

Efectos de la administración crónica de etanol sobre el depósito de colágeno hepático en la rata*

Effects of chronic ethanol administration on hepatic collagen accumulation in the rat.

M. EUGENIA PINO, MARGARITA PETERMANN, TAMARA PEREDA, HERNAN ITURRIAGA y GUILLERMO UGARTE

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA),
Departamento Médico-Quirúrgico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

(Recibido el 29 de octubre de 1980)

Chronic ethanol administration to rats (6 weeks) produced a significant increase in total hepatic hydroxyproline, without detectable liver fibrosis. The magnitude of this increase was not modified by changes in the protein content of the diet or by longer periods of alcohol treatment.

In rats with liver fibrosis, produced by previous chronic carbon tetrachloride plus phenobarbital intoxication, ethanol was given during a 12 weeks period. In these conditions, the spontaneous decrease of hepatic hydroxyproline that normally occurs in the rat was significantly diminished in alcohol-treated animals, although the mean hepatic prolyl hydroxylase activity was similar to that of their controls. It is suggested that in this rat model of liver fibrosis, chronic ethanol administration favours collagen deposition in the liver possibly through a decrease in collagen degradation.

La fibrosis es un fenómeno frecuente en el hígado de los pacientes alcohólicos. Los mecanismos que estimulan la fibrosis en el hígado no son conocidos aunque habitualmente se han relacionado con la necrosis celular (1). Se ha sugerido además que la administración crónica de etanol podría modificar el metabolismo del colágeno hepático, independientemente del daño hepatocelular agudo (2). Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento sobre este problema son controversiales.

La administración crónica de etanol en la rata produce fibrosis hepática evidenciable sólo al microscopio electrónico (3) pero no detectable al microscopio de luz (2). La hidroxiprolina hepática total aumenta, al igual que la concentración hepática de prolina (2-4). La síntesis de colágeno se ha descrito aumentada (2, 5) o normal (3). En

el hígado de ratas con cirrosis dietética se ha encontrado que el alcohol provoca una disminución en la degradación de colágeno (6) pero, en un modelo diferente, se ha descrito un probable aumento de ella (3).

En todos estos estudios, el etanol se administró en dietas nutricionalmente balanceadas. Esta situación no es la habitual en el paciente alcohólico (7) cuyo aporte de proteínas en la dieta se ha encontrado disminuido en aquellos con fibrosis hepática (8). La antigüedad del alcoholismo es otro factor que se correlaciona positivamente con la incidencia de cirrosis, y, por lo tanto, de fibrosis hepática (7, 9).

El propósito de este trabajo fue comprobar el efecto de la administración crónica de etanol sobre la acumulación de colágeno en el hígado de ratas que recibieron dietas con alcohol por períodos prolongados. Se

* Trabajo financiado por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional (Proyecto M-243-783) de la Universidad de Chile.

estudió la influencia de factores nutricionales administrando dietas con diferente aporte proteico y por períodos también diferentes.

Para investigar si el alcohol modifica la degradación de colágeno se estudiaron sus efectos sobre la recuperación de la cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono y fenobarbital.

MATERIAL Y METODOS

Animales: Se utilizaron ratas macho Wistar de 150-180 g de peso inicial, que se mantuvieron en jaulas individuales a temperatura constante. Se controló el peso semanalmente.

a) **Administración crónica de etanol:** La administración de alcohol se realizó por medio de dietas líquidas a base de leche, con diferente concentración de proteínas (Tabla I). El alcohol sustituyó isocalóricamente a la sacarosa y representó 35% de las calorías diarias (Tabla II). La dieta se administró mediante tubos de Richter (10) utilizándose técnicas de alimentación pareada. Se formaron 3 grupos de animales: (I) 7 animales y sus respectivos controles, recibieron dietas con 12% de calorías proteicas por 24 semanas. (II) 12 animales y sus controles, recibieron la misma dieta por 6 semanas. (III) 10 animales y sus controles recibieron dietas con 7% de calorías proteicas por 6 semanas. Al término del experimento los animales fueron sacrificados por exsanguinación bajo ligera anestesia etérea. El hígado se removió para pesarlo; se utilizó una muestra obtenida de dos lóbulos diferentes para determinar hidroxiprolina y otra semejante para estudio histológico.

TABLA I

Composición de las dietas líquidas experimentales (en gramos) (1)

	DIETA A		DIETA B	
	Sin Alcohol	Con Alcohol	Sin Alcohol	Con Alcohol
Leche 26% Mat. grasa	111.0	111.0	64.8	64.8
Sacarosa	102.3	14.3	157.6	32.6
Acetate	4.2	4.2	5.4	5.4
Alcohol	—	50	—	76
Mezcla vitamínica (2)	5	5	5	5
Mezcla de Sales Minerales (3)	5	5	5	5
Carboximetilcelulosa	10	10	10	10
Benzoato de Sodio	0.5	0.5	0.5	0.5

(1) Cantidades anotadas son para un 1.1 dieta (1 cal/ml).

(2) ICN modificada (enriquecida con 6 g% de L-cistina y 2.5 g% de coína).

(3) ICN (fórmula de Hegsted).

TABLA II

Dietas Experimentales: Composición calórica porcentual

	DIETA A		DIETA B	
	Sin Alcohol	Con Alcohol	Sin Alcohol	Con Alcohol
Proteínas	12	12	7	7
Grasas	30	30	20	20
Hidratos de Carbono	58	23	73	23
Alcohol	—	35	—	50

b) **Efecto del etanol en la recuperación de la fibrosis hepática:** Se indujo cirrosis hepática por administración, durante 8 semanas, de 0,5 ml/kg de peso de tetracloruro de carbono (solución al 10% en aceite de oliva), una vez a la semana por intubación gástrica y fenobarbital 0,1 g/l administrado permanentemente en el agua de bebida. Transcurrido el tiempo de intoxicación, un grupo de animales fue sacrificado y los restantes se subdividieron en 3 grupos que recibieron las siguientes dietas durante un período de 12 semanas (período de recuperación) 1) Dieta normal de vivero; 2) Dieta líquida con alcohol (35% de las calorías totales y 12% de calorías proteicas); 3) Control: recibió alimentación pareada con los alcohólicos, pero sin alcohol. Una vez terminado este segundo período experimental los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras del hígado para estudio histológico, medición de hidroxiprolina total y de actividad prolil-hidroxilasa.

Otro grupo de animales, que no fue intoxicado con CCl₄, fue alimentado con dieta habitual de vivero y se sacrificó simultáneamente con los animales experimentales, tanto al término del período de intoxicación (controles) como del de recuperación. En este último caso se los designó como supercontroles.

Estudio Histológico: Las muestras de hígado se fijaron en formol al 15% tamponado con buffer fosfato pH 7. La inclusión se hizo en parafina y los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Hidroxiprolina total en hígado: Se midió en tejido húmedo y en tejido seco desgrasado usando el método de Prockop y Udenfriend (11).

Actividad prolil-hidroxilasa: Se determinó según el método de Risteli y Kivirikko (12) y Mac Gee (13) usando sustrato marcado con [³H]-prolina preparada según Hutton (14).

Estadística: Los resultados se expresaron como promedio \pm error standard del promedio (E.S.M.) y para la significación estadística se usó la prueba "t" de Student para muestras independientes (15).

RESULTADOS

Administración crónica de alcohol

Histológicamente no hubo fibrosis y sólo se encontró esteatosis al microscopio de luz en algunos animales alcohólicos.

Todos los grupos que recibieron alcohol mostraron un aumento significativo de la hidroxiprolina hepática total, comparados

con sus controles pareados (Tabla III). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos en cuanto al porcentaje de aumento de colágeno en cada grupo, comparado con su respectivo control.

Efecto del alcohol en la recuperación de la fibrosis

A las 12 semanas de recuperación, la hidroxiprolina hepática total fue significativamente menor que al término del período de intoxicación (Tabla IV). El grupo alcohólico presentó valores de hidroxiprolina mayores, pero no estadísticamente significativos que el grupo control, al expresarlos por gramo de hígado (Tabla IV). Este aumento se hace significativo si se expresa en función del peso porcentual del órgano (Tabla IV).

TABLA III

Efecto de la ingestión crónica del alcohol sobre concentración de hidroxiprolina hepática total, después de administración crónica de dietas con alcohol $\bar{X} \pm$ E.S.M.)

Grupo	n	Semanas de dieta	o/o Cals. proteicas	Hidroxiprolina total mmol/kg hígado seco desgrasado		P	o/o Variación
				Alcohólicas	Controles		
I	7	24	12	11.4 \pm 1.22	5.11 \pm 0.84	<0.005	127.8 \pm 40.0
II	12	6	12	14.41 \pm 1.90	8.85 \pm 1.30	<0.02	68.6 \pm 21.2
III	10	6	7	8.01 \pm 0.61	5.41 \pm 0.61	<0.005	57.1 \pm 14.6*

* Comparado con I: p = n.s. ($>0.05 <0.10$).

TABLA IV

Hidroxiprolina (HP) y prolil hidroxilasa (POH) hepáticas, antes y después de 12 semanas de recuperación ($\bar{X} \pm$ E.S.M., n de cada grupo entre paréntesis)

Grupo	Peso hígado g/100g peso corporal	HP mmol/kg hígado húmedo	HP mmol/kg hígado húmedo 100g peso corp.	HP mmol/kg hígado seco desgrasado	POH dpm/mg proteína
a) Antes de recuperación:					
Control	4.5 \pm 0.24 (13)	—	—	13.6 \pm 1.4 (13)	124 \pm 30 (6)
Intox. 8 sem.	5.2 \pm 0.18 (14)	—	—	50.5 \pm 3.8 (14)	317 \pm 47 (9)
b) Después de recuperación:					
Supercontroles	3.2 \pm 0.12 (7)	3.7 \pm 0.7 (5)	11.4 \pm 2.6 (5)	6.1 \pm 0.5 (7)	76 \pm 24 (4)
Dieta normal	3.8 \pm 0.14 (11)	11.9 \pm 0.6 (8)	42.7 \pm 2.3 (8)	20.0 \pm 2.4 (11)	187 \pm 16 (5)
Alcohol	3.6 \pm 0.03 (9)	17.8 \pm 2.0 (9)	64.7 \pm 6.9*(9)	27.4 \pm 3.4 (9)	196 \pm 20 (6)
Control	2.9 \pm 0.07 (8)	15.0 \pm 0.8 (8)	43.8 \pm 2.5 (8)	22.8 \pm 1.7 (8)	227 \pm 29 (5)

* p < 0,01 (vs controles).

La prolil-hidroxilasa no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos al término del período de recuperación. Sus valores, sin embargo, fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que los que mostraron animales normales de edad semejante (supercontroles) (Tabla IV).

Histológicamente el tratamiento con tetracloruro de carbono y fenobarbital produjo cirrosis hepática con fibrosis importante. Esta fibrosis disminuyó significativamente después de 12 semanas de recuperación. En los animales que recibieron alcohol, la fibrosis al final de ese período fue de mayor magnitud que en los controles.

DISCUSION

En la rata, la administración crónica de etanol en dietas líquidas con diverso contenido proteico y por diferentes períodos del tiempo produjo en todos los grupos de animales un aumento significativo del colágeno hepático, sin que se encontrara fibrosis histológicamente detectable por microscopía de luz, lo que concuerda con otros estudios (2-4). Las variaciones en el contenido proteico de la dieta no determinaron diferencias significativas en cuanto al aumento porcentual de la hidroxiprolina en el hígado de los animales alcohólicos en relación a sus controles.

La cantidad de hidroxiprolina encontrada en el hígado de animales que recibieron dieta hipoproteica, fue menor que la encontrada con dieta normoproteica, tanto en los animales controles como en los alcohólicos. Esta menor fibrosis con dietas hipoproteicas ha sido observada también en otros modelos (16). Sin embargo, en nuestros animales el aumento de colágeno, por efecto del etanol, no fue porcentualmente de una magnitud diferente que el obtenido con dietas normoproteicas.

La prolongación del tiempo de administración de etanol de 6 semanas a 6 meses, no produjo una mayor acumulación porcentual de hidroxiprolina hepática. Los controles en el experimento de 6 meses mostraron un menor contenido de hidroxiprolina que los del experimento de 6 semanas. Este efecto de la edad, en el sentido de disminuir el contenido de hidro-

xiprolina en el hígado, ha sido comprobado en repetidas observaciones por nuestro laboratorio.

La intoxicación con tetracloruro de carbono y fenobarbital, produjo una fibrosis avanzada con cirrosis hepática, confirmada histológicamente. Se eligió adicionar fenobarbital al tetracloruro de carbono, pues en estas condiciones se logra inducir más rápida y reproduciblemente la cirrosis hepática en la rata (17).

El colágeno acumulado disminuyó en forma significativa, después de 12 semanas de suspender el tetracloruro de carbono. Esta regresión espontánea de la cirrosis hepática en la rata es ampliamente conocida (18). Sin embargo, la concentración de hidroxiprolina continuó siendo mayor que en los controles sin intoxicación previa y de edad semejante (supercontroles). En estos supercontroles el colágeno total volvió a encontrarse disminuido en relación a controles más jóvenes, por efecto de la edad.

En los animales alcohólicos el colágeno hepático, después de 12 semanas de recuperación, fue mayor que en sus controles, al expresarlo en función del hígado total. Esta forma de expresión parece ser adecuada para reflejar procesos que ocurren en casos que se acompañan de hepatomegalia, que es la situación de los animales alcohólicos. La prolil-hidroxilasa, que se considera un marcador aceptable de síntesis de colágeno (19), no mostró diferencias entre alcohólicos y sus controles, aunque en todos los grupos fue mayor que en los animales normales (supercontroles). Por lo tanto, esta relativa mayor acumulación de colágeno no parece haber sido debida a una mayor síntesis. En estas condiciones la posibilidad de una menor degradación aparece como la más aceptable. Desgraciadamente, por razones técnicas no nos fue posible medir en forma directa la actividad colagenolítica.

Nuestros resultados concuerdan con los de Henley (6) quien en un modelo de cirrosis dietética también mostró que el alcohol retarda la degradación del colágeno.

En resumen, podemos decir que la ingestión crónica de etanol produjo una acumulación de colágeno en el hígado de la rata,

que es independiente del contenido proteico de la dieta y de la duración del tratamiento. En hígados con fibrosis, el efecto del alcohol fue posiblemente el de retardar la movilización del colágeno acumulado.

REFERENCIAS

1. POPPER, H., UDENFRIEND, S. (1970). *Am. J. Med.* 49: 707-721.
2. FEINMAN, L., LIEBER, C.S. (1972). *Science* 176: 795.
3. MEZEY, E., POTTER, J.J., SLUSSER, R.J., ABDI, W. (1977). *Lab. Invest.* 36: 206-214.
4. HAKKINEN, H.M., FRANSSILA, K., KULONEN, E. (1975). *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 35: 753-765.
5. ORREGO, H., ISRAEL, Y., TIEFFENBACH, H., SALDIVIA, V., VARGHESE, G., MEDLINE, A. (1979). *Alcoholism* 3: 213-218.
6. HENLEY, K.S., LAUGHREY, E.G., APPELMAN, H.D., FLECKER, K. (1977). *Gastroenterology* 72: 502-506.
7. UGARTE, G., ITURRIAGA, H., INSUNZA, I. (1970). En: *Progress in liver diseases* (Popper, H. & Schaffner, F. ed.). Vol. 3. New York, Grune & Straton. pp. 355-370.
8. PATEK, A.J., TOTH, I.G., SAUNDERS, M.G., CASTRO, G.A.M., ENGEL, J.J. (1975). *Arch. Int. Med.* 135: 1053-1057.
9. LELBACH, W. (1972). En: *Progress in liver diseases*. (Popper, H. & Schaffner, eds.). Vol. 4 New York, Grune & Stratton, pp. 494-575.
10. RICHTER, C. (1926). *J. Exp. Zool.* 44: 397.
11. PROCKOP, D.J., UDENFRIEND, S. (1960). *Anal. Biochem.* 1: 228-239.
12. RISTELLI, J., KIVIRIKKO, K.I. (1974). *Biochem J.* 144: 115-122.
13. MCGEE, J.O.D., PATRICK, R.S., RODGER, M.C., LUTY, C.M. (1974). *Gut* 15: 260-267.
14. HUTTON, J.J., TAPPEL, A.L., UDENFRIEND, S. (1966). *Anal. Biochem.* 16: 384-394.
15. SNEDECOR, G., COCHRANE, E. (1967). *Statistical Methods*, 6th. ed. Iowa State University Press, Ames.
16. SRIRAMACHARI, S. (1962). En: *Collagen* (Ramanathan, N. ed.). New York, Interscience Publishers, p. 351-369.
17. McLEAN, E.K., McLEAN, A.E.M., SUTTON, P.M. (1969). *Brit. J. Exp. Path.* 50: 502-506.
18. RUBIN, E., HUTTERER, F., POPPER, H. (1963). *Amer. J. Path.* 42: 715-728.
19. CARDINALE, G.J., UDENFRIEND, S. (1974). *Adv. Enzymol.* 41: 245-300.

