

Efecto Agudo y Crónico del Etanol sobre la actividad ATPasa y Consumo de Oxígeno asociado en corazón de rata adulta y neonata.

García-Roldán, J.L.*; De la Torre Brasas, F.**; Sánchez Jimeno, B.***; Velasco Martín, A.****

* Profesor Titular.

** Profesora Ayudante.

*** Doctora en Medicina.

**** Catedrático y Jefe del Departamento.

Departamento de Biología Celular y Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Valladolid

RESUMEN

Se estudia el efecto del etanol sobre la actividad ATPasa estimada fotocolorimétricamente y el consumo de oxígeno estimado manométricamente, en corazón de ratas adultas y neonatas. Se han realizado experimentos «in vitro», empleando concentraciones de etanol entre 10 y 100 mM. Un segundo tipo de experimentos, se han realizado mediante un pretratamiento en ratas de 7 meses de edad con 9'3 g / Kg / día de etanol durante un mes, y ratas neonatas de madres pretratadas.

El etanol en rata adulta, a las concentraciones de 30 y 50 mM., inhibe la actividad ATPasa y el consumo de oxígeno asociado a ésta. En tratamiento crónico, posee un efecto antagónico estimulando la actividad ATPasa y el consumo de oxígeno, efecto que es bloqueado por la Hemineurina.

En rata neonata, el etanol 30, 50 y 70 mM estimula la actividad ATPasa, mientras que en tratamiento crónico la inhibe, proceso revertido por la Hemineurina y Clonidina.

Palabras clave.— *Etanol, Consumo de Oxígeno, Actividad ATPasa, Corazón.*

SUMMARY

A study of effect of ethanol on the ATPase activity, estimated photocalourimetrically and the associated consumption of oxygen, determined manometrically in the hearth of adult and new —born rats. They have been experiments «in vitro» using concentrations between 10 and 100 mM of ethanol. A second kind of experiment has been carried out through a pre-treatment in rats of seven months with 9'3 / g / Kg per day of ethanol during one month and in newly-born rats

Correspondencia:

Dr. J. L. García-Roldán. Departamento de Biología Celular y Farmacología.
Facultad de Medicina. C/ Ramón y Cajal (Universidad de Valladolid). 47005 Valladolid.

of pre-treated mothers. In the adult rat, ethanol concentrations of 30 and 50 mM inhibit the ATPase activity and the consumption of oxygen associated with this activity and the consumption of oxygen associated with this activity.

In chronic treatment there is a contrary effect, stimulating the ATPase activity and consumption of oxygen; an effect which is inhibited by Hemineurine. In the newly-born rat, ethanol of 30, 50 and 70 mM stimulates the ATPase activity and in chronic treatment it inhibits, a process inhibited by Hemineurine and clonidine.

Key Words.— *Ethanol, Oxygen uptake, ATPase activity, Heart.*

INTRODUCCION

Los procesos activos de membrana, representados fundamentalmente por la actividad ATPasa (1,2), requieren energía (3) estando relacionados con el metabolismo oxidativo (4).

El etanol provoca modificaciones en la composición lipídica de la membrana (5) lo que confiere propiedades estabilizadoras, inhibiendo el intercambio activo Na-K (6,7), en tanto que posee un efecto estimulante sobre la actividad ATPasa Na-k dependiente (8). No obstante, el tratamiento crónico con etanol incrementa la actividad ATPasa Na-K dependiente (9), y probablemente la actividad ATPasa Mg dependiente (7).

En el presente trabajo se estudia el efecto «in vitro» del etanol a las concentraciones de 100mM (4'6 g/l), correspondientes a una alcoholemia que provoca un cuadro comatoso, 70mM (3'2 g/l), 50mM (2'3 g/l), con la que el 100% de los individuos presentan síntomas de embriaguez, 30mM (1'3 g/l), con la que el 50% de la población presenta síntomas de etilismo agudo y 10mM (0'4 g/l) concentración que corresponde a niveles fisiológicos de alcoholemia.

Asimismo, se estudia el efecto del etanol en tratamiento crónico sobre la actividad ATPasa y el consumo de oxígeno asociado en corazón de rata adulta y neonata, y las modificaciones que sobre éste inducen la Hemineurina, derivada tiazólico de la vitamina B₁, propuesto para el tratamiento del Delirium Tremens y el Síndrome de Abstinencia aguda al etanol (10), y la Clonidina, fármaco propuesto para el

síndrome de abstinencia de algunos psicofármacos.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado ratas Wistar neonatas (menos de 24 horas de vida) y ratas adultas de siete meses de edad con 386 ± 8 gramos de peso, muertas por decapitación.

El tratamiento crónico se ha llevado a cabo durante tres meses con una dieta libre con pienso compuesto Sanders industrial y la ingesta «ad libitum», de una solución etílica al 20% v/v tras un período de acomodación a ésta (11). La ingesta media de etanol ha sido de 9'29 g/kg/día.

La rata neonata ha sido pretratada exponiendo a la madre a esta solución etílica desde una semana antes de unirla al macho hasta la retirada de la camada.

La actividad ATPasa se ha determinado según la técnica de Wu y Phillis (12), midiendo el fósforo inorgánico liberado según el método de Fiske y Subbarow (13) en homogenizados de corazón de rata.

El consumo de oxígeno se ha determinado por técnica manométrica directa (14), con un aparato de Warburg, en cortes de corazón de rata. El consumo de oxígeno ligado a la actividad ATPasa Na-K, se ha determinado por la diferencia entre dos medios de incubación (15); uno con exceso de potasio (105mM) y sin calcio, en el que la actividad ATPasa Na-K está estimulada, y un segundo medio en el que se ha sustituido el cloruro de sodio por cloruro de colina, y en el que dicha actividad está inhibida (16).

El contraste estadístico se ha realizado mediante un t-test.

RESULTADOS

1. Efecto del etanol sobre la actividad ATPasa (Tabla 1).

1.a. Sobre homogenizados de corazón de rata adulta «in vitro», el etanol 50 y 30mM inhibe la actividad ATPasa Na-K dependiente en un 26 y 26% respectivamente. El etanol 30mM inhibe la actividad ATPasa no sensible a Ouabaína.

En tratamiento crónico, el etanol estimula la actividad ATPasa Na-K en un 53%, efecto que es bloqueado por la presencia «in vitro» de Hemineurina 1mM.

1.b. Sobre homogenizados de corazón de rata neonata «in vitro», el etanol 100mM inhibe la actividad ATPasa Na-K en un 62%. A las concentraciones de 70, 50 y 30mM, estimula actividad en un 111, 69 y 64% respectivamente.

En tratamiento crónico, el etanol inhibe la actividad ATPasa Na-K y ATPasa no sensible a Ouabaína en un 31% en ambos casos. El efecto inhibitorio sobre la ATPasa no sensible a Ouabaína, es revertido por Clonidina 0'001mM y Hemineurina 1 y 0'001mM.

2. Efecto del etanol sobre el consumo de oxígeno miocárdico (Tabla 2).

2.a. Sobre cortes de corazón de rata adulta «in vitro».

Cuando el medio de incubación es Krebs Ringer fosfato K 5mM (A), el etanol 100mM inhibe significativamente el consumo de oxígeno en un 42%. A las concentraciones de 70, 50, 30 y 10mM, inhibe el consumo de oxígeno a los 15 minutos de incubación en un 27%. (Estos últimos resultados no se expresan en la Tabla, ya que en ésta sólo aparecen los correspondientes a los 60 minutos de incubación).

Cuando el medio de incubación es un Krebs Ringer fosfato K 105mM sin calcio (B), el etanol 100mM inhibe significativamente el consumo de oxígeno a los 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación en un 27, 27, 31 y 25% respectivamente. A la con-

centración de 70mM, el etanol inhibe el consumo de oxígeno a los 15, 30 y 45 minutos de incubación en un 22, 22 y 19% respectivamente a las concentraciones de 50 y 30mM, el etanol inhibe el consumo de oxígeno a los 15 minutos de incubación en un 35 y 21% respectivamente.

Cuando el medio de incubación es Krebs Ringer carente en sodio y con cloruro de colina 131mM (medio C), el etanol 100mM inhibe el consumo de oxígeno a los 15 y 30 minutos de incubación en un 33%.

En tratamiento crónico, el etanol estimula el consumo de oxígeno en el medio de incubación con exceso de potasio (medio B), a los 15 minutos en un 34% y cuando el medio de incubación es carente en sodio (medio C), el etanol estimula el consumo de oxígeno a los 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación en un 21, 35, 39 y 44% respectivamente.

2.b Sobre cortes de corazón de rata neonata.

Cuando el medio de incubación es Krebs Ringer fosfato K 5mM (A), el etanol 70 y 50mM inhibe el consumo de oxígeno en un 45% a los 15 minutos de incubación. A la concentración de 30mM, inhibe el consumo de oxígeno en un 35, 42, 32 y 29% a los 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación. En tratamiento crónico, el etanol incrementa el consumo de oxígeno en un 102, 72, 53 y 54%, a los 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación.

Cuando el medio de incubación es Krebs Ringer fosfato K 105mM sin calcio, el etanol 100mM inhibe el consumo de oxígeno en un 33 y 30% a los 15 y 30 minutos de incubación. A concentraciones de 70 y 50mM, el etanol inhibe el consumo de oxígeno en un 50 y 26% respectivamente a los 15 minutos de incubación. A la concentración 30mM, el etanol inhibe el consumo de oxígeno en un 79, 68, 52 y 45% a los 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación. En tratamiento crónico, se aprecia una disminución del consumo de oxígeno en un 12% a los 15 minutos de incubación.

Cuando el medio de incubación es Krebs Ringer fosfato carente de sodio y calcio y

Tabla 1.— Efecto agudo y crónico del Etanol y su modificación por Clonidina y Hemineurina, sobre la actividad ATPasa sensible (Na-K) y no sensible a Ouabaina, en homogenizados de corazón de rata adulta y neonata. Valores medios \pm E.S.M. de Pi liberado por mg. de proteína y hora.

	n	Rata adulta		Rata neonata	
		ATPasa Na-K	ATPasa no sensible a Ouabaina	ATPasa Na-K	ATPasa no sensible a Ouabaina
Control	8	7,52 \pm 0,57	33,75 \pm 0,82	7,11 \pm 0,21	28,88 \pm 0,80
Efecto agudo: mM					
Etanol: 100	8	—	—	2,70 \pm 0,17 (a)	29,90 \pm 0,44
70	8	7,21 \pm 0,52	32,58 \pm 1,21	15,05 \pm 0,41 (a)	28,72 \pm 0,50
50	8	5,70 \pm 0,38 (c)	33,94 \pm 0,39	12,02 \pm 0,21 (a)	31,82 \pm 0,98
30	8	5,54 \pm 0,21 (b)	31,55 \pm 0,59 (c)	11,72 \pm 0,31 (a)	30,05 \pm 0,28
10	8	8,71 \pm 0,55	32,42 \pm 0,19	7,66 \pm 0,29	28,63 \pm 0,19
Clonidina: 0,001	6	—	—	5,67 \pm 0,59 (c)	53,56 \pm 0,19 (a)
Efecto crónico:					
Etanol:					
Etanol:	10	11,54 \pm 0,67 (a)	35,54 \pm 0,59	4,84 \pm 0,41 (a)	19,76 \pm 0,27 (a)
Clonidina: 0,001	7	10,63 \pm 0,71	35,62 \pm 0,53	3,40 \pm 0,22]c]	25,30 \pm 1,08]a]
Hemineurina: 1	7	9,11 \pm 0,26]c]	33,73 \pm 1,27	4,77 \pm 0,23	21,50 \pm 0,57]b]
0,001	7	11,04 \pm 0,85	35,56 \pm 0,87	4,70 \pm 0,39	21,36 \pm 0,43]c]

(a) y]a[p menor de 0,001. (b) y]b[p menor de 0,01. (c) y]c[p menor de 0,05. Entre paréntesis referidas al valor control y entre barras referidas al valor basal del efecto crónico del etanol.

Tabla 2.— Efecto agudo y crónico del etanol sobre el consumo en cortes de corazón de rata adulta y neonata.

El medio de incubación es Krebs Ringer fosfato, pH 7,4 con glucosa 10 mM y con: A.— potasio 5 mM y calcio 2,7 mM. B.— potasio 105 mM sin calcio y C.— potasio 5 mM sin sodio y con cloruro de colina.

	Rata adulta			Rata neonata		
	Medio A	Medio B	Medio C	Medio A	Medio B	Medio C
Control	144,04 ± 9,81	203,87 ± 10,26	178,56 ± 9,54	127,84 ± 8,79	189,27 ± 10,45	156,74 ± 6,51
Efecto agudo: mM						
Etanol: 100	82,39 ± 5,78 (c)	153,02 ± 10,68 (b)	156,02 ± 5,67	131,25 ± 5,21	170,20 ± 6,68	219,95 ± 11,31 (a)
70	129,69 ± 7,92	180,66 ± 8,79	170,89 ± 10,89	124,55 ± 6,53	181,88 ± 10,46	227,33 ± 10,64 (a)
50	124,53 ± 9,22	205,31 ± 9,03	173,71 ± 6,81	125,98 ± 8,13	165,40 ± 7,22	180,07 ± 8,04
30	128,26 ± 8,98	206,98 ± 9,10	177,48 ± 5,13	89,07 ± 6,43 (c)	104,15 ± 8,41 (a)	169,68 ± 9,59
10	144,97 ± 11,43	218,97 ± 11,48	188,98 ± 11,28	110,83 ± 4,78	170,29 ± 9,24	179,62 ± 6,16 (a)
Efecto crónico:	163,11 ± 11,75	204,46 ± 10,61	257,07 ± 10,08 (a)	197,65 ± 11,85 (a)	181,68 ± 11,85	236,95 ± 7,22 (a)

En ningún caso n ha sido inferior a 7 (a) p menor a 0,001. (b) p menor a 0,01 y (c) p menor a 0,05.

con cloruro de colina 131mM, el etanol 100mM estimula el consumo de oxígeno en un 29, 31 y 40% a los 30, 45 y 60 minutos de incubación.

A la concentración de 70 mM, este estímulo es del 59, 46, 36 y 45% a los 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación. En tratamiento crónico, el etanol produce un estímulo del consumo de oxígeno en un 39 y 51% a los 45 y 60 minutos de incubación.

El peso de las ratas neonatas normales ha sido de 6.3 ± 1.2 gramos, superior en un 10.5% (P 0.05) al peso de las ratas neonatas de las madres pretratadas con etanol (5.7 ± 0.2 gramos).

DISCUSION

El etanol, por su efecto estabilizante, bloquea el intercambio de sodio transmembrana inhibiendo la conductancia a éste (17) y cerrando los canales de sodio voltaje dependientes (18).

Sobre el corazón de rata adulta, el etanol «in vitro» a las concentraciones de 30 y 50mM, inhibe la actividad ATPasa Na-K dependiente, efecto descrito a nivel cerebral por Israel y col. (19) y Rangaraj y col (7). A la concentración de 30mM, el etanol inhibe la actividad ATPasa no sensible a Ouabaina, hecho descrito a concentraciones más altas por Beaugé y col. (20). A las concentraciones de 30, 50 y 70mM, el etanol inhibe el consumo de oxígeno de cortes de corazón incubados en Krebs Ringer fosfato K 5mM, y el consumo de oxígeno asociado con la actividad ATPasa Na-K dependiente de membrana a los 15 minutos de incubación.

A dosis muy tóxicas (100mM), el etanol se comporta como un depresor no selectivo de la actividad ATPasa y del consumo de oxígeno (21).

La administración crónica de etanol, estimula la actividad Na-K dependiente y el consumo de oxígeno en cortes de corazón incubados en Krebs Ringer fosfato K 5mM, K 105mM y sin sodio. Este hecho es contrario al provocado por el etanol «in vitro», fenómeno ya comentado por Yamamoto y Harris (8). Thurman y col. (22), describieron un incremento en el consumo

de oxígeno y de la actividad ATPasa inducidos en el hígado por la administración crónica de etanol, y atribuido a un estímulo de la cadena respiratoria y del turnover del NADH.

Israel y col. (23) y Rangaraj y col. (9), han descrito un incremento en la actividad ATPasa Na-K en homogenizados de cerebro en rata hasta 24 horas después de la última dosis de etanol. Este estímulo de la actividad Na-K, es revertido por la presencia «in vitro» de Hemineurina.

Sobre el corazón de rata neonata, el etanol «in vitro» a la concentración de 100mM, inhibe la actividad ATPasa Na-K y el consumo de oxígeno asociado a dicha actividad.

A las concentraciones de 30, 50 y 70mM, el etanol estimula la actividad ATPasa Na-K e inhibe el consumo de oxígeno relacionado con dicha actividad. Este efecto estimulante de la actividad ATPasa Na-K en neonatas, pudiera estar relacionado con el hecho de que durante el primer mes de vida extrauterina existe un marcado estímulo de dicha actividad (24).

En ratas neonatas de madres que han recibido tratamiento con etanol, se encuentra disminuida la actividad ATPasa Na-K, la ATPasa no sensible a Ouabaina en homogenizados de corazón, y el consumo de oxígeno de cortes de corazón incubados en Krebs Ringer fosfato K 5mM, así como el consumo de oxígeno asociado con la actividad ATPasa Na-K.

La Hemineurina 0.001mM y 1mM y la Clonidina 0.001mM, revierten el efecto inhibitorio que presenta la exposición prenatal a etanol sobre la actividad ATPasa no sensible a Ouabaina. La Clonidina 1 micromolar, potencia el efecto inhibitorio que sobre la actividad ATPasa Na-K induce el pretratamiento con etanol en rata neonata. Este efecto pudiera estar relacionado con la supersensibilidad del sistema adrenérgico encontrado en conducto deferente de ratón que ha sufrido exposición prenatal a etanol (25), hecho que potencia el efecto inhibitorio sobre la actividad ATPasa Na-K (7). El etanol bloquea la capacidad del feto en secuestrar el calcio micro-

somal hepático (26).

Con el presente trabajo se quiere hacer evidente cómo niveles de alcoholemia alcanzable en la clínica, poseen un claro efecto sobre la actividad de transporte activo transmembrana miocárdico así como la importante repercusión que puede tener la ingesta de etanol en la embarazada, contribuyendo de esta forma al estudio del síndrome alcohólico fetal.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN, A.M.; LEW V.L. (1983). The effect of intracellular calcium on the sodium pump of human red cells. *J. Physiol*, 343, pp. 455-493.
- ALLEN, J.C.; NAVRAN, S.S. (1984). Role of the Na^+ pump in smooth muscle contractile regulation. *Trends in Pharmacol. Sci.*, pp. 462-463.
- ROCKER, E. (1976). A new look at mechanism in bioenergetics. *Academic Press Ind.* New York.
- SPIRES, D.D.; WEINWE, M.W. (1980). Use of a uncopmpling agent to distinguish between direct stimulation of transport; investigation of antidiuretic hormone and aldosterone, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, pp. 214-507.
- LEE, H.; HOSEIN, E. A.; ROVINSKI, B. (1983). Effect of chronic alcohol feeding and withdrawal on rat liver plasma membrane structure and function: a study of binding of (^3H) prazosin to the membrane bound α_1 -adrenergic receptor. *Biochem Pharmacol*, 32, pp. 1.321-1.323.
- HUNT, G.R.A.; JONES, I.C. (1983). A H-NMR investigation of the effect of ethanol and general anesthetics on the ion channels and membrane fusion using unilamellar phospholipid membranes. *Biochem Biophys. Acta*, 736, pp. 1-10.
- RANGARAJ, N.J.; KALANT, H. (1984). Effect on ethanol tolerance on Norepinephrine-Ethanol inhibition of ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)- Adenosine triphosphatase in varius regions of rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 231, pp. 416-421.
- YAMAMOTO, H.A.; HARRIS, R. A. (1983). Effects of Ethanol and Barbiturates on Ca^{2+} — ATPase activity of erythrocyte and brain membranes. *Biochem. Pharmacol*, 32, pp. 2.787-2.791.
- RANGARAJ, N.; KALANT, H. (1978). Effects of ethanol withdrawal, stren and amphetamine on rat brain ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)— ATPase. *Biochem. Pharmacol*, 27, pp. 1.139-1.144.
- VELASCO, A.; MORENO, A. (1979). *Hipnóticos y sedantes*. En: Farmacología y su proyección a la clínica. Madrid. 14 edic. Velázquez L (Ed). Editorial Oteo, pp. 314-329.
- SWANN, A.C. (1985). Chronic Ethanol and ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)— Adenosine triphosphate: Apparent adaptation in cation binding and enzyme conformation, *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 232, pp. 475-479.
- WU, P.H.; PHILLIS, J.W. (1981). The effect of noradrenalin on Na-K transport in rat cerebral cortical slice. *Eur. J. Pharmacol*, 69, pp. 529-532.
- FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. (1925). Determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem*, 66, pp. 375-381.
- UMBREIT, B.W.; BURRIS, R. W.; STAUFFER, J.F. (1972). *Manometric and biochemical techniques*. Burgess Publishing Co. 5 th. Edition. Minneapolis.
- GUBITZ, R.H.; AKERA, T.; BRODY, T.M. (1977). Control of brain slice respiration by (Na-K) activated adenosine triphosphatase and the effects of enzyme inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta*, 459, pp. 263-271.
- VELASCO MARTIN, A.; GONZALEZ MARTINEZ-ZARATE. J.L. (1978). Efecto de la composición del medio de incubación sobre el metabolismo celular de rata «in vitro». *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, 95, pp. 641.

17. MULLIN, M.J.; WALTER, A.H. (1985) Actions of ethanol on voltage-sensitive sodium channels; effects on Neurotoxin-stimulated sodium uptake in synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232, pp. 413-419.
18. HARRIS, A.A.; BRUNO, P. (1985). Effects of ethanol and other intoxicant-Anaesthetics on Voltage-dependent sodium channels of brain synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232, pp. 401-406.
19. ISRAEL Y.; KALANT, H.; LAUFER, L. (1965). Effects of ethanol on Na, K, Mg-stimulated microsomal ATPase activity, *Biochem Pharmacol*, 14, pp. 1803.
20. BEAUGE, F.; STILBER, H.; KALANT, H. (1983). Brain synaptosomal ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)—ATPase activity as an index of tolerance to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18, pp. 519-524.
21. VILLALAIN, J.D.; RAMOS, M.T. (1974). Estudio del metabolismo oxidativo en ratas alcohólicas crónicas, 2^{as} Jornadas Toxicológicas Españolas, Sevilla, pp. 211-219.
22. THURMAN, R. G. (1982). Swift increase in alcohol metabolism (SJAM) in the mouse: comparison of the effect of short-term ethanol treatment on ethanol elimination in four inbred strains. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223, pp. 45-49.
23. ISRAEL, Y.; FALANT, H.; LE BLANC, A. E.; BERNSTEIN, J.; SALAZAR, I. (1970). Changes in cation transport and ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) activated adenosine triphosphatase produced by chronic administration of ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 174, pp. 330-336.
24. STOPP, M.; BRAUNLICH, H. (1983). P-aminohippurate (PAH) transport and Na-K-ATPase activity in rat renal cortical slices during postnatal maturation and drug-induced stimulation. *Biochem. Pharmacol*, 32, pp. 3.675-3.678.
25. BLUM, K.; DALTERIO, S.; BRIGGS, A.H.; DELALLO, L.J.; HALL, W.C. (1985). Supersensitivity to norepinephrine induced by prenatal exposure to ethanol. *Eur. J. Pharmacol*, 106, pp. 415-417.
26. CAMBON-CROSS, C.; CARRERA, G.; HITJAVILA, S (1984). Inhibition of Ca^{2+} sequestration in foetal liver microsomes by carbon tetrachloride and bromotrichlorometame. *Biochem. Pharmacol*, 33, pp. 2.605-2.608.