

CLORANFENICOL: EFEITOS SOBRE CÉLULAS CULTIVADAS *IN VITRO* E SUAS INTER-RELAÇÕES COM INSETICIDAS ORGANOCLORADOS

Maria Amélia La R. Rodrigues*, Magali D'Angelo-Campello**, F.R. Ruga***

RESUMO

Células da linhagem suína IB-RS-2 foram expostas por 72 horas ao cloranfenicol, em concentrações que variavam de 20,0 a 100,0 µg/ml de meio. Verificou-se que o cloranfenicol inibiu o crescimento celular, efeito proporcional à concentração e ao tempo de exposição. Esta inibição acentuou-se quando as células foram expostas simultaneamente ao cloranfenicol (60,0 µg/ml) e DDT (20,0 µg/ml) ou aldrin (20,0 µg/ml). Discute-se a possibilidade de estes efeitos estarem relacionados com o metabolismo de carboidratos, já que o cloranfenicol determinou um aumento do consumo de glicose pelas células, o qual se acentuou na presença dos inseticidas.

PALAVRAS-CHAVE: Cloranfenicol; aldrin; DDT; células.

SUMMARY

Chloramphenicol: effects on cells in vitro and its relationships to organochlorine insecticides

Swine cells IB-RS-2 were exposed to 20,0-100,0 µg/ml medium of chloramphenicol for 72 hours. The data obtained showed that chloramphenicol inhibited cell growth and that this effect depends on the concentration and time of cell exposure to the compound. This inhibition increased when the cells were exposed simultaneously to chloramphenicol (60,0 µg/ml) and DDT (20,0 µg/ml) or aldrin (20,0 µg/ml). The possibility that these effects could be related to the metabolism of carbohydrates is discussed since chloramphenicol increased glucose utilization and this effect increased when the cells were simultaneously exposed to the insecticides.

KEY-WORDS: Chloramphenicol; aldrin; DDT; cells.

INTRODUÇÃO – O cloranfenicol exerce sua ação antibiótica inibindo especificamente a síntese de proteínas bacterianas, sem, entretanto, afetar diretamente outros processos metabólicos (8). Seus efeitos sobre células de eucariotos têm sido avaliados em vários sistemas, tendo-se demonstrado que inibe a síntese de proteínas em células ósseas, HeLa e de embrião de galinha (3, 4, 6), diminui o índice mitótico em culturas de linfócitos humanos (8) e inibe a síntese de anticorpos, após um estímulo antígeno, em culturas de nódulos linfáticos (1).

Neste trabalho, foram estudados os efeitos do cloranfenicol em células da linhagem suína IB-RS-2. Além disso, dando continuidade aos estudos sobre as interações de inseticidas organoclorados e compostos de outra natureza (9), foram avaliados também os efeitos do cloranfenicol em culturas expostas ao DDT e ao aldrin, usando como parâmetros sua influência sobre

a cinética de crescimento e sobre o consumo de glicose pelas células.

MATERIAL E MÉTODOS – 1) *Culturas celulares*: Foram usados monoestratos celulares da linhagem suína IB-RS-2, clone C 26-3, mantidos em meio Melnick modificado, a 37-38°C, tal como descrito anteriormente (2).

2) *Avaliação dos efeitos do cloranfenicol e suas inter-relações com o DDT e o aldrin sobre a cinética de crescimento celular*: As células foram semeadas na densidade de 7×10^4 células por frasco e, após 24 horas de crescimento, tratadas com diferentes doses de cloranfenicol. Nos experimentos em que foram avaliadas as inter-relações entre o antibiótico e os inseticidas, foram adicionados às culturas cloranfenicol (60,0 µg/ml) e DDT (20,0 µg/ml) ou aldrin (20,0 µg/ml). A determinação do número de células foi feita 24, 48 e 72 horas após a adição

* Pesquisador Científico, Seção de Biologia Celular, Bolsista do CNPq.

** Biologista, Seção de Biologia Celular, Instituto Biológico, Bolsista do CNPq.

*** Pesquisador Científico, Seção de Toxicologia e Higiene Comparada, Instituto Biológico.

dos compostos, em uma câmara tipo Neubauer (Resistance, Germ.).

3) *Avaliação dos efeitos do cloranfenicol e de suas inter-relações com o DDT e o aldrin sobre a utilização de glicose pelas células*: Nestes experimentos, foram usados frascos contendo 6×10^5 células/ml. Após a troca de meio, adicionou-se aos frascos cloranfenicol (60,0 $\mu\text{g/ml}$) ou DDT (20,0 $\mu\text{g/ml}$) ou aldrin (20,0 $\mu\text{g/ml}$); alguns frascos receberam simultaneamente cloranfenicol e DDT ou aldrin. Depois de 4 horas de incubação a 37-38°C, procedeu-se à determinação da glicose presente no meio, segundo método já descrito (9).

4) *Inseticidas*: DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano) e aldrin (1,8,9,10,11,11-hexacloro-2,3,7,6-endo-2,1,7-exo-dimetano-naftaleno).

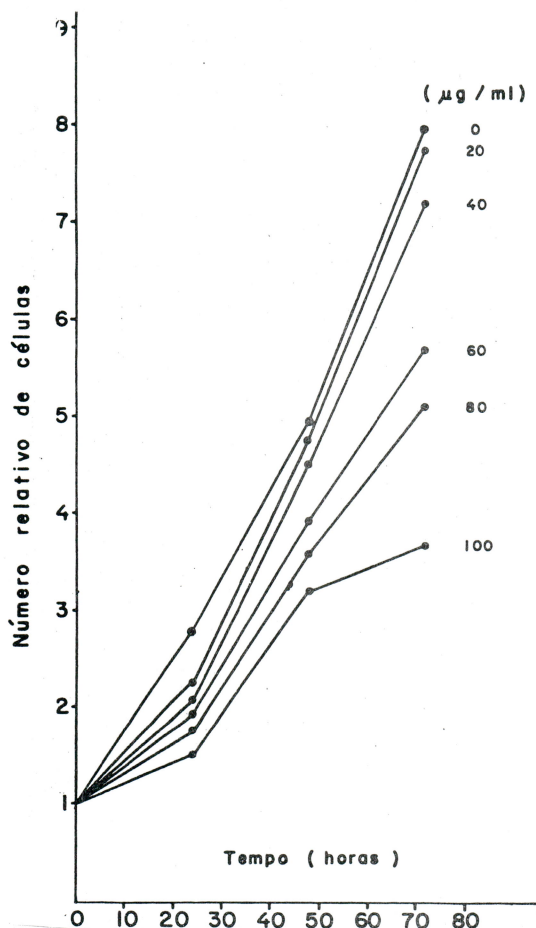


FIGURA 1 – Efeitos do cloranfenicol sobre o crescimento celular: As células foram semeadas (7×10^4 células/frasco) e, após 24 horas, tratadas com várias concentrações de cloranfenicol. As determinações dos números de células foram feitas em vários intervalos de tempo, após a adição do composto.

RESULTADOS – 1) *Efeitos do cloranfenicol sobre a cinética de crescimento celular*: Os resultados apresentados na figura 1 mostram que, nas culturas tratadas com cloranfenicol nas concentrações de 20,0, 40,0, 60,0, 80,0 e 100,0 $\mu\text{g/ml}$, há uma inibição do crescimento celular da ordem de 2,5%, 8,8%, 27,8%, 35,4% e 53,1%, respectivamente, após 72 horas de tratamento.

2) *Inter-relações entre os efeitos do cloranfenicol e dos inseticidas sobre o crescimento e o consumo de glicose pelas células*: Como pode ser observado na figura 2, o DDT e o aldrin, na concentração de 20,0 $\mu\text{g/ml}$, causam uma inibi-

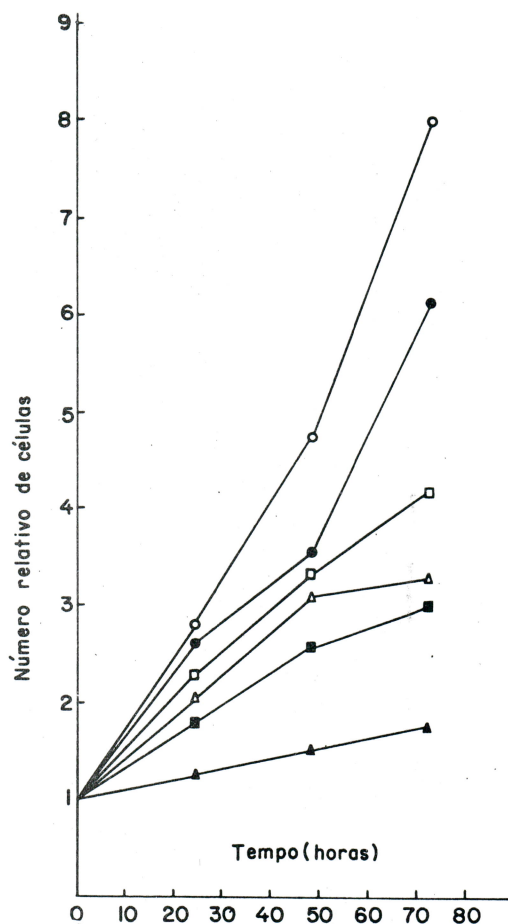


FIGURA 2 – Efeitos do cloranfenicol, do DDT e do aldrin sobre o crescimento celular: As células foram semeadas (7×10^4 células/frasco) e, após 24 horas, tratadas com cloranfenicol (60,0 $\mu\text{g/ml}$) e DDT (20,0 $\mu\text{g/ml}$) ou aldrin (20,0 $\mu\text{g/ml}$). As determinações dos números de células foram feitas em vários intervalos de tempo, após a adição dos compostos: ○ = controle; ● = cloranfenicol; △ = DDT; □ = aldrin; ▽ = cloranfenicol e DDT; ■ = cloranfenicol e aldrin.

ção da cinética de crescimento celular, que após 72 horas de exposição é da ordem de 58,7% e 46,3%, respectivamente.

A figura 2 mostra ainda que, nas culturas tratadas simultaneamente com cloranfenicol (60,0µg/ml) e DDT (20,0µg/ml), há uma inibição do crescimento celular avaliada em 78,7% após 72 horas de tratamento. Neste mesmo intervalo de tempo, as culturas tratadas simultaneamente com cloranfenicol (60,0µg/ml) e aldrin (20,0µg/ml) apresentaram uma inibição do crescimento celular da ordem de 62,5%.

Os dados da tabela 1 mostram que o consumo de glicose pelas células tratadas com cloranfenicol, DDT ou aldrin é maior que o das células não tratadas. Quando na presença simultânea de cloranfenicol e aldrin, este aumento é maior, e é mais pronunciado ainda, na presença de cloranfenicol e DDT.

TABELA 1 – Efeitos do cloranfenicol, DDT e aldrin sobre o consumo de glicose em células IB-RS-2.

Produto	Consumo de glicose (mg/ml)
Testemunha	0,637 ± 0,002
Cloranfenicol	0,664 ± 0,004
DDT	0,680 ± 0,001
Aldrin	0,669 ± 0,002
Cloranfenicol + DDT	0,714 ± 0,003
Cloranfenicol + Aldrin	0,700 ± 0,003

As culturas foram expostas ao cloranfenicol (60,0µg/ml), DDT (20,0µg/ml) e aldrin (20,0µg/ml) por 4 horas. O consumo de glicose foi determinado tal como descrito em Material e Métodos. Os valores representam a média ± desvio padrão de 10 frascos.

DISCUSSÃO – Os experimentos mostram que, em concentrações que variam de 40,0 a 100,0µg/ml, o cloranfenicol inibe o crescimento de células IB-RS-2. Autores como FIRKIN & LINNANE (4) verificaram que, em doses que variam de 10,0 a 40,0µg/ml, o cloranfenicol não altera de imediato o crescimento de células HeLa, embora, após dois ciclos de multiplicação, o crescimento cesse bruscamente, efeito que resultaria da inibição de uma pequena proporção das proteínas mitocondriais.

Por outro lado, em concentrações mais elevadas (100,0 a 150,0µg/ml), a velocidade do crescimento celular é inibida imediatamente após a adição do cloranfenicol ao meio, o que decorreria de uma inibição direta dos processos de respiração celular. Entretanto, LEBLOND-LAROCHE *et alii* (6) consideram que tais experimentos teriam um valor limitado, já que as células atingiriam uma fase estacionária após quatro ou cinco gerações em presença de cloranfenicol e que, além disso, degeneram-se após uma exposição prolongada ao composto. Estes autores verificaram que a presença de caldo de fosfato de triptose, no meio de cultivo de células de embrião de galinha, previne o efeito do cloranfenicol (80,0µg/ml) sobre o crescimento celular, embora não altere a inibição da síntese de proteínas mitocondriais induzida pelo antibiótico. A diminuição do ATP mitocondrial, que deveria ocorrer em tais condições, é, entretanto, compensada pelo aumento da glicólise, não tendo sido porém esclarecido se esta elevação seria mediada através do caldo de fosfato de triptose, ou seria uma consequência direta da ação do cloranfenicol. Por outro lado, em experimentos realizados em células de ovário de hamster, ZIEGLER & DAVIDSON (11) observaram que a inibição do crescimento induzida pelo cloranfenicol era dependente do tipo e da concentração da hexose presente no meio. A viabilidade celular decai rapidamente após sete ou oito ciclos de multiplicação na presença de cloranfenicol (100,0µg/ml) e de altas concentrações de glicose (6,5µM). Concentrações menores de glicose permitiam o crescimento por apenas quatro ou cinco ciclos, mas as células permaneciam viáveis por períodos de tempo mais longos. O crescimento destas células em presença de cloranfenicol parece ser especificamente dependente de glicose, pois a manose e a galactose não a substituem como fonte de energia. Aparentemente, a toxicidade do cloranfenicol é determinada pelo número de ciclos de multiplicação das células na presença do mesmo.

Os experimentos mostraram, também, que os efeitos inibidores do cloranfenicol sobre o crescimento celular aumentam quando as células são tratadas simultaneamente com aldrin, e acentuam-se ainda mais na presença de DDT. Observou-se, ainda, que o cloranfenicol estimula o consumo de glicose pelas células, efeito também induzido pelos inseticidas (9). À semelhança do que foi verificado em relação ao crescimento celular, os efeitos do cloranfenicol sobre o consumo de glicose são mais acentuados pela presença de aldrin e, sobretudo, de DDT.

É possível que este aumento resulte da conjugação de dois fatores: da ação do cloranfenicol sobre o metabolismo de carboidratos, e da interferência dos inseticidas sobre os processos de produção de energia, cujo mecanismo ainda não está bem-esclarecido, mas que tem sido atribuído, por muitos autores, a alterações nos níveis intracelulares de ATP e AMP cíclico (5, 7, 10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBROSE, C.T. & COONS, A.H. The inhibitory effect of chloramphenicol on the synthesis of antibody in tissue culture. *J. Exp. Med.*, 117: 1075-88, 1963.
2. CASTRO, M.O. de Clonal variation in the swine cell line IB-RS-2 in relation to morphology, karyotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arq. Inst. Biol.*, 37: 103-27, 1970.
3. DJORDJEVIC, B. & SZYBALSKI, W. Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine into the desoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity. *J. Exp. Med.*, 112: 509-31, 1960.
4. FIRKIN, F.C. & LINNANE, A.W. Differential effects of chloramphenicol on the growth and respiration of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32: 398-402, 1968.
5. HRDINA, P.D.; SINGHAL, R.L.; LING, G.M. DDT and related hydrocarbon insecticides: pharmacological basis of their toxicity in mammals. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 12: 31-8, 1975.
6. LEBLOND-LAROUCHE, L.; LAROUCHE, A.; GUERTIN, D.; MORAIS, R. Tryptose phosphate confers to chick embryo cells resistance to the inhibitory effect of chloramphenicol on growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 977-83, 1977.
7. LEE, T.P. & PARK, B.H. Biochemical basis of Aroclor 1254 and pesticide toxicity *in vitro*. Effects on intracellular ATP concentration. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 25: 597-607, 1979.
8. NASJLETI, C.E. & SPENCER, H.H. The effects of chloramphenicol on mitosis of phytohemagglutinin stimulated human leukocytes. *Exp. Cell Res.*, 53: 11-7, 1968.
9. RODRIGUES, M.A. LA R.; PUGA, F.R.; D'ANGELO, M. Inter-relações entre os efeitos de inseticidas e de hormônios em células cultivadas *in vitro*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 48: 87-9, 1981.
10. SINGHAL, R.L. & KACEW, S. The role of cyclic AMP in chlorinated hydrocarbon-induced toxicity. *Fed. Proc.*, 35: 2618-23, 1976.
11. ZIEGLER, M.L. & DAVIDSON, R.L. The effect of hexose on chloramphenicol sensitivity and resistance in chinese hamster cells. *J. Cell Physiol.*, 98: 627-36, 1979.

Recebido para publicação em 15/06/1981.