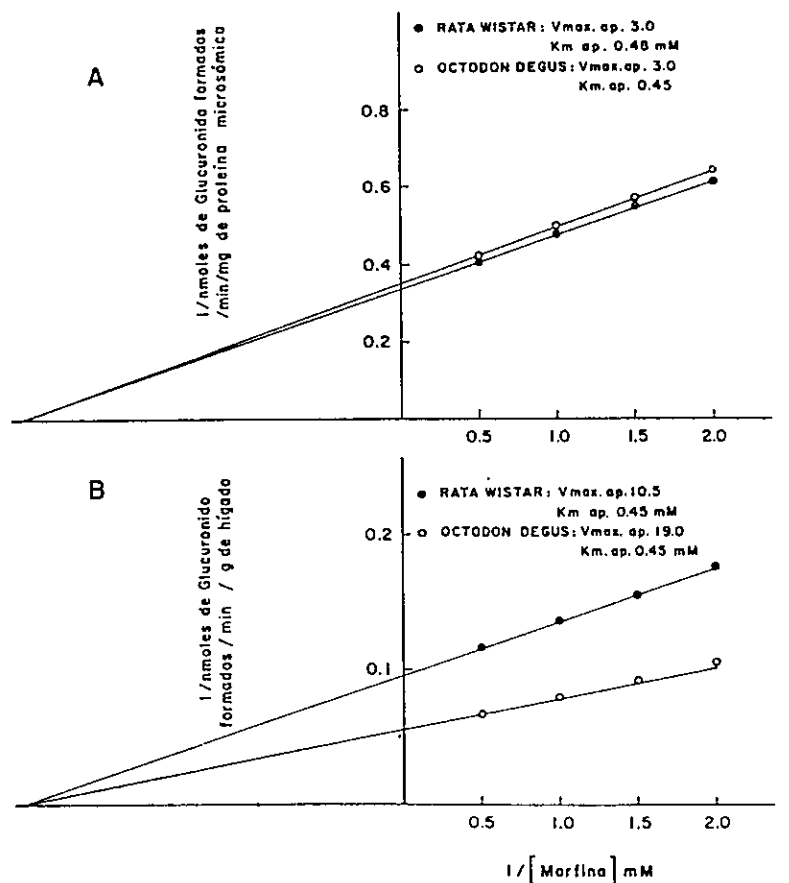


FIGURA 1. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de morfina con UDPGA en microsomas hepáticos de rata Wistar y *Octodon degus*.

- A. Velocidad de glucuronilación expresada en nmoles de glucurónido formados / min / mg de proteína microsómica.
- B. Velocidad de glucuronilación expresada en nmoles de glucurónido formados / min / g de hígado fresco.

Las condiciones del ensayo enzimático y la técnica radiactiva para la determinación del glucurónido de morfina están descritas en Materiales y Métodos.

Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

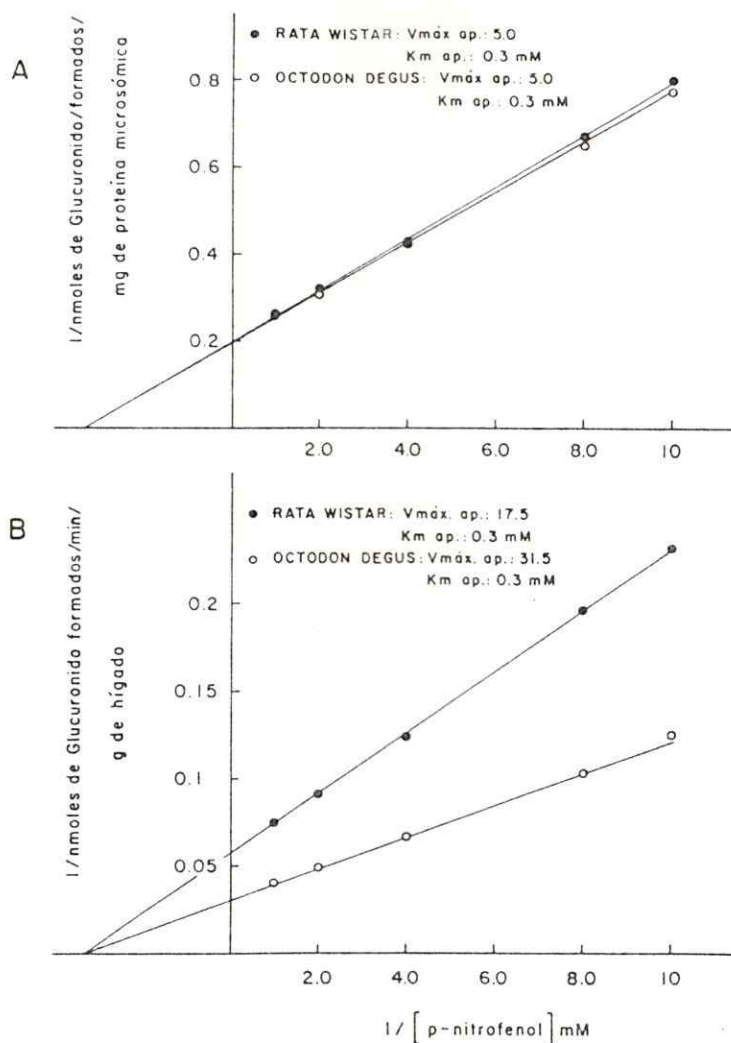


FIGURA 2. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de p-nitrofenol con UDPGA, en microsomas hepáticos de rata Wistar y *Octodon degus*.

- A. Velocidad de glucuronilación expresada en nmoles de glucurónido formados / min / mg de proteína microsómica.
- B. Velocidad de glucuronilación expresada en nmoles de glucurónido formados / min / g de hígado fresco.

Las condiciones del ensayo enzimático y la técnica utilizada para la determinación del p-nitrofenol remanente en la mezcla de reacción, están descritas en Materiales y Métodos.

Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

b. Conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno con GSH. Las K_m aparentes para los sustratos 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2 dicloro-4-nitrobenceno fueron respectivamente, 0,15 mM y 1,7 mM en la rata (Figuras 3 y 5) y 0,37 mM y 0,48 mM en el degu (Figuras 4 y 5). Las V_{max} aparentes para el sustrato 1-Cl-2,4-dinitrobenceno expresadas como μ moles de conjugado formado/min/mg de proteína citosólica fueron 1,5 en la rata y 33,5 en el degu (Figuras 3 y 4, Paneles A). Las V_{max} aparentes para el sustrato 1,2-dicloro-4-nitrobenceno expresadas en nmoles conjugado formado/min/mg de proteína citosólica fueron 66 en la rata y 42 en el degu (Figura 5, Panel A). Como el contenido de proteína citosólica por gramo de hígado fresco fue 1,5 veces superior en el degu que en la rata, las V_{max} aparentes para el sustrato 1-Cl-2,4-dinitrobenceno expresadas en μ moles de conjugado formado/min/gramo de hígado fresco fueron 62 en la rata y 2050 en el degu (Figuras 3 y 4, Paneles B). En cambio, las V_{max} aparentes para la conjugación del sustrato 1,2-dicloro-4-nitrobenceno expresadas en nmoles de conjugado formado/min/g de hígado fresco fueron iguales en ambos roedores y su valor fue 2700 (Figuras 5, Panel B).

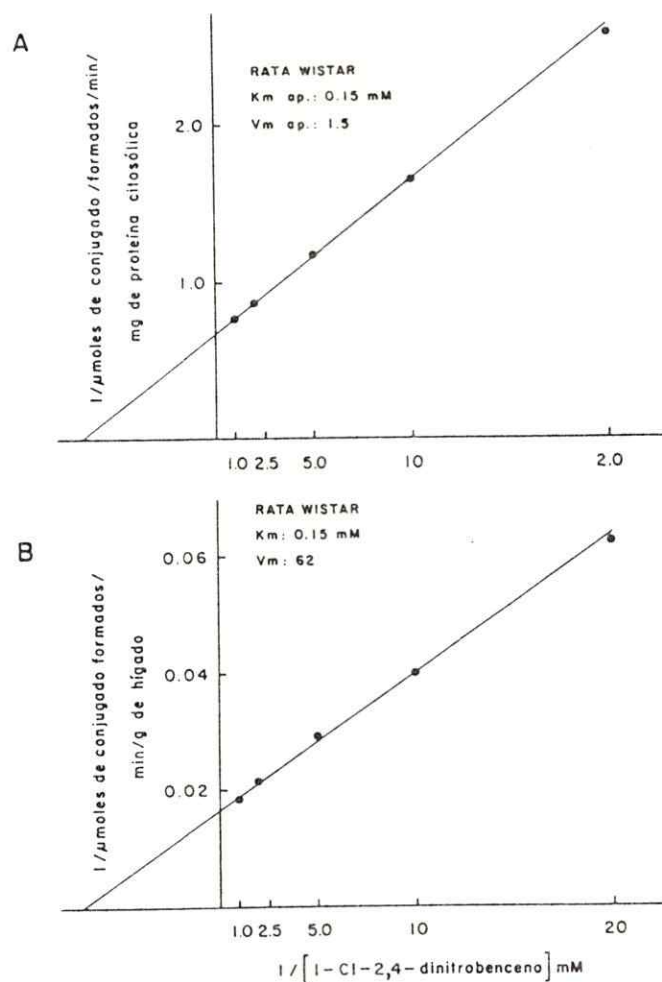


FIGURA 3. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de 1-Cl-2,4-dinitro-benceno con GSH en fracción citosólica hepática de rata Wistar.

- A. Velocidad de conjugación con GSH expresada en nmoles de conjugado formados / min / g de proteína citosólica.
- B. Velocidad de conjugación con GSH expresada en nmoles de conjugado formados / min / g de hígado fresco.

Las condiciones de ensayo enzimático y la técnica utilizada para la determinación del conjugado formado, están descritas en Materiales y Métodos.

Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

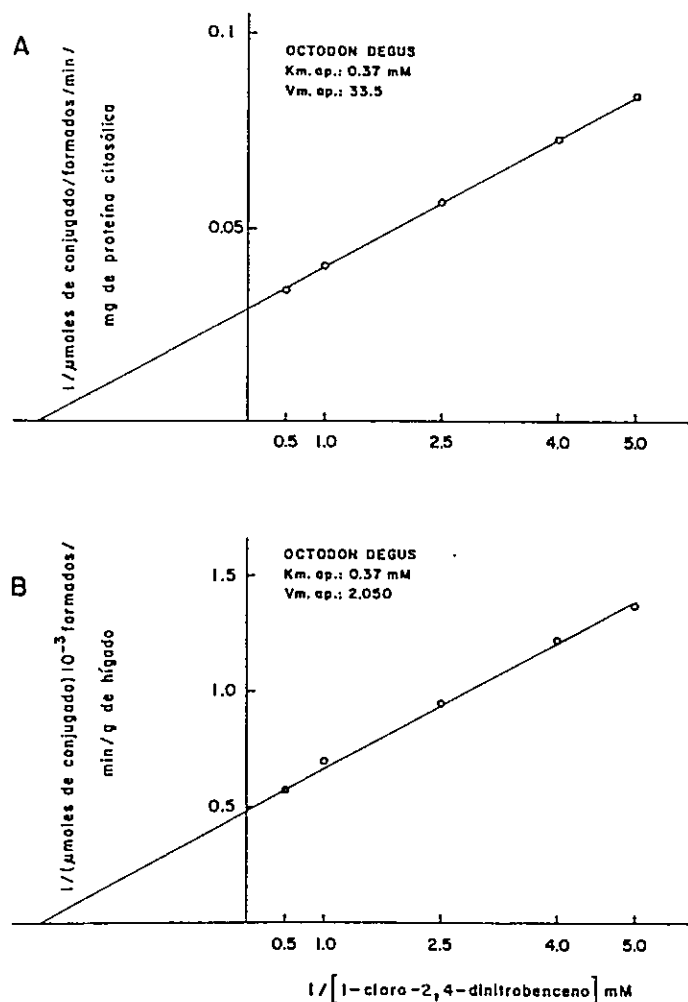


FIGURA 4. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de 1-Cl-2,4-dinitro-benceno con GSH en fracción citosólica de *Octodon degus*.

- A. Velocidad de conjugación con GSH expresada en nmoles de conjugado formados / min / mg de proteína citosólica.
- B. Velocidad de conjugación con GSH expresada en nmoles de conjugado formados / min / g de hígado fresco.

Las condiciones del ensayo enzimático y la técnica utilizada para la determinación del conjugado formado, están descritas en Materiales y Métodos.

Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

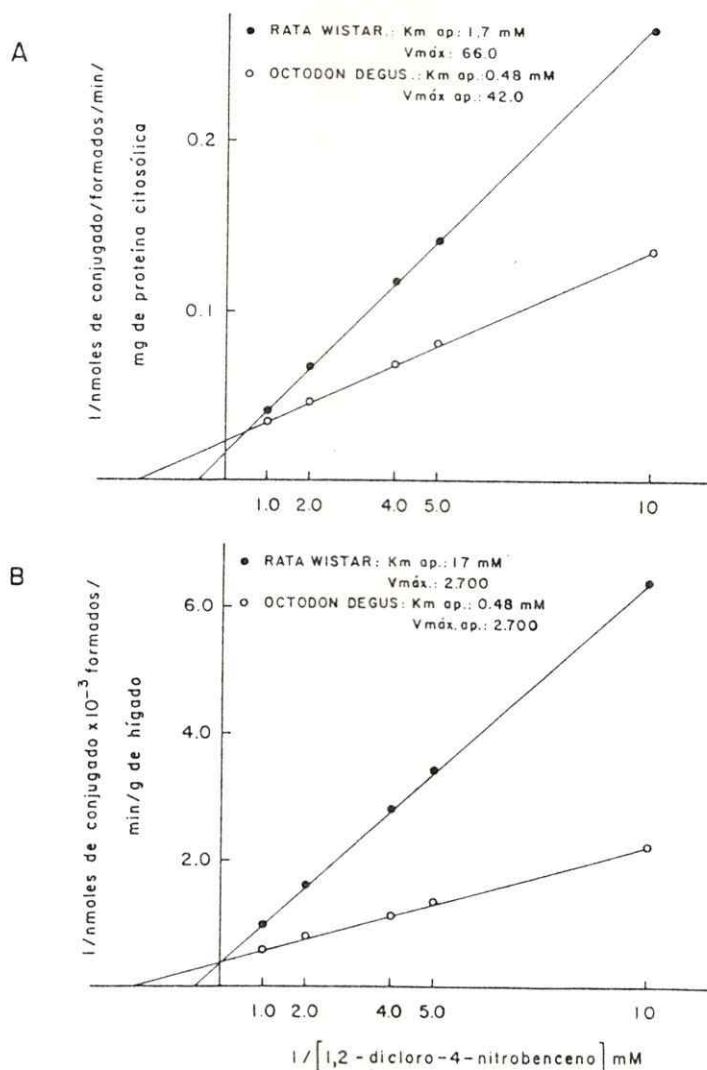


FIGURA 5. Gráficos de dobles recíprocos de la conjugación de 1,2-dicloro-4-nitro-benceno con GSH en fracciones citosólicas hepáticas de rata Wistar y *Octodon degus*.

- A. Velocidad de conjugación con GSH expresada en nmoles de conjugado formados / min / mg de proteína citosólica.
- B. Velocidad de conjugación con GSH expresada en nmoles de conjugado formados / min / g de hígado fresco.

Las condiciones del ensayo enzimático y la técnica utilizada para la determinación del conjugado formado, están descritas en Materiales y Métodos.

Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

REACCIONES CATALIZADAS POR EL SISTEMA OXIDATIVO DEL CITOCROMO P-450.

a. N-desmetilación de morfina y aminopirina. Los resultados obtenidos de la N-desmetilación de morfina se muestran en la Figura 6 y los de la aminopirina en la Figura 7. Los valores de las K_m aparentes para ambas reacciones fueron iguales en la rata Wistar y en el *O. degus*. El valor de la K_m aparente para la N-desmetilación de morfina fue 1,1 mM y para la N-desmetilación de aminopirina 1,6 mM. Los valores de las V_{max} aparentes para la N-desmetilación de morfina y aminopirina expresados en nmoles de HCHO formado/min/nmol de citocromo P-450, no fueron significativamente diferentes en ambos roedores (Figuras 6 y 7, Paneles A). Sin embargo, como los contenidos de citocromo P-450 por mg de proteína microsómica y por gramo de hígado fueron, respectivamente dos y cuatro veces superiores en el degu que en la rata, al expresar las velocidades de reacción por mg de proteína microsómica (Figuras 6 y 7, Paneles B) y por gramo de hígado (Figuras 6 y 7, Paneles C) las V_{max} aparentes en el degu fueron respectivamente dos y cuatro veces superiores a las de la rata. Los valores de V_{max} aparentes para la N-desmetilación de morfina expresados por mg de proteína microsómica y por gramo de hígado fresco fueron, respectivamente, 8 y 50 en el degu y 3,8 y 12,5 en la rata (Figura 6, Paneles B y C).

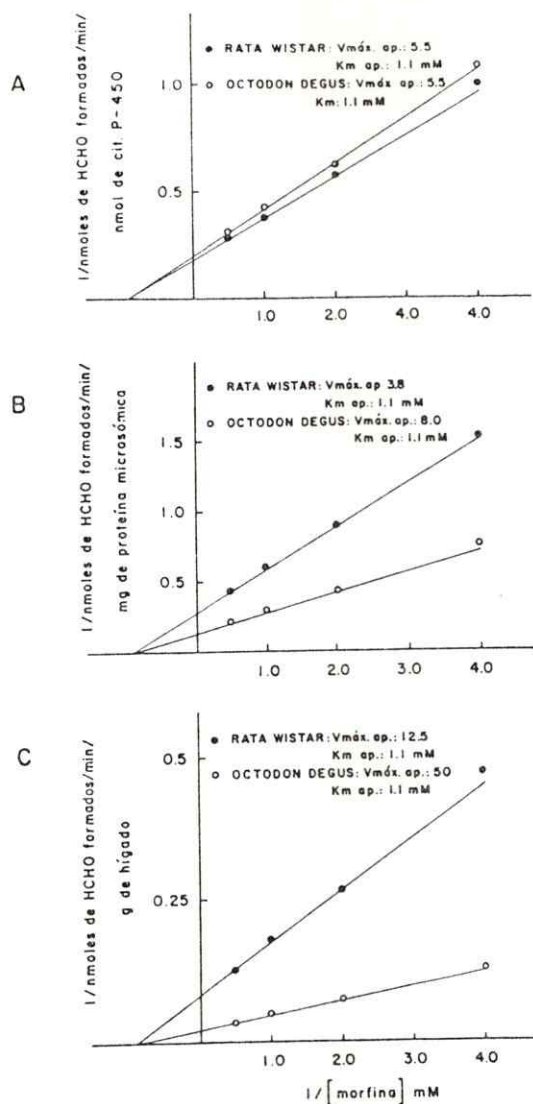


FIGURA 6. Gráficos de dobles recíprocos de la N-desmetilación de morfina en microsomas hepáticos de rata Wistar y *Octodon degus*.

- A. Velocidad de N-desmetilación expresada en nmoles de HCHO formados / min / nmol de citocromo P-450
- B. Velocidad de N-desmetilación expresada en nmoles de HCHO formados / min / mg de proteína microsómica.
- C. Velocidad de N-desmetilación expresada en nmoles de HCHO formados / min / g de hígado fresco

Las condiciones del ensayo enzimático y la técnica radiactiva utilizada para la determinación del HCHO formado, están descritas en Materiales y Métodos.

Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

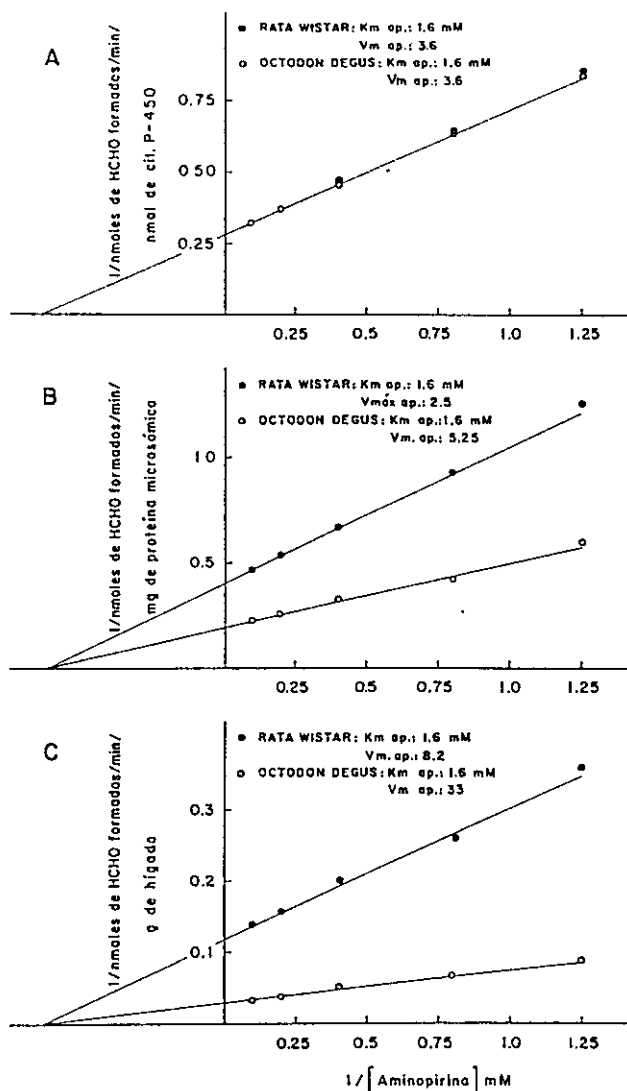


FIGURA 7. Gráficos de dobles recíprocos de la N-desmetilación de Aminopirina en microsomas hepáticos de rata Wistar y *Octodon degus*.

- A. Velocidad de N-desmetilación expresada en nmoles de HCHO formados / min / nmol de citocromo P-450.
- B. Velocidad de N-desmetilación expresada en nmoles de HCHO formados / min / mg de proteína microsómica.
- C. Velocidad de N-desmetilación expresada en nmoles de HCHO formados / min / g de hígado fresco.

Las condiciones del ensayo enzimático y la técnica utilizada para la determinación del HCHO formado, están descritas en Materiales y Métodos.

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos.

b. Hidroxilación de anilina. Los resultados se presentan en la Tabla VIII. Las velocidades de reacción expresadas en nmoles de p-aminofenol formado/min/nmol de citocromo P-450 no fueron significativamente diferentes en ambos roedores ($p > 0,3$). No obstante, al expresar las velocidades de reacción por mg de proteína microsómica y por gramo de hígado fresco, los valores fueron dos y cuatro veces superiores en el degu que en la rata, respectivamente.

c. Hidroxilación de naftaleno y O-desmetilación de p-nitroanisol. Los resultados de estas actividades enzimáticas se muestran en las Tablas IX y X. En ambas reacciones las velocidades de reacción fueron superiores en el degu que en la rata. Los valores fueron aproximadamente dos, cuatro y ocho veces superiores en el degu, según si las velocidades de reacción se expresaron en nmoles de producto formado/min/nmol de citocromo P-450, nmoles de producto formado/min/mg de proteína microsómica y nmoles de producto formado/min/g de hígado fresco, respectivamente.

TABLA VIII

HIDROXILACION DE ANILINA EN MICROSOMAS HEPATICOS DE RATA WISTAR
Y OCTODON DEGUS

	Rata Wistar	<i>Octodon</i> <i>degus</i>	p	Razón <i>O. degus</i> /R. Wistar
nmoles de p-amino-fenol formados/min/nmol de citocromo P-450	0,68 ± 0,080	0,69 ± 0,102	< 0,7	1,02
nmoles de p-amino-fenol formados/min/mg de pro- teína microsómica	0,47 ± 0,010	0,93 ± 0,015	< 0,001	1,98
nmoles de p-amino-fenol formados/min/g de hígado fresco	1,62 ± 0,020	6,4 ± 0,120	< 0,001	3,95

La actividad hidroxilante para anilina se determinó utilizando la técnica descrita en Materiales y Métodos.

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos ± la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

TABLA IX

HIDROXILACION DE NAFTALENO EN MICROSOMAS HEPATICOS DE RATA
WISTAR Y OCTODON DEGUS

	Rata Wistar	Octodon degus	p	Razón O. degus/R.Wistar
nmoles de α -naftol forma- dos/min/nol de citocromo P-450	3,10 \pm 0,201	6,10 \pm 0,250	< 0,001	1,97
nmoles de α -naftol forma- dos/min/mg de proteínas microsómica	2,09 \pm 0,120	8,60 \pm 0,102	< 0,001	4,10
nmoles de α -naftol forma- dos/min/g de hígado fres- co	7,13 \pm 0,22	55,61 \pm 0,67	< 0,001	7,80

La actividad hidroxilante para naftaleno, se determinó utilizando la técnica descrita en Materiales y Métodos.

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos \pm la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

TABLA X

O-DESMETILACION DE P-NITROANISOL EN MICROSOMAS HEPATICOS DE
RATA WISTAR Y OCTODON DEGUS

	Rata Wistar	<i>Octodon</i> <i>degus</i>	p	Razón <i>O. degus</i> /R.Wistar
nmoles de p-nitrofenol formados/min/nmol de citocromo P-450	0,77 ± 0,016	1,54 ± 0,151	< 0,01	2,0
nmoles de p-nitrofenol formados/min/mg de pro teína microsómica	0,53 ± 0,015	2,20 ± 0,025	< 0,01	4,15
nmoles de p-nitrofenol formados/min/g de híg ado fresco	1,78 ± 0,0115	14,5 ± 0,180	< 0,001	8,15

La actividad O-desmetilante para p-nitroanisol se determinó utilizando la técnica descrita en Materiales y Métodos.

Cada valor representa el promedio de 3 experimentos ± la desviación estándar de las observaciones de las muestras en relación a sus promedios.

En la Tabla Resumen se muestran las velocidades de todas las reacciones estudiadas, expresadas en concentración de producto formado/min/100 g de peso corporal. Las velocidades de estas reacciones, fueron superiores en el degu que en la rata, a excepción de la velocidad para conjugar 1,2-dicloro-4-nitrobenceno que fue igual en ambos roedores. Sin embargo, todas las eficiencias metabólicas calculadas fueron claramente superiores en el degu.

En general, podemos decir que el degu posee una mayor capacidad metabolizante de xenobióticos que la rata Wistar. La explicación puede residir en el mayor contenido de las enzimas responsables, como asimismo, en la mayor eficiencia metabólica de ellas en el degu en relación con la rata Wistar.

TABLA RESUMEN

CONJUGACIONES CON UDPGA: formación de glucurónidos

SUSTRATO	ANIMAL	V_{max} nmoles de producto/min/ 100 g de peso corporal	p	K_m (mM)	$\frac{V_{max}}{K_m}$
Morfina	RATA	46,78 ± 6,09	< 0,01	0,48	97,46
	DEGU	70,56 ± 4,86		0,45	156,80
p-nitrofenol	RATA	77,97 ± 10,16	< 0,01	0,30	259,90
	DEGU	117,03 ± 8,06		0,30	390,10

CONJUGACIONES CON GSH: formación de conjugados de glutatión

SUSTRATO	ANIMAL	V_{max} μ moles de producto/min/ 100 g de peso corporal	p	K_m (mM)	$\frac{V_{max}}{K_m}$
1-Cl-2,4-dinitro- benceno	RATA	276,21 ± 36,00	< 0,001	0,15	1841,40
	DEGU	7615,75 ± 524,62		0,37	20583,10
1,2-dicloro-4- nitrobenzeno	RATA	12,03 ± 1,56	< 0,05	1,70	7,08
	DEGU	10,03 ± 0,69		0,48	20,89

continúa

REACCIONES CATALIZADAS POR EL SISTEMA OXIDATIVO DEL CITOCROMO P-450

REACCION	ANIMAL	V_{max} nmoles de producto/min/ 100 g de peso corporal	p	K_m (mM)	$\frac{V_{max}}{K_m}$
N-desmetilación de morfina	RATA	55,69 ± 7,25	< 0,001	1,1	50,62
	DEGU	185,75 ± 12,79		1,1	168,86
N-desmetilación de aminopirina	RATA	36,53 ± 4,76	< 0,001	1,6	22,83
	DEGU	122,59 ± 8,44		1,6	76,61

OTRAS REACCIONES CATALIZADAS POR EL SISTEMA OXIDATIVO DEL CITOCROMO P-450

REACCION	SUSTRATO (mM)	ANIMAL	Velocidad de reacción		p
			nmoles de producto/min/ 100 g de peso corporal		
Hidroxilación de anilina	8,0	RATA	7,22 ± 0,94	< 0,001	
		DEGU	23,77 ± 1,64		
Hidroxilación de naftaleno	2,4	RATA	31,76 ± 4,14	< 0,001	
		DEGU	206,58 ± 14,23		
O-desmetilación de p-nitroanisol	5,0	RATA	7,93 1,03	< 0,001	
		DEGU	53,87 3,70		

Cada valor de velocidad representa el promedio de tres experimentos ± la desviación estándar de la muestra en relación a su promedio.

IV. DISCUSION

Numerosas investigaciones han demostrado que el fenómeno de tolerancia que presentan algunas especies a los fármacos, guarda relación con su capacidad para metabolizarlos (51). Las variaciones en el metabolismo de un fármaco afectan su vida media biológica. Ya que la vida media biológica representa el tiempo requerido para que la concentración de un fármaco en el plasma disminuya en un 50% después de la absorción y distribución, ella es un importante determinante de la duración e intensidad de los efectos biológicos que dicho fármaco produce en el organismo (1, 2). Los resultados de esta tesis muestran que la tolerancia natural a morfina (55) y la menor intensidad de los efectos farmacológicos producidos por pentobarbital en el degu en relación con la rata (Tabla I), posiblemente se deben a la mayor capacidad metabolizante de drogas del degu. Esto se refleja en la desaparición más rápida de la morfina de la sangre y el hígado y en los mayores niveles renales de metabolitos polares de morfina del degu en relación con la rata.

La mayor capacidad metabolizante de drogas del degu parece radican, principalmente, en la mayor actividad específica de las enzimas metabolizantes de drogas expresadas por gramo de hígado o por 100 g de peso corporal. Estos

resultados podrían indicar que la desaparición de la sangre no sólo de la morfina sino también del pentobarbital y de otros fármacos, son menores en el degu que en la rata. Por lo tanto, la duración e intensidad de los efectos biológicos de estos fármacos también serían menores en el degu (1, 2).

EFFECTOS FARMACOLÓGICOS PRODUCIDOS POR PENTOBARBITAL. Nuestros resultados indican que el degu presenta marcada resistencia a los efectos biológicos producidos por pentobarbital en relación con la rata (Tabla I). Este fármaco pierde su efecto en el organismo solamente al ser hidroxilado en su cadena alifática (17), reacción que es catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P-450. La actividad específica del citocromo P-450 expresada por g de hígado o por 100 g de peso corporal, es mayor en el degu que en la rata. Por otra parte, todas las actividades medidas catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P-450 fueron mayores en el degu que en la rata. Por lo tanto, es posible que la tolerancia natural a pentobarbital observada en el degu se deba a un metabolismo más acelerado de éste fármaco en éste roedor comparado con la rata.

METABOLISMO DE MORFINA. Los resultados encontrados indican que el metabolismo *in vivo* e *in vitro* de la morfina está significativamente aumentado en el *O. degus*, en comparación con

con la rata Wistar.

In vivo, esto se reflejó en la desaparición más rápida de la morfina no metabolizada de la sangre en el degu (Tabla II). Por otra parte, las razones entre las concentraciones renales de morfina no metabolizada y las de sus metabolitos polares fueron claramente inferiores en el degu que en la rata (Tabla IV). Estas razones en el hígado no fueron significativamente diferentes en ambos roedores (Tabla VI); sin embargo, es necesario hacer notar que las concentraciones de morfina y las de sus metabolitos polares en éste órgano, fueron menores en el degu que en la rata en los 3 tiempos estudiados (Tablas IV y V).

Estos resultados sugieren que la vida media biológica de la morfina es menor en el degu, y por lo tanto, se podría inferir que el metabolismo *in vivo* de este fármaco es más acelerado en este roedor que en la rata.

Las concentraciones de morfina en el cerebro (órgano en el cual se localiza el sitio de acción de los opioides) fueron significativamente inferiores en el degu, en los 3 tiempos estudiados (Tabla III). Estos resultados podrían indicar una menor disponibilidad de morfina para pasar al cerebro, lo que apoya la idea que la vida media de la morfina es menor en el *O. degus* que en la rata Wistar. No obstante, es posible que exista también un problema de barrera hematoencefálica en el degu, que limite la entrada de morfina

al cerebro.

La conjugación de morfina con UDPGA y su N-desmetilación oxidativa, medida en microsomas hepáticos, mostraron que las K_m aparentes eran iguales en ambos roedores. En cambio, las $V_{máx}$ aparentes expresadas en nmoles de producto formado/min/g de hígado fresco fueron respectivamente 2 y 4 veces superiores en el degu que en la rata (Figuras 1, panel B y 2 panel C). Por otra parte, los contenidos de proteína microsómica y citocromo P-450 por gramo de hígado fueron 2 y 4 veces superiores en el degu que en la rata, respectivamente (Tabla VII). Diferencias en el contenido de citocromo P-450 son comunes en roedores, pero no existen descritas en la literatura diferencias en el contenido de proteína microsómica por gramo de hígado de estos mamíferos (77).

Estos resultados sugieren que la mayor velocidad de los microsomas hepáticos del degu para metabolizar morfina, se debería al mayor contenido hepático de las enzimas que participan mayoritariamente en su biotransformación. Estas diferencias permiten explicar en parte, el fenómeno de tolerancia a morfina observado en este roedor en relación con la rata (55).

Numerosos estudios han demostrado que la glucuronilación es la vía principal a través de la cual la morfina es metabolizada *in vivo*, en la mayoría de los mamíferos (30, 56). La N-desmetilación oxidativa es la segunda vía en importancia

(56). Nuestros resultados no nos permiten señalar si ocurre lo mismo en el degu, ya que la actividad N-desmetilante del citocromo P-450 por gramo de hígado para la morfina, es el doble de la actividad UDP-glucuroniltransferásica en este roedor. Esta interrogante esperamos que tendrá respuesta con nuevos experimentos que ya se han iniciado y que tienen por objeto cuantificar los metabolitos producidos *in vivo*, provenientes de ambas vías metabólicas.

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE CONJUGACION

a. Conjugación de p-nitrofenol con UDPGA. Los resultados de la conjugación de p-nitrofenol con UDPGA fueron similares a los obtenidos de esta reacción con morfina como sustrato. Las K_m aparentes fueron iguales en ambos roedores y la V_{max} aparente expresada en nmoles de glucurónido formado/min/g de hígado fresco fue dos veces superior en el degu que en la rata (Figura 3, panel B). Esto se debe, principalmente a su mayor contenido de proteína microsómica por gramo de hígado (Tabla VII), entre las cuales se encuentran las UDP-glucuroniltransferasas. Sin embargo, es posible que la proporción relativa entre las distintas UDP-glucuroniltransferasas sea diferente en ambos roedores, o que el degu carezca de alguna actividad específica, como es el caso del gato que es incapaz de formar glucurónidos de fenoles de bajo peso molecular (78).

b. Conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno con GSH. La K_m aparente para la conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno con GSH fue 2,5 veces superior en el degu que en la rata (Figuras 3 y 4) y para el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno, 3,5 veces superior en la rata que en el degu (Figura 5). Los valores obtenidos representan las K_m promedios de las distintas glutatión-transferasas involucradas en la biotransformación de estos sustratos. Las diferencias entre ambos roedores podrían deberse a diferencias en la proporción relativa de esas enzimas que poseen distintas especificidades.

La V_{max} aparente para la conjugación de 1-Cl-2,4-dinitrobenceno expresada en μ moles de conjugado formado/min/g de hígado fresco fue 33 veces superior en el degu que en la rata (Figuras 3 y 4, paneles B). En cambio, las V_{max} aparentes para la conjugación del sustrato 1,2-dicloro-4-nitrobenceno expresadas en nmoles de conjugado formado/min/g de hígado fresco, no fueron significativamente diferentes en ambos roedores (Figura 5, panel B). Diversos estudios han demostrado que las glutatión-transferasas representan el 10% de la proteína citosólica del hígado de la rata. De este porcentaje, el 5% corresponde a la transferasa B (42). Por otra parte, estudios realizados con glutatión-transferasas purificadas han demostrado que las glutatión-transferasas más activas para el sustrato 1-Cl-2,4-dinitrobenceno son la A y la

B, y para el sustrato 1,2-dicloro-4-nitrobenceno, la A y la C (75, 76). Es necesario hacer notar también que el 1-Cl-2,4-dinitrobenceno es mejor sustrato para las glutatión-transferasas que el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (42).

Las diferencias entre ambos roedores pueden atribuirse en parte, a la mayor actividad específica por gramo de hígado de las glutatión-transferasas citosólicas existentes en el degu en relación con la rata. Además, es posible que existan diferencias en la proporción relativa, como en la actividad catalítica de las distintas glutatión-transferasas responsables de ambos roedores, que no fueron investigadas.

REACCIONES CATALIZADAS POR EL SISTEMA OXIDATIVO DE CITOCROMO P-450

Las reacciones catalizadas por el sistema oxidativo mirosómico del citocromo P-450, las podemos dividir en dos grupos para su análisis. Al primer grupo pertenecen la N-desmetilación de morfina y aminopirina y la hidroxilación de anilina. En estas reacciones no se observaron diferencias en las velocidades de reacción de ambos roedores, cuando ellas se expresaron en nmoles de producto formado/min/nmol de citocromo P-450.

El segundo grupo de reacciones lo constituyen la hidroxilación de naftaleno y la O-desmetilación de p-nitroanisol. En estas reacciones, las velocidades de reacción

expresadas de la misma forma anterior fueron dos veces superiores en el degu que en la rata.

Al expresar las velocidades de reacción en nmoles de producto/min/mg de proteína microsómica y en nmoles de producto/min/g de hígado fresco, las diferencias en favor del degu, fueron de dos y cuatro veces para el primer grupo de reacciones y de cuatro y ocho veces para el segundo grupo, respectivamente. Esto se debe a que los contenidos de citocromo P-450 por mg de proteína microsómica y por gramo de hígado fresco fueron dos y cuatro veces superiores en el degu que en la rata, respectivamente (Tabla VII).

La mayor capacidad para oxidar sustratos del degu puede ser explicada, por el mayor contenido de citocromo P-450 hepático existente en este roedor; pero además, es posible que existan diferencias en las actividades catalíticas de los distintos citocromo P-450 y en la proporción relativa de ellos en ambos roedores. Los resultados de las reacciones de hidroxilación de naftaleno y O-desmetilación de p-nitroanisol, apoyan estos últimos puntos de vista.

En general, podemos decir que existe una mayor capacidad metabolizante en el degu que en la rata. La explicación de esta diferencia puede residir en el mayor contenido hepático y diferente eficiencia metabólica de las enzimas metabolizantes de drogas en el degu (Tabla Resumen). Estos resultados, permiten sugerir, que el metabolismo *in vivo* de

una gran variedad de fármacos es más acelerado en el degu que en la rata. Esto determinaría que la vida media biológica de ellos fuera menor en el degu y por lo tanto, también sus efectos farmacológicos.

Estos resultados pueden explicar, a lo menos en parte, el fenómeno de tolerancia a la morfina y al pentobarbital observado en el degu en relación con la rata.

Como los fármacos son generalmente biotransformados a través de más de una vía metabólica, pueden existir variaciones en la extensión relativa de las distintas reacciones involucradas en sus procesos de biotransformación (54). Es posible que existan diferencias en este sentido entre el degu y la rata, interrogante que se planteó en el caso de la morfina.

Por otra parte, ya que las actividades específicas de las enzimas metabolizantes de drogas estudiadas, expresadas por gramo de hígado y por 100 g de peso corporal, son mayores en el degu que en la rata, sería interesante comparar la capacidad de ser inducidas por xenobióticos en el degu y en la rata. Para ello se ha pensado estudiar el efecto de inductores tales como fenobarbital, metirapona y nafto-flavona sobre las actividades enzimáticas de conjugación con UDPGA y GSH y las actividades catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P-450.

BIBLIOGRAFIA

1. Jacoby, W.B. (1980). Detoxication Enzymes. In: Enzymatic Basis of Detoxication. (W.B. Jacoby, ed.) Vol. I, pp. 1-6. Academic Press. New York.
2. Chakrabarti, S., and Brodeur, J. (1981). Plasma disappearance and biliary excretion of bromosulfophthalein in styrene-treated and styrene oxide-treated rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 8, 609-617.
3. Ybhanesson, I., and Milthers, K. (1962). Morphine and Normorphine in the brain of rats. A comparison and subcutaneous, intraperitoneal and intravenous administration. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 19, 241-246.
4. Marcucci, F., Mussini, E., Fanelli, R. and Garattini, S. (1970). Species differences in diazepam metabolism. I. Metabolism of Diazepam metabolites. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1847-1851.
5. Wislocki, P.G., Miwa, G.T. and Lu, A.Y.H. (1980). Reactions catalyzed by the cytochrome P-450 system. In: Enzymatic basis of detoxication (W.B. Jacoby, ed.) Vol. I, pp. 135-182. Academic Press. New York.

6. Daly, J.W., Jerina, D.M. and Witkop, B. (1972). Arene oxides and the NIH shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds. *Experientia* 28, 1129-1149.
7. Wislocki, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernández, O., Jerina, D.M., and Conney, A.H. (1976). High mutagenicity and toxicity of a diol-epoxide derived from benzo [a] pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 1006-1012.
8. Marquardt, H., Baker, S., Grover, P.L., and Sims, P. (1977). Malignant transformation and mutagenesis in mammalian cells induced by vicinal diol-epoxides derived from benzo a pyrene. *Cancer Lett.* 3, 31-36.
9. King, H.W.S., Osborne, M.R., Beland, F.A., Harvey, R.G., and Brookes, P. (1976). (\pm)-7 α ,8 β -dihydroxy-9 β , 10 β -epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [a] pyrene is an intermediate in the metabolism and binding to DNA of benzo [a] pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73, 2679-2681.
10. Pezzuto, J.M., Lea, M.A., and Yang, C.S. (1978). Binding of metabolically activated benzo[a] pyrene to DNA and histonas of rat liver, lung and regenerating liver. *Life Sci.* 22, 105-110.

11. Mac Mahom, R.E. (1966). Microsomal dealkylation of drugs. Substrate specificity and mechanism. *J. Pharm. Sci.* 55, 457-466.
12. Pert, C.B., Snyder, S.H. (1973). Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014.
13. Hughes, J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88, 295-308.
14. Terrenius, L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32, 317-320.
15. Beckett, A.H., Casy, F. and Harper, N.J. (1956). Analgesics and their antagonists: Some steric and chemical considerations. Part III: The influence of the basic group on the biological response. *J. Pharm. Pharmacol.* 8, 874-883.
16. Valerino, D.M., Vessel, E.S., Johnson, A.O., and Aurori, K.C. (1973). Effects of various centrally active drugs on hepatic microsomal enzymes a comparative study. *Drug Metab. Dispos.* 1, 669-678.
17. Lu, A.Y.H., Junk, K.W., and Coon, M.J. (1969). Resolution of the cytochrome P-450 containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. Biol. Chem.* 244, 3714-3721.

18. Lu, A.Y.H., and West, S.B. (1979). Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450. *Pharmacol. Rev.* 31, 277-295.
19. Gelboin, H.W. (1980). Benzo [a] pyrene metabolism, activation and carcinogenesis. Role and Regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107-1166.
20. Lu, A.Y.H., and Levin, W. (1974). The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochem. Biophys. Acta.* 334, 205-240.
21. Nebert, D.W., and Gelboin, H.V. (1969). The *in vivo* and *in vitro* induction of arylhydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 76-89.
22. Kandwala, A.S., and Kasper, C.B. (1973). Preferential induction of arylhydrocarbon hydroxylase activity in rat liver nuclear envelope by 3-methyl cholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1241-1246.
23. Gelboin, H.V. (1967). Carcinogens, enzyme induction and gene action. *Adv. Cancer Res.* 10, 1-81.
24. Conney, A.H., and Burns, J.J. (1972). Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs. *Science* 178, 576-586.
25. Conney, A.H. (1967). Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19, 317-366.

26. Leibman, K.C. (1969). Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations. *Mol. Pharmacol.* 5, 1-9.
27. Haugen, D.A., Vander Hoeven, F.A., and Coon, M.J. (1975). Purified liver microsomal cytochrome P-450. Separation and characterization of multiple forms. *J. Biol. Chem.* 250, 3567-3570.
28. Kawalek, J.C., and Lu, A.Y.H. (1975). Reconstituted liver microsomal system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. VII. Different catalytic activities of rabbit and rat cytochromes P-448. *Mol. Pharmacol.* 11, 201-210.
29. Smith, R.L., Williams, R.T. (1966). Implication of the conjugation of drugs and other exogenous compounds. In: *Glucuronic Acid* (G.J. Dutton, ed.), pp. 457-491. Academic Press. New York.
30. Dutton, G.J. (1978). Developmental aspects of drug conjugation with special reference to glucuronidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 17-35.
31. Dutton, G.J. (1971). Glucuronide forming enzymes. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. (B. Brodie, J.R. Gillette, H.S. Ackerman, eds.) Vol. 28, pp. 378-400.
32. Dutton, G.J. (1966). The biosynthesis of glucuronides. In: *Glucuronic Acid* (G.J. Dutton, ed.) pp. 185-299. Academic Press. New York.

33. Fry, D.J., and Wishart, G.J. (1976). Apparent induction by phenobarbital of uridine diphosphate glucuronyltransferase activity in nuclear envelopes of embryonic-chick liver. *Biochem. Soc. Trans.* 4, 265-266.
34. Bock, K.W., Fröhling, W., Remmer, H., and Rexer, B. (1973). Effect of phenobarbital and 3-methyl-colanthrene on substrate specificity of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta* 327, 46-56.
35. Sánchez, E., and Tephly, T.R. (1974). Morphine Metabolism. I. Evidence for separate enzymes in the glucuronidation of morphine and p-nitrophenol by rat hepatic microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 2, 247-253.
36. Del Villar, E., Sánchez, E. and Tephly, T.R. (1977). Morphine Metabolism. V. Isolation of separate glucuronyltransferase activities for morphine and p-nitrophenol from rabbit liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* 5, 273-278.
37. Gorski, J.P., and Kasper, C.B. (1977). Purification and properties of microsomal UDP-glucuronosyl-transferase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 252, 1336-1343.
38. Burchell, B. (1978). Substrate specificity and properties of uridine diphosphate glucuronyltransferase purified to apparent homogeneity from phenobarbital treated rat liver. *Biochem. J.* 173, 749-757.

39. Tuckey, R.H., Billings, R.E., Autor, A.P., and Tephly, T. R. (1979). Phospholipid-dependence of oestrone UDP-glucuronyltransferase and p-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase. *Biochem. J.* 179, 59-65.
40. Gorski, J.P., and Kasper, C.B. (1978). UDP-glucuronyltransferase: Phospholipid-dependence and properties of the reconstituted apoenzyme. *Biochemistry* 17, 4600-4605.
41. Chasseaud, L.F. (1976). Conjugation with glutathione and mercapturic acid excretion. In: "Glutathione: Metabolism and Function". (I.M. Arias and W.B. Jacoby, eds.) pp. 77-114. Raven. New York.
42. Jacoby, W.B. (1978). The glutathione-S-transferases: A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* 46, 383-414.
43. Lamoureux, G.L., and Frear, D.S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants: *In vitro* enzyme studies. *A.C.S. Symp. Ser.* 97, 77-128.
44. Grover, P.L., and Sims, P. (1969). Conjugation with Glutathione. I. Distribution of glutathione-S-transferase in vertebrate species. *Biochem. J.* 90, 603-606.
45. Wahlländer, A., Soboll, S., and Sies, H. (1979). Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett.* 97, 138-140.

46. Fjellstedt, T.A., Allen, R.H. Duncan, B.K., and Jacoby, W.B. (1973). Enzymatic conjugation of epoxides with glutathione. *J. Biol. Chem.* 248, 3702-3707.
47. Hayakawa, T., Lemahieu, R.A., and Udenfriend, S. (1974). Studies on glutathione-S-arene oxide transferase: A sensitive assay and partial purification of the enzyme from sheep liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 223-230.
48. Morey, K.S., and Litwack, G. (1969). Isolation and properties of cortisol metabolite binding proteins of rat liver cytosol. *Biochemistry.* 8, 4812-4821.
49. Ketterer, B., Ross-Mandell, P., and Whitehead, J.K. (1967). The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethylaminoazobenzene. *Biochem. J.* 103, 316-324.
50. Wolkoff, A.W., Keltey, J.N., Waggoner, J.G., Berk, P.D., and Jacoby, W.B. (1978). Hepatic accumulation and intracellular binding of conjugated bilirubin. *J. Clin. Invest.* 61, 142-149.
51. Williams, R.T. (1974). Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. The 8th CIBA Medal Lecture. *Biochem. Soc. Trans.* 2, 359-377.
52. Dixon, P.A.F., Caldwell, J., and Smith, R.L. (1977). Studies on the metabolism of arylacetic acids. 3. The metabolic fate of diphenylacetic acid and its variations with species and dose. *Xenobiotica.* 7, 717-726.

53. James, M.P., Smith, R.L., William, R.T., and Reidenberg, M. (1972). The conjugation of phenyl-acetic acid in man, subhuman primates and some non-primate species. Proc. Roy. Soc. London Ser. B182, 25-35.
54. Caldwell, J. (1976). The metabolism of amphetamines in mammals. Drug Metab. Rev. 4, 219-280.
55. Villanueva, L., Pelissier, T., and Paeile, C. (1980). Resistance to morphine effects of *Octodon degus* a chilean caviomorph. I.R.C.S. Medical Science. 8, 30.
56. Way, O.E., and Adler, T.R. (1961). The biological disposition of morphine and its surrogates-1. Bull. Wld. Hlth. Org. 26, 227-262.
57. Cochin, J. and Axelrod, J. (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. J. Pharmacol. 125, 105-110.
58. Del Villar, E., Sánchez, E., Letelier, M.E., and Vega, P. (1981). Differential inhibition by Diazepam and Nitrazepam of UDP-glucuronyltransferase activities in rats. Res. Commun. Chem. Path. 33, 433-448.
59. Sánchez, E., Cirio, R., Letelier, M.E., Vega, P., and Del Villar, E. (1981). Diazepam increases blood levels of morphine in rats. I.R.C.S. Medical Science. 9, 37.

60. Yeh, S.Y. and Woods, L.A. (1970). Determination of radioactive-labeled codeine, morphine, dehydromorphine, and their metabolites in biological materials. *J. Pharm. Sci.* 59, 380-384.
61. Del Villar, E., Sánchez, E., and Tephly, T.R. (1974). Morphine Metabolism. II. Studies on Morphine glucuronyltransferase activity in intestinal microsomes of rats. *Drug Metab. Disp.* 2, 370-374.
62. Liu, S.J., Huang, C.L., and Waters, I.W. (1975). Interactions of tricyclic antidepressants and barbiturates in barbiturate-tolerant and nontolerant rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194, 285-295.
63. Liu, S.J., and Wang, R.I.H. (1975). Increased analgesia and alterations in distribution and metabolism of methadone by Desipramine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 94-104.
64. Baron, J., and Tephly, T.R. (1970). Further studies on the relationship of the stimulatory effects of phenobarbital and 3,4-benzpyrene on hepatic heme synthesis to their effects on hepatic microsomal drug oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 410-420.
65. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

66. Omura, T., and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
67. Omura, T., and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385.
68. Slein, M., Cori, G., Cori, C. (1950). A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 763-780.
69. Nash, T. (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55, 416-421.
70. Booth, I., and Boyland, E. (1958). Metabolism of polycyclic compounds: Enzymic hydroxylation of naphthalene by rat liver microsomes. *Biochem. J.* 70, 681-688.
71. Imai, Y., Ito, A., and Sato, R. (1966). Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* 60, 417-428.
72. Isselbacher, K.J., Chrabas, M.F., and Quinn, R. (1962). The solubilization and partial purification of a glucuronyl transferase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 3033-3036.
73. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jacoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 349, 7130-7139.

74. Repetto, Y., Morello, A. (1981). Detoxification Mechanisms in *Echinococcus granulosus*: Glutathione-S-transferase. I.R.C.S. Medical Science. 9, 698.
75. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jacoby, W.B. (1976). Glutathione-S-transferase AA from rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 175, 710-716.
76. Pabst, M.J., Habig, W.H., and Jacoby, W.B. (1974). Glutathione-S-transferase A: a novel kinetic mechanism in which the mayor reaction pathway depends on substrate concentration. J. Biol. Chem. 247, 7140-7148.
77. Kato, R., Onoda, K., and Takanaka, A. (1971). Species differences in the effect of morphine administration or adrenalectomy on the substrate interactions with cytochrome P-450 and drug oxidations by liver microsomes. Biochem. Pharmacol. 20, 1093-1099.
78. Caldwell, J. (1980). Comparative aspects of detoxication in mammals. In: "Enzymatic basis of detoxication". (Jacoby, W.B., ed.) Vol. 1, pp. 85-114. Academic Press. New York.