

Efecto del pirazol sobre el metabolismo del etanol en cortes de tejido adiposo de ratas

Effect of pyrazole on the metabolism of ethanol in rat adipose tissue slices

ROSA ALVARADO-ANDRADE, WANDA SOLODKOWSKA, SELFA CONTRERAS,
JORGE MARDONES

Departamento de Farmacología, Sede Santiago Norte, Universidad de Chile

(Recibido para publicación el 3 de diciembre de 1974)

ALVARADO-ANDRADE, R., SOLODKOWSKA, W., CONTRERAS, S., MARDONES, J.-Efecto del pirazol sobre el metabolismo del etanol en cortes de tejido adiposo de ratas. (Effect of pyrazole on the metabolism of ethanol in rat adipose tissue slices) Arch. Biol. Med. Exper. 11:104-105, 1978.

PYRAZOLE ADIPOSE TISSUE ETHANOL METABOLISM RAT

En trabajos anteriores (1, 2) hemos comunicado que cuando se incuban cortes de tejido adiposo peritoneal de rata en presencia de etanol marcado con ^{14}C en las posiciones 1 ó 2, parte de la actividad se recupera en el CO_2 , en los ácidos grasos y en la fracción insaponificable. Esos resultados muestran que el alcohol se oxida por acción de sistemas enzimáticos presentes en las células adiposas e indican que esta transformación pasa por la etapa de acetilcoenzima A, que se considera necesaria para la síntesis de ácidos grasos y para la entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el cual se libera el CO_2 y se inicia la glicólisis retrógrada que da lugar al glicerofosfato.

No se conoce la enzima que cataliza la primera etapa de la oxidación del alcohol en el tejido adiposo. Diversos intentos para encontrar actividad de deshidrogenasa alcohólica en el tejido adiposo han fracasado (3, 4). Es posible que en el tejido adiposo se presente la misma dificultad que en el tejido nervioso para reconocer la actividad de la deshidrogenasa alcohólica (5) debido a que podrían existir sistemas que reoxidan rápidamente el NADH a NAD y que de esta manera interfieran en el método generalmente utilizado para medir esta actividad.

Por estos motivos nos ha parecido impor-

tante estudiar el efecto del pirazol, substancia que bloquea la deshidrogenasa alcohólica (6, 7), sobre el metabolismo del etanol *in vitro* en presencia de cortes de tejido adiposo.

MATERIAL Y METODOS

Los experimentos se realizaron incubando cortes de tejido adiposo peritoneal de ratas adultas de ambos sexos en un medio que contenía etanol- ^{14}C .

En matraces Erlenmeyer de 50 ml se colocaron 4,0 ml de solución Ringer Krebs fosfato de pH 7,2, junto con 18 mg de glucosa en substancia, 0,5 ml de etanol al 2% marcado con ^{14}C en el carbono 1 y 0,5 ml de solución de pirazol 100 mM. A este medio se agregaron entre 400 y 500 mg de cortes de tejido adiposo de rata. Paralelamente se prepararon testigos con tejido adiposo del mismo animal, uno que se sometió a ebullición y otro que no contenía pirazol. En el centro de cada matraz de incubación se colocó un tubo que contenía 0,7 ml de KOH al 30% para absorber el CO_2 .

Los matraces se incubaron durante dos horas en un baño de Dubnoff a 37° C. Pasado este tiempo se mantuvieron a 4° C durante 15 minutos para detener la reacción. Después se retiraron cuidadosamente los cortes de tejido adiposo, se lavaron repetidas veces con agua destilada y se pesaron. La grasa se extrajo con éter etílico según el procedimiento de Soxhlet. La actividad de la grasa obtenida se midió en frascos que contenían tolueno, butil PBD y PBBO en un contador de centellas Beckman.

El contenido del tubo central se trasladó a probetas graduadas, se enteraron 5 ml con agua destilada, y se agregaron 2 ml de BaCl_2 0,5 M. El BaCO_3 formado, se separó por centrifugación y se lavó tres veces con agua destilada. Para

evitar la contaminación con el etanol marcado, el precipitado se colocó en un matraz Erlenmeyer cerrado con tapón de goma, igual al utilizado durante la incubación, colocando 0,7 ml de KOH al 30% en el tubo central. Para desprender el CO₂ se agregó después al precipitado 1 ml de HCl 6 N mediante jeringa y aguja que atravesó el tapón de goma, el matraz se mantuvo en el baño Dubnoff durante 30 minutos. La solución de KOH del tubo central que había absorbido el CO₂ se trasladó entonces a una probeta graduada y se completaron 5 ml con agua destilada. De esta solución se tomó una alícuota de 0,5 ml para medir su actividad en frascos que contenían tolueno, butil PBD, PBBO y triton X-100. La actividad se midió también en el contador de centellas Beckman.

En cada experimento se calculó, de acuerdo con los datos de la radioactividad recuperada, la cantidad de etanol que apareció incorporada en lípidos, así como la que se había oxidado hasta CO₂. Los resultados se expresaron en micromoles cuyo carbono se incorporó en lípidos o en CO₂, por cada gramo de tejido adiposo (peso húmedo) durante las dos horas de incubación.

TABLA I
Recuperación de la actividad del etanol-1-¹⁴C en CO₂ y en lípidos, por gramo de tejido adiposo (peso húmedo) después de 2 horas de incubación

	CO ₂ μ mole/g	Lípidos μ mole/g
Testigos	1,65 ± 0,43	1,33 ± 0,34
Pirazol 10 mM	1,65 ± 0,40	1,70 ± 0,47

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados aparecen resumidos en la tabla I. En cada experimento se calculó para el CO₂ y lípidos la relación entre la actividad del etanol recuperada durante la incubación con pirazol y sin esta substancia, descontando en ambos casos la actividad encontrada en el matraz incubado con cortes sometidos a ebullición. Las medias de estas relaciones y sus errores típicos fueron 1,49 ± 0,37 y 1,29 ± 0,13 en CO₂ y en lípidos, respectivamente. Estos valores no se diferencian significativamente de uno calculado con el test de *t* de Student.

Los resultados muestran que la presencia de pirazol 10 mM no disminuyó el metabolismo del etanol en cortes de tejido adiposo peritoneal de rata en las condiciones experimentales utilizadas, como sería de esperar si el proceso fuera catalizado por una deshidrogenasa alcohólica.

Estos resultados hablan, pues, en favor de que en el metabolismo del etanol en el tejido adiposo de rata no participa una deshidroge-

nasa alcohólica susceptible de ser inactivada por pirazol.

SUMMARY

Previous work have shown that part of the activity of ¹⁴C ethanol incubated with adipose tissue slices is recovered in CO₂ and lipids. However the presence of alcohol dehydrogenase (ADH) in this tissue has not been demonstrated. This could be explained by either an inadequacy of the methods employed for its estimation, or because the first step of ethanol metabolism in adipose tissue is catalyzed by other enzyme.

Experiments were performed by incubating ethanol-1-¹⁴C with adipose tissue slices of the same animal in the presence and in the absence of pyrazole 10 mM, substance known to be an inhibitor of ADH. The activity recovered in CO₂ and lipids was measured in vials containing toluene, butyl PBD and PBBO in a Beckman scintillation counter. Triton X-100 was added to vials in which aqueous solutions were measured. The possibility of contamination of lipids and carbonate with the labeled ethanol was carefully prevented.

The results appearing in Table I show that the presence of 10 mM pyrazole did not modify either the oxidation of ethanol to CO₂ or its incorporation into lipids. In each experiment the ratio between the activity found in CO₂ or lipids in presence and absence of pyrazole was calculated, and their means and S.E.M. were 1.49 ± 0.37 and 1.29 ± 0.13 respectively, which are not different from 1.00.

These results are in agreement with experiments which could not reveal ADH activity in adipose tissue of rats, and indicate that the first step of oxidation of ethanol in this tissue should be catalyzed by another enzymatic system.

REFERENCIAS

1. SOLODKOWSKA, W., ALVARADO-ANDRADE, R., MARDONES, J., Arch. Biol. Med. Exper. 7:26, 1970.
2. SOLODKOWSKA, W., ALVARADO-ANDRADE, R., MARDONES, J., Arch. Biol. Med. Exper. 9:4, 1973.
3. SCHEIG, R., Biochem. Biophys. Acta. 248:48, 1971.
4. HOLLIFIELD G., RESPES, J.C., PARSON, W., Clin. Res. 8:83, 1960.
5. RAIHA, N.C.R., KOSKINEN, M.S., Life Sci. 3:1091, 1964.
6. TOWNE, J.C., Nature (London) 207:709, 1964.
7. THEORELL, H., YONETANI, T., Biochem. Z. 338:537, 1963.