

# A RELAÇÃO DO USO CRÔNICO DE FENOBARBITAL COM ÁREAS POTENCIALMENTE PRÉ-NEOPLÁSICAS EM FÍGADO DE RATOS

Helena Terezinha Hubert SILVA e Antonio Atalábio HARTMANN

**RESUMO** – *Racional* - O fenobarbital é utilizado em modelos experimentais não só por ser um importante agente promotor da carcinogênese em fígado de ratos, como também por ser não-geotóxico, órgão-específico e dose-dependente. *Objetivos* - Avaliar o efeito da administração diária de fenobarbital em ratos, desde o nascimento até os 24 meses de idade, na ausência concomitante de administração de agentes químicos iniciadores da carcinogênese. *Material e Métodos* - Um grupo controle de ratos machos Wistar recebeu dieta básica e a esta, do outro grupo, foi adicionado diariamente, fenobarbital a 0,05%, durante 24 meses. Cortes dos lobos médio e direito do fígado foram submetidos ao processamento histológico e corados pela hematoxilina-eosina e coloração imunoistoquímica para a glutatona S-transferase forma placentária. *Resultados* - Detectaram-se áreas glutatona S-transferase forma placentária positivas em ambos os grupos e as imagens foram analisadas quanto ao número e à extensão da superfície, mediante análise de imagem por histomorfometria. *Conclusão* - O uso crônico de fenobarbital não alterou o número de áreas glutatona S-transferase forma placentária positivas, havendo, no entanto, aumento no tamanho médio de áreas glutatona S-transferase forma placentária positivas, com conseqüente aumento da superfície glutatona S-transferase forma placentária positiva, sendo este aumento provavelmente relacionado a maior capacidade evolutiva dessas lesões e possível irreversibilidade das mesmas.

**DESCRITORES** – Fenobarbital. Neoplasias hepáticas experimentais. Ratos.

## INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo dinâmico que envolve os estágios de iniciação, promoção e progressão e nesse processo as alterações gênicas são acompanhadas de modificações no fenótipo das células<sup>(5, 7, 8, 9, 10, 21, 23)</sup>.

Agentes químicos iniciadores induzem alterações celulares na interação com o ácido desoxirribonucléico (DNA) da célula-alvo, o que leva a uma alteração celular irreversível por meio de ligações covalentes, distorção ou quebra da molécula tornando, assim, a célula iniciada. Essa célula tem seu genoma alterado, mas sem expressão fenotípica. A eficiência da iniciação depende da capacidade da célula de se dividir após a interação com o agente iniciador. Assim, a célula permanece, geralmente, em estado de latência.

Agentes químicos promotores proporcionam a expressão de alterações neoplásicas em células iniciadas, mediante a

interação com receptores celulares específicos, interferindo na transdução e apoptose. Eles estimulam a proliferação celular e não alteram o DNA. Os agentes promotores são abundantes no meio ambiente, sua natureza química inclui polipeptídios, proteínas circulantes, hormônios esteróides, ésteres de forbol, fenóis e drogas como o fenobarbital.

O envelhecimento, a dieta, fatores hormonais, ambientais e tipo celular são fatores moduladores da atuação dos agentes promotores, bem como do estágio da promoção<sup>(3, 5)</sup>.

O fenobarbital é um barbitúrico de ação prolongada, de administração oral, parenteral e retal, indicado como hipnótico ou sedativo no tratamento de insônia, sedação pré-operatória, manuseio de emergências convulsivas tônico-clônicas generalizadas e focais. Esse fármaco mostra-se um importante agente promotor hepatocarcinogênico em fígado de ratos, além de ser não-geotóxico, órgão-específico e dose-dependente, na presença de elementos indutores

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência: Dra. Helena Terezinha Hubert Silva – Rua Santa Sofia, 510 – Bairro Ideal – 93336-200 – Novo Hamburgo, RS. E-mail: hubertsilva@brturbo.com

iniciadores da carcinogênese, administrados previamente, embora o mecanismo de sua ação ainda não esteja bem elucidado<sup>(6, 7, 8, 9, 13, 15, 16, 18, 19, 30)</sup>.

Postula-se que a ação de promoção relaciona-se com a ruptura das junções “gap” intercelulares com o que as células estão liberadas do controle de divisão, permitindo uma proliferação celular descontrolada. Outras teorias apontam uma resistência seletiva das células iniciadas à ação de compostos citotóxicos inibidores da mitose, bem como a indução de crescimento adaptativo em resposta às mudanças químicas e à capacidade de aumento do volume hepático ocupado nos focos hepáticos alterados. A administração crônica de barbitúricos causa aumento importante no conteúdo protéico e lipídico do retículo endoplasmático liso hepatocitário, bem como na atividade da glucoronil-transferase e oxidases contendo o citocromo P450 (família de enzimas de maior poder de catalisação nas reações de biotransformação de drogas). O efeito indutor dessas enzimas resulta em aumento da taxa de metabolismo de drogas exógenas e substâncias endógenas<sup>(30)</sup>.

Os modelos animais utilizam os estudos em ratos como forma de estimativa qualitativa e quantitativa na demonstração *in vivo* do estabelecimento do risco de câncer em humanos, mediante experimentos em que são tratados com agentes iniciadores, promotores e progressores, envolvendo protocolos de iniciação-promoção-progressão evidenciado pela relação entre as alterações pré-neoplásicas e neoplásicas hepáticas e a idade do animal na fase de iniciação<sup>(5, 7, 22)</sup>.

As alterações fenotípicas podem ser estudadas utilizando-se marcadores para a detecção das lesões ocorridas nesse processo destacando-se entre eles o estudo imunistoquímico com glutathione S-transferase forma placentária (GSTP). Em ratos idosos, após a administração de agentes hepatocarcinogênicos, detectaram-se hepatócitos individualmente aberrantes, expressando GSTP e sugerindo que essas células constituem uma população hepatocitária iniciada<sup>(5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 20, 21, 24, 25, 28)</sup>.

Não se conhece a ação da administração crônica do fenobarbital em ratos com mais de 24 meses de vida (ratos velhos), desde o nascimento, na ausência de administração de agentes iniciadores, embora existam estudos até o oitavo mês de vida<sup>(9, 16)</sup>. Entretanto, é conhecida a ação do fenobarbital administrado como indutor da carcinogênese em ratos de 12 e 36 meses de idade<sup>(4, 29)</sup>.

A análise qualitativa, por meio da expressão de áreas GSTP positivas e de outras alterações fenotípicas, é possível mediante estudos morfométricos em que podem ser quantificadas as áreas de interesse no estudo do processo da carcinogênese<sup>(1)</sup>.

O presente estudo objetiva verificar a ação do uso de fenobarbital sobre o fígado de ratos velhos (24 meses de idade), ministrado diária e cronicamente desde o nascimento, sem a administração concomitante de agentes químicos iniciadores da carcinogênese.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o experimento, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade de Munique, Alemanha, protocolo MT 95, usaram-se ratos machos Wistar (Wistar AF/Hann) do biotério do Instituto de Patologia da Universidade de Munique, mantidos em biotério climatizado, sob ritmo circadiano, abrigados em gaiolas de cinco roedores.

A administração de 20 mg/kg de peso de fenobarbital a 0,05%, ocorreu desde o nascimento até os 24 meses de idade, adicionado à dieta básica diária quando, então, os animais foram submetidos a hepatectomia parcial de dois terços do volume total hepático, conforme protocolo<sup>(2, 8, 12, 18, 21)</sup>.

Os ratos foram divididos em dois diferentes grupos, a saber:

1. grupo controle: constituído por nove animais, que receberam dieta padronizada (Altromin-R, Lage, BRD) e água à vontade, depois submetidos a hepatectomia parcial de dois terços após 24 meses de administração diária de dieta básica;
2. grupo tratado: constituído por 10 animais, que receberam dieta padronizada (Altromin-R, Lage, BRD), a qual se adicionou fenobarbital e água à vontade. Estes animais foram submetidos a hepatectomia parcial de dois terços após 24 meses de administração diária de dieta básica, acrescida de fenobarbital.

O grupo tratado, decorridos 24 meses, foi submetido a hepatectomia parcial de dois terços<sup>(12)</sup>, sendo retirados o lobo médio e o lobo direito, que foram submetidos a exame histológico padronizado pela coloração de hematoxilina-eosina (H-E) e imunológico pela técnica imunistoquímica do complexo avidina-biotina-peroxidase com anticorpo anti-GSTP<sup>(7, 8, 9, 11, 18, 24)</sup>. Para posterior estudo do fígado, os animais foram mantidos vivos, com dieta normal, até o momento de sua morte espontânea.

Consideraram-se áreas GSTP positivas aquelas que estivessem constituídas por cinco ou mais células com citoplasma e/ou núcleos evidentemente corados; não se levaram em conta as que somente apresentassem núcleos ou citoplasma corados, as que estivessem fracamente coradas e em que não se podia determinar o contorno celular, bem como os hepatócitos isoladamente marcados<sup>(27)</sup> (Figura 1).

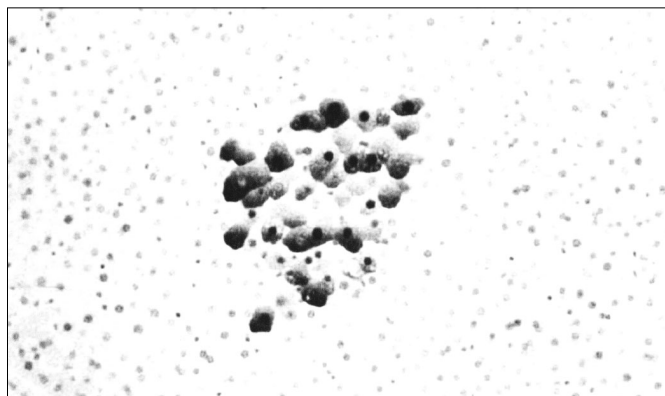


FIGURA 1 – Fígado de animal tratado com fenobarbital, revelando área GSTP positiva com citoplasma e/ou núcleos evidentemente corados (IHQ para GSTP, 200×, no original)

A análise quantitativa das áreas GSTP positivas ocorreu de forma integrada, utilizando-se microscópio da marca Olympus BX40, acoplado a uma câmera de vídeo JVC, e o programa computadorizado de Sistema de Análise de Imagem LEICA Q 500 MC.

Para os dados de número de áreas GSTP positivas e suas respectivas áreas, foram calculados a mediana e os valores mínimo e máximo, uma vez que estas variáveis apresentaram assimetria. A

comparação entre os grupos foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney e confirmada pelo teste *t* de Student, realizado nos dados submetidos a transformação logarítmica. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

Os cortes examinados sob coloração de H-E não revelaram alterações fenotípicas isoladas ou focais.

As áreas GSTP positivas caracterizaram-se histologicamente por serem múltiplas áreas de coloração amarronzada no parênquima, envolvendo hepatócitos isolados ou agrupamentos focais com tamanhos variados e dispersamente distribuídos pelos cortes histológicos, assim caracterizando áreas onde era evidente a positividade da GSTP em núcleo e citoplasma, havendo áreas com contornos bem e áreas com contornos mal definidos (Tabela 1).

**TABELA 1** – Comparação dos grupos controle (sem fenobarbital) e tratado (com fenobarbital) no que se refere às áreas GSTP positivas

Variável	Grupo controle (n = 9)	Grupo tratado (n = 10)	P
NA, n°	9,0 (2 a 17)	4,5 (1 a 24)	0,60
TTAE, mm <sup>2</sup>	0,2 (0,05 a 0,4)	0,4 (0,01 a 24)	0,60
TMAE, mm <sup>2</sup>	0,03 (0,02 a 0,08)	0,05 (0,01 a 0,16)	0,18

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo)

NA: n° de áreas GSTP positivas

TTAE: tamanho total das áreas GSTP positivas em mm<sup>2</sup>

TMAE: tamanho médio das áreas GSTP positivas em mm<sup>2</sup>

P: significância estatística obtida pelo teste U de Mann-Whitney.

Ao se compararem os dois grupos, pôde-se observar que o número mediano de áreas GSTP positivas, apesar de ser nominalmente maior no grupo controle, não apresentou significância estatística. Além disso, tanto a área total GSTP positiva (TTAE), bem como o tamanho médio das áreas GSTP positivas (TMAE) não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Assim, os dados deste estudo revelam uma semelhança nas áreas GSTP positivas observadas entre o grupo de ratos controle e o grupo de ratos tratados com fenobarbital.

## DISCUSSÃO

Os aspectos da promoção da carcinogênese química revelaram a presença de áreas focais características pré-neoplásicas tanto em ratos não tratados com fenobarbital, quanto em ratos tratados com essa droga desde o nascimento. Os ratos controle estiveram, por maior tempo, expostos à ação ambiental de possíveis agentes cancerígenos, o que poderia ter contribuído para o desenvolvimento de áreas focais iniciadas, de forma espontânea, positivas para o GSTP. Essas áreas, quando tratadas com fenobarbital, tendem a desenvolver-se e a tornarem-se áreas pré-neoplásicas focais, de características irreversíveis.

A administração crônica de fenobarbital causa inibição da mitose no hepatócito, porém sem qualquer citotoxicidade<sup>(8,9)</sup>. É possível que a ocorrência espontânea de células iniciadas também seja similar à ação de agentes promotores<sup>(7,8)</sup>.

Áreas pré-neoplásicas, expressando GSTP, podem ser encontradas em ratos não tratados com cancerígenos e o número de lesões aumenta com a idade. Ratos velhos são mais suscetíveis

à ação carcinogênica da administração de agentes promotores<sup>(8,17)</sup>, embora haja contradição entre os autores<sup>(11)</sup>. Em trabalhos prévios, após utilização de protocolo de iniciação da carcinogênese, a atividade de GSTP é significativamente aumentada em fígado de ratos púberes, assim como em adultos, quando comparados com animais controle não submetidos a processo de iniciação<sup>(10)</sup>. Focos espontâneos aumentam com a idade e são mais visíveis em ratos machos<sup>(20)</sup>. De igual importância é a ocorrência de células não iniciadas de forma espontânea como resposta a agentes promotores em condições semelhantes<sup>(7)</sup>.

A perda de células iniciadas, na ausência de agentes promotores, pode resultar na remoção dessas células pela apoptose<sup>(7,9,13)</sup>. Tanto a apoptose, quanto a proliferação celular estão relacionadas ao desenvolvimento de focos pré-neoplásicos e a inibição da apoptose pela ação de agentes promotores, incluindo o fenobarbital, sugerem um papel crítico na promoção tumoral<sup>(26)</sup>. A ocorrência de neoplasias espontâneas em fígado de rato é muito rara e poderia depender da participação de um agente promotor como o fenobarbital. Estudos recentes revelam a estimulação do fator de crescimento TGF-beta em experimentos com fenobarbital<sup>(14)</sup>.

A expressão de GSTP pode indicar hepatócitos iniciados na carcinogênese de fígado de ratos. Áreas pré-neoplásicas desenvolvem-se a partir de clone de uma única célula iniciada<sup>(7,9,20)</sup>. Campos de hepatócitos isolados, expressando GSTP, têm sido detectados em ratos idosos, na administração de agentes carcinogênicos, o que sugere possam constituir uma população de hepatócitos possivelmente iniciados<sup>(7)</sup>.

O crescimento clonal isolado de hepatócitos GSTP positivos, com a ação de um promotor, confirma o potencial papel precursor das áreas pré-neoplásicas e é evidência adicional do papel da GSTP como marcador de iniciação dos hepatócitos<sup>(7,20)</sup>. A regeneração e o crescimento celular rápido tendem a apresentar diminuição na adesividade celular, o que deve contribuir para a evolução do processo neoplásico<sup>(2)</sup>.

Em fígados de ratos, o fenobarbital mostra diminuição no índice de crescimento de hepatócitos fora dos focos considerados pré-neoplásicos. Após administração de fenobarbital por períodos curtos ocorre aumento de síntese de DNA e mitoses, em áreas pré-neoplásicas. O mesmo não ocorre quando da administração crônica dessa droga<sup>(8)</sup>. O fenobarbital aumenta a síntese de DNA com uma hiperplasia transitória, síntese de ácido ribonucléico (RNA), hipertrofia e proliferação do retículo endoplasmático liso e atividade microsomal aumentada. Em grupos experimentais submetidos a cancerígenos iniciadores, submetidos a dietas com fenobarbital, há marcado aumento da carcinogênese hepática. Não existe, porém, evidência clínica experimental de que o fenobarbital seja intrinsecamente cancerígeno, sendo no entanto, reconhecidamente agente promotor da carcinogênese<sup>(19)</sup>.

## CONCLUSÃO

O uso crônico de fenobarbital não alterou o número de áreas GSTP positivas. Entretanto, os dados sugerem influência no tamanho médio de áreas GSTP positivas, com conseqüente aumento da superfície GSTP positiva, sendo este aumento provavelmente relacionado a maior capacidade evolutiva dessas lesões e possível irreversibilidade das mesmas.

Silva HTH, Hartmann AA. Potentially pre-neoplasias areas in rat's liver associated to chronic use of phenobarbital. *Arq Gastroenterol.* 2006;43(2):121-4.

**ABSTRACT – Background** - Phenobarbital has been used in experimental models because it is an important agent of carcinogenesis promotion in the liver of rats, and it is also non-genotoxic, organ-specific and dose-dependent. **Aim** - To evaluate the effects of the daily administration of phenobarbital in old rats treated with phenobarbital since their birth up to 24 months of age, in the absence of concomitant administration of chemical agents, which initiate carcinogenesis. **Patients and methods** - A control group of male Wistar rats was fed with a basic diet and a second group was fed with the same basic diet added of 0.05% of phenobarbital, for a period of 24 months. Medium and right liver fragments were submitted to the histological processing and they were stained by hematoxyline and eosin and were immunohistochemically colored to glutathione S-transferase placentary form. **Results** - Glutathione S-transferase placentary positive zones were detected in both groups and the images were analyzed concerning their number and surface extension through the technique of histometry analyses. **Conclusion** - Chronic use of phenobarbital did not modify the number of glutathione S-transferase placentary form positive areas. Although, data indicates that glutathione S-transferase placentary form positive areas media size are increased, probably because there are an increase in their evolution capacity and irreversibility.

**HEADINGS** – Phenobarbital. Liver neoplasms, experimental. Rats.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bartels PH. Computer-generated diagnosis and image analysis in clinical pathology. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(Suppl):489-93.
2. Bucher NLR. Experimental aspects of hepatic regeneration. *N Engl J Med.* 1967;277:686-95.
3. Bucher NLR. Experimental aspects of hepatic regeneration (concluded). *N Engl J Med.* 1967;277:738-45.
4. Carrillo MC, Favre C, Carnovale CE, Monti JA, Alvarez ML, Scapini C, Pisani GB, Lugano MC. Involvement of mu class S-transferase subunit M2 (rGST M2) levels in the initiation and promotion of hepatocellular carcinogenesis in old rats. *Exp Gerontol.* 2001;36:255-65.
5. Decloitre F, Lafarge-Frayssinet C, Barroso M, Lechner MC, Ouldelhkim M, Frayssinet C. Effect of rat developmental stage at initiation on the expression of biochemical markers during liver tumor promotion. *Tumor Biol.* 1990;11:295-305.
6. Dragan YP, Peterson J, Pitot HC. Comparison of hepatocyte phenotypes at the glutathione transferase and albumin loci in Sprague-Dawley and Nagase analbuminec rats and F1 progeny after initiation and promotion. *Carcinogenesis.* 1993;14:1313-9.
7. Dragan YP, Campbell HA, Baker K, Vaughan J, Mass M, Pitot HC. Focal and non-focal hepatic expression of placental glutathione S-transferase in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis.* 1994;15:2587-91.
8. Dragan YP, Hully J, Crow R, Mass M, Pitot HC. Incorporation of bromodeoxyuridine in glutathione S-transferase-positive hepatocytes during rat multistage hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1994;15:1939-47.
9. Dragan YP, Singh J, Pitot HC. Effect of the separate and combined administration of mestranol and phenobarbital on the development of altered hepatic foci expressing placental form of glutathione S-transferase in the rat. *Carcinogenesis.* 1996;17:2043-52.
10. Fitzgerald DJ, Yamasaki H. Tumor promotion: models and assay systems. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1990;10:89-102.
11. Hasegawa R, Takahashi S, Imaida K, Yamaguchi S, Shirai T, Ito N. Age-dependent induction of preneoplastic liver cell foci by 2-acetylaminofluorene, phenobarbital and acetaminophen in F344 rats initially treated with diethylnitrosamine. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82:293-7.
12. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver - restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;7:187-202.
13. Kolaja KL, Stevenson DE, Walborg EFJR, Klauing JE. Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis.* 1996;17:947-54.
14. Kramer JA, Curtiss SW, Kolaja KL, Alden CL, Blomme EA, Curtiss WC, Davila JC, Jackson CJ, Bunch RT. Acute molecular markers of rodent hepatic carcinogenesis identified by transcription profiling. *Chem Res Toxicol.* 2004;17:463-70.
15. Lee GH. Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2000;28:215-25.
16. Mansbach JM, Mills JJ, Boyer IJ, De Souza AT, Hankins GR, Jirtle RL. Phenobarbital selectively promotes initiated cells with reduced TGF beta receptor levels. *Carcinogenesis.* 1996;17:171-4.
17. Mitaka T, Tsukada H. Sexual difference in the histochemical characteristics of "altered cell foci" in the liver of aged Fischer 344 rats. *Jpn J Cancer Res.* 1987;78:785-90.
18. Mutai M, Tatematsu M, Aoki T, Wada S, Ito N. Modulatory interaction between initial clofibrate treatment and subsequent administration of 2-acetylaminofluorene or sodium phenobarbital on glutathione S-transferase positive lesion development. *Cancer Lett.* 1990;49:127-32.
19. Peraino C, Fry RJ, Staffeld E, Christopher JP. Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.* 1975;35:2884-90.
20. Pitot HC, Campbell HA, Maronpot R, Bawa N, Rizvi TA, Xu YH, Sargent L, Dragan Y, Pyron M. Critical parameters in the quantitation of the stages of initiation, promotion, and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol Pathol.* 1989;17(4 Part 1):594-611.
21. Pitot HC, Dragan YP, Teeguarden J, Hsia S, Campbell H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicol Pathol.* 1996;24:119-28.
22. Rabes HM. Liver cell turnover in man and animals during aging. In: Bianchi L, Holt P, James OFW, Butler RN, editors. *Aging in liver and gastrointestinal tract.* Boston: MTP Press; 1988. (Falk Symposium 47th: 1987). p.225-37.
23. Russel WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol Carcinog.* 1996;15:183-9.
24. Sato K. Glutathione S-transferases and hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 1988;79:556-72.
25. Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Sci USA.* 1985;82:3964-8.
26. Schrenk D, Schmitz HJ, Bohnenberger S, Wagner B, Wörner W. Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 2004;149:43-50.
27. Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosienner I, Barthel G, Bursch W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res.* 1990;50:5127-35.
28. Tsuda H, Matsumoto K, Ogino H, Ito M, Hirono I, Nagao M, Sato K, Cabral R, Bartsch H. Demonstration of initiation potential of carcinogenesis by induction of preneoplastic glutathione S-transferase P-form-positive liver cell foci: possible in vivo assay system for environmental carcinogens. *Jpn J Cancer Res.* 1993;84:230-6.
29. Van Asten JG, Te Koppelle JM, Horbach GJ. The influence of aging on dimethylnitrosamine-demethylase enzyme kinetics in rat liver microsomes. *Mech Ageing Dev.* 1995;82:63-72.
30. Wyszynski A-M, Martínez-Zaguilán R, Alden C, Gandolfi AJ, Gillies RJ. Phenobarbital induces cytotoxic acidification in an established liver epithelial cell line. *Toxicol Lett.* 1994;74:157-66.

Recebido em 22/6/2004.  
Aprovado em 23/8/2005.