

METABOLISMO DEL ETANOL EN RATAS CON CIRROSIS HEPATICA EXPERIMENTAL PRODUCIDA POR CCl₄. III. DESTINO DEL ETANOL-1-C¹⁴ INCUBADO CON CORTES DE TEJIDO ADIPOSO EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE GLUCOSA *

Ethanol metabolism in rats with experimental liver cirrhosis. III. Fate of ethanol-1-C¹⁴ incubated with adipose tissue slices in presence and absence of glucose.

WANDA SOLODKOWSKA, ROSA ALVARADO, ELIANA MUÑOZ, NORA JARA, NATIVIDAD SEGOVIA-RIQUELME y JORGE MARDONES

Instituto de Investigaciones sobre Alcoholismo. Universidad de Chile, Casilla 12967, Santiago, Chile.

Recibido para publicación el 23 de Febrero de 1966.

RESUMEN

En experimentos de incubación de etanol-1-C¹⁴ en concentraciones de 0,2 y 2 mg/ml en presencia de cortes de tejido adiposo se estudió la oxidación hasta CO₂ y la incorporación en lípidos. El tejido adiposo provenía de ratas de ambos sexos de linaje "no bebedor" (A) y "bebedor" (B) con cirrosis hepática ocasionada por CCl₄ y testigos. Se estudió además el efecto de la presencia de glucosa en el medio de incubación.

Los resultados mostraron que no hay diferencia en la cantidad de etanol oxidado a CO₂ entre los animales tratados con CCl₄ y testigos. En cambio la incorporación en lípidos fue significativamente mayor en los animales tratados que en los testigos (2 P < 0,001).

La presencia de glucosa en el medio de incubación aumentó en forma altamente significativa (2 P < 0,001) la incorporación de carbono 1 del etanol, tanto en el tejido adiposo proveniente de animales tratados con CCl₄ como de testigos; pero no influyó sobre la velocidad de oxidación de este sustrato. En los experimentos con 2 mg/ml de etanol la oxidación de este sustrato hasta CO₂ fue significativamente mayor que en la concentración de 0,2 mg/ml (P < 0,001), mientras que la incorporación de etanol en lípidos no fue diferente en los experimentos testigos con 0,2 y 2 mg/ml de etanol y levemente mayor (2 P < 0,05) en los experimentos de incubación de tejido adiposo de ratas cirróticas con 2 mg/ml de etanol en el medio.

No se observó diferencias de sexo ni de linaje en ninguno de los grupos experimentales.

INTRODUCCIÓN

En una comunicación anterior (1) hemos mostrado que las ratas con cirrosis hepática experimental producida por intoxicación crónica con CCl₄ eliminaban más rápidamente el etanol de la sangre que los testigos, mientras que la veloci-

dad de oxidación de este sustrato hasta CO₂ fue equivalente en cirróticos y testigos. Esta diferencia no parece ser causada por una diversa velocidad de incorporación del etanol en lípidos hepáticos, puesto que la actividad encontrada en la grasa de cortes de hígado incubados con etanol-1-C¹⁴ fue equivalente en los animales cirróticos y en los testigos (2).

Es un hecho bien establecido que en el tejido adiposo de la rata se forman lípidos a partir de hidratos de carbono y de acetato (3, 4). Por este motivo hemos estudiado si la intoxicación crónica con

* Los gastos del presente trabajo han sido financiados parcialmente por la Comisión de Ayuda a la Investigación Científica de la Facultad de Medicina. Universidad de Chile (Proyecto Nº 61.36) y la Fundación Rockefeller en un programa conjunto (Grant Nº 63015).

CCl_4 modifica la velocidad de incorporación del etanol en los lípidos del tejido adiposo, cuando se incubaba una solución de etanol con cortes de este tejido.

Por otra parte, diversos autores (5, 6, 7) han mostrado que la velocidad de incorporación del acetato en lípidos del tejido adiposo se acelera cuando la incubación se realiza en presencia de glucosa. Era entonces de interés conocer la influencia de la glucosa en la incorporación del etanol en los lípidos de cortes de tejido adiposo provenientes de ratas intoxicadas con CCl_4 y normales. Por último, convenía hacer estos experimentos en ratas de ambos sexos de los linajes "bebedor" y "no bebedor" (8) para estudiar una influencia eventual del sexo o del linaje.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas albinas de ambos sexos provenientes de los linajes "no bebedor" (A) y "bebedor" (B) de este Instituto, alimentadas con la dieta común del plantel. Un grupo de ratas se sometió diariamente a la inhalación de una atmósfera de CCl_4 dentro de una campana de vidrio, durante un minuto. Después de al menos 10 semanas de tratamiento se dio muerte a los animales y se extrajo rápidamente el tejido adiposo del mesenterio, del cual se hicieron cortes con una tijera fina y se colocaron en solución de Ringer Krebs fosfato (pH 7,2) en baño de hielo. Solamente se emplearon en los experimentos las ratas tratadas que presentaban signos macroscópicos claros de cirrosis hepática. Los cortes de tejido adiposo del grupo testigo se prepararon de la misma manera.

En una serie de experimentos se incubaron alrededor de 500 mg de cortes de tejido adiposo en 5 ml de solución de Ringer Krebs fosfato, al cual se agregó etanol- 1-C^{14} en concentración de 0,2 mg/ml.

En una segunda serie de experimentos se incubaron simultáneamente cortes de tejido adiposo del mismo animal en Ringer Krebs fosfato que contenía etanol- 1-C^{14} en concentración de 2 mg/ml en presencia de glucosa (3,6 mg/ml) y en ausencia de este sustrato.

La incubación se efectuó en matraces de Erlenmeyer de 50 ml que tenían en el centro un tubo de vidrio suspendido, provisto de un papel filtro impregnado en KOH al 30% para absorber el CO_2 .

Antes de iniciar la incubación se hizo circular oxígeno a través de los vasos, durante 3 minutos. La incubación se mantuvo durante 2 horas a 37°C con agitación continua.

Terminada la incubación, se detuvo el proceso agregando a cada vaso 0,2 ml de H_2SO_4 5 N. Se enfriaron los vasos en el refrigerador durante 30 minutos, se traspasó la solución de KOH del tubo central a probetas graduadas y se enteró con agua destilada un volumen de 10 ml. En una alícuota de esta so-

lución se determinó el contenido de carbonato, liberando el CO_2 con ácido láctico en el aparato de VanSlyke manométrico, y en otra se precipitó con BaCl_2 y se midió la radioactividad del precipitado en capas de grosor infinito.

Después de la incubación se lavaron los cortes repetidas veces con Ringer y agua destilada para asegurarse de que se había eliminado todo el etanol libre. Luego se secaron los cortes en papel filtro, se les agregó sulfato de sodio anhidro y se extrajeron los lípidos con éter en aparato de Soxhlet durante 3 horas. El residuo de la evaporación del extracto etéreo se pesó, se trasladó a planchetas y su radioactividad se midió en forma directa en capas de grosor infinito. Para poder comparar la actividad así medida con la que se encontraba en el CO_2 del vaso central y del obtenido por combustión del etanol- 1-C^{14} agregado al medio de incubación, ambas medidas en forma de BaCO_3 , se utilizó la fórmula de Medes *et al.* (9) que establece equivalencia con la actividad encontrada en la grasa multiplicando ésta por la relación entre el contenido de carbono en el BaCO_3 y en ácidos grasos, a saber por $6,08 : 76,2 = 0,079$. Experimentos de control en que una misma muestra de grasa se midió directamente y después se sometió a combustión, recolección del CO_2 y precipitación con BaCO_3 , demostraron que esta fórmula resulta aplicable con suficiente precisión.

En algunos experimentos se incubaron paralelamente cortes de tejido adiposo previamente calentados a la ebullición, y en otros se hicieron pruebas en blanco simultáneas, sin cortes de tejido. En ninguno de estos casos se recuperó actividad en el CO_2 ni en los lípidos.

Los resultados se han expresado en micromoles de etanol- 1-C^{14} oxidados hasta CO_2 e incorporado en lípidos por g de tejido adiposo fresco, en 2 horas de incubación.

RESULTADOS

Experimentos de incubación con etanol- 1-C^{14} en concentración de 0,2 mg/ml.

Los resultados obtenidos en los experimentos en que se incubaron cortes de tejido adiposo de ratas de ambos linajes y sexos en presencia de etanol- 1-C^{14} en concentración de 0,2 mg/ml aparecen en la Tabla I. Como puede apreciarse la velocidad de oxidación a CO_2 fue del mismo orden en el tejido adiposo proveniente de ratas tratadas con CCl_4 y en el de testigos ($2 P > 0,3$).

Los resultados con respecto a la velocidad de incorporación de etanol en lípidos están resumidos en la Tabla II.

No se observa diferencia significativa entre sexos o linajes y por lo tanto es justificado considerar en conjunto los datos de ambos sexos y linajes. Los datos

TABLA I

Actividad recuperada en el CO_2 durante 2 horas de incubación de cortes de tejido adiposo de ratas testigos y tratadas con CCl_4 en presencia de 0,2 mg/ml de etanol-1- C^{14} y ausencia de glucosa. Los valores están expresados en micromoles de etanol oxidados hasta CO_2 por gramo de tejido adiposo fresco en 2 horas.

Linaje	Sexo	N	Testigos $\mu\text{mole/g}^*$	N	Tratados con CCl_4 $\mu\text{mole/g}^*$
A	M	4	0,71 \pm 0,06	8	0,67 \pm 0,09
A	F	4	0,55 \pm 0,07	8	0,65 \pm 0,12
B	M	4	0,66 \pm 0,03	8	0,65 \pm 0,06
B	F	4	0,78 \pm 0,02	8	0,58 \pm 0,09
A + B	M + F	16	0,68 \pm 0,03	32	0,63 \pm 0,04

* Media aritmética \pm su error típico.

así analizados muestran que la velocidad de incorporación del etanol-1- C^{14} en lípidos de tejido adiposo en ratas cirróticas fue significativamente mayor de la observada en testigos ($2P < 0,001$).

Experimentos con etanol-1- C^{14} en concentración de 2 mg/ml en presencia y en ausencia de glucosa

Los resultados obtenidos en la segunda serie, en que se empleó una concentración de 2 mg/ml de etanol-1- C^{14} y en la cual se efectuaron experimentos pareados con y sin glucosa, aparecen resumidos en las Tablas III y IV.

Los datos consignados en la Tabla III muestran que la presencia de glucosa no modificó en forma significativa la velocidad de oxidación del etanol a CO_2 . El

tejido adiposo proveniente de ratas cirróticas aparece como dotado de mayor capacidad de oxidar el etanol a CO_2 . Esa diferencia es significativa ($t = 3,65$; $2P < 0,001$), si se comparan los resultados de tratados y testigos con el conjunto de los experimentos sin glucosa. Las diferencias entre linajes y entre sexos no fueron significativas, de modo que la consideración de un promedio general es justificada. En los experimentos en que la incubación se hizo en presencia de glucosa se observó también un promedio superior en los correspondientes al tejido adiposo de ratas tratadas con CCl_4 ; pero la diferencia no fue significativa ($t = 1,61$; $2P > 0,1$).

Los resultados obtenidos con respecto a la incorporación de etanol en lípidos, que aparecen en la Tabla IV, muestran

TABLA II

Actividad recuperada en los lípidos de cortes de tejido adiposo de ratas testigos y tratadas con CCl_4 incubados durante 2 horas a 37°C en presencia de 0,2 mg/ml de etanol-1- C^{14} y en ausencia de glucosa. Los valores están expresados en micromoles de etanol incorporados en los lípidos por gramo de tejido adiposo fresco en 2 horas.

Linaje	Sexo	N	Testigos $\mu\text{mole/g}^*$	N	Tratados con CCl_4 $\mu\text{mole/g}^*$
A	M	4	0,37 \pm 0,05	8	0,84 \pm 0,10
A	F	4	0,32 \pm 0,05	8	0,73 \pm 0,09
B	M	4	0,32 \pm 0,05	6	0,73 \pm 0,12
B	F	4	0,37 \pm 0,07	8	0,73 \pm 0,11
A + B	M + F	16	0,35 \pm 0,02	30	0,76 \pm 0,05

* Media aritmética \pm su error típico.

TABLA III

Actividad recuperada en el CO_2 durante 2 horas de incubación de cortes de tejido adiposo de ratas testigos y tratadas con CCl_4 , incubados en presencia de 2 mg/ml de etanol- 1-C^{14} y de 3,6 mg/ml de glucosa o en ausencia de este substrato. Los valores están expresados en micromoles de etanol oxidados hasta CO_2 por gramo de tejido adiposo fresco en 2 hrs.

Linaje	Sexo	N	Testigos		N	Tratados con CCl_4	
			Sin glucosa $\mu\text{mole/g}^*$	Con glucosa $\mu\text{mole/g}^*$		Sin glucosa $\mu\text{mole/g}^*$	Con glucosa $\mu\text{mole/g}^*$
A	M	4	2,25 \pm 0,51	2,25 \pm 0,51	5	3,80 \pm 0,80	4,04 \pm 0,80
A	F	4	3,45 \pm 0,96	4,15 \pm 1,26	5	4,60 \pm 0,38	3,80 \pm 0,40
B	M	7	2,91 \pm 0,56	3,01 \pm 0,44	8	3,91 \pm 0,16	3,26 \pm 0,43
B	F	4	2,95 \pm 0,52	2,75 \pm 0,32	4	4,60 \pm 1,01	4,35 \pm 0,88
A+B	M+F	19	2,90 \pm 0,24	3,04 \pm 0,34	22	4,16 \pm 0,25	3,76 \pm 0,29

* Media aritmética \pm su error típico.

en primer lugar una mayor incorporación del carbón 1 del etanol en lípidos cuando la incubación se realiza en presencia de glucosa.

Como no se observaron diferencias significativas entre sexos o linajes, los datos pueden considerarse en conjunto, tanto para la comparación del efecto de la glucosa como para el tratamiento con CCl_4 . La diferencia en la incorporación de etanol en los lípidos en los testigos incubados con y sin glucosa es altamente significativa ($t=3,64$; $2P < 0,001$). En el grupo de animales cirróticos esta diferen-

cia fue también significativa ($t=5,59$; $2P < 0,001$).

Si se compara la incorporación de etanol en los lípidos del tejido adiposo proveniente de ratas testigos y de cirróticas tanto en presencia como en ausencia de glucosa, se observa que la incorporación fue en ambos casos significativamente mayor en el grupo de animales cirróticos. La comparación del promedio de todos los grupos muestra que en los experimentos en ausencia de glucosa la incorporación fue 4 veces mayor en el tejido adiposo proveniente de ratas cirróticas que

TABLA IV

Actividad recuperada en los lípidos de cortes de tejido adiposo incubados durante 2 horas en presencia de 2 mg/ml de etanol- 1-C^{14} y de 3,6 mg/ml de glucosa o en ausencia de este substrato. Los valores están expresados en micromoles de etanol incorporados en lípidos por gramo de tejido adiposo fresco en 2 horas.

Linaje	Sexo	N	Testigos		N	Tratados con CCl_4	
			Sin glucosa $\mu\text{mole/g}^*$	Con glucosa $\mu\text{mole/g}^*$		Sin glucosa $\mu\text{mole/g}^*$	Con glucosa $\mu\text{mole/g}^*$
A	M	4	0,40 \pm 0,11	1,00 \pm 0,23	5	1,26 \pm 0,44	3,32 \pm 0,35
A	F	4	0,38 \pm 0,14	0,98 \pm 0,38	4	1,45 \pm 0,47	4,22 \pm 0,81
B	M	6	0,35 \pm 0,08	0,70 \pm 0,14	7	1,46 \pm 0,45	3,20 \pm 0,87
B	F	4	0,18 \pm 0,05	0,45 \pm 0,07	4	0,55 \pm 0,07	4,08 \pm 0,60
A+B	M+F	18	0,33 \pm 0,05	0,77 \pm 0,11	20	1,23 \pm 0,21	3,61 \pm 0,37

* Media aritmética \pm su error típico.

en el de los testigos ($t=4,09$; $2 P<0,001$), y, en los experimentos realizados en presencia de glucosa los promedios fueron más de 4 veces superior en los cirróticos que en los testigos ($t=7,39$; $2 P<0,001$).

DISCUSIÓN

Los resultados experimentales muestran claramente que en el animal expuesto crónicamente a la inhalación de CCl_4 durante el tiempo necesario para que se produzca cirrosis hepática, se origina algún cambio que determina una mayor incorporación del etanol en los lípidos del tejido adiposo in vitro, y confirman que esta incorporación es facilitada por la presencia de glucosa en el medio de incubación.

Como el objetivo principal de este estudio ha sido conocer si el descenso más rápido de la alcoholemia que se observa en los animales intoxicados con CCl_4 podría explicarse por una mayor salida del etanol por un camino metabólico que no conduce directamente a CO_2 , es necesario discutir si estos resultados muestran que esta vía podría ser la incorporación en los lípidos del tejido adiposo. El valor del descenso de la alcoholemia (β) en los animales cirróticos referidos en el trabajo anterior ya mencionado (1) fue de $-0,236$ mg por ml de sangre por hora y el de los testigos respectivamente de $-0,157$; la diferencia fue entonces de $-0,079$ mg/ml/hora. El promedio de r en la rata encontrado por Aull *et al.* (10) fue de 0,90, de modo que la diferencia corresponde aproximadamente a 71 μg por gramo de peso corporal y por hora. Ahora bien, la diferencia de la velocidad de incorporación del etanol en lípidos del tejido adiposo entre cirróticos y testigos fue: $3,61 - 0,77 = 2,84$ $\mu\text{mole/g}$ en 2 horas, o sea 1,42 $\mu\text{mole/g}$ y hora, lo que corresponde a 65 μg de etanol por gramo de tejido adiposo y por hora.

En consecuencia, si la actividad metabólica del tejido adiposo in vitro fuera equivalente a la que se produce in vivo, la diferencia de la incorporación del etanol en el tejido adiposo de animales intoxicados con CCl_4 y testigos permitiría explicar sólo una parte de la diferencia de la velocidad del descenso de la curva de la alcoholemia entre ambos. Si denominamos p el peso corporal de la rata en gramos y a la relación entre el peso

del tejido adiposo total y el peso corporal, esta parte sería: $(65 \times p \times a) : (71 \times p)$, o sea aproximadamente igual a a . En consecuencia esta diferencia sólo da cuenta aproximadamente de la proporción del descenso de la alcoholemia que corresponde a la proporción del peso total de la rata representada por el tejido adiposo.

No es imposible que en el animal entero, donde las grasas del tejido adiposo son movilizadas a la circulación general, la velocidad de incorporación de etanol pudiera ser más alta que in vitro y, por consiguiente, pudiera explicarse una proporción mayor de la diferente velocidad de desaparición del etanol de la sangre en las ratas tratadas con CCl_4 y testigos. No tenemos elementos de juicio para saber si esta suposición es real y, menos aún, para estimar cuantitativamente la importancia que pudiera tener esta eventual diferencia entre lo que sucede in vivo e in vitro.

Como es sabido que el acetato se incorpora también en los lípidos del tejido adiposo durante la incubación, es posible que la incorporación del etanol se haga previa oxidación a acetato activo. Si así fuera, habría que pensar que el factor limitativo de la producción de CO_2 a partir del etanol en la incubación de tejido adiposo no sería la deshidrogenasa alcohólica, porque en tal caso el aumento de la incorporación del etanol en lípidos del tejido adiposo —ya sea por la presencia de glucosa en el medio de incubación, ya sea por intoxicación previa del animal con CCl_4 — debería ir acompañado de una disminución de la proporción que llega a CO_2 , lo que no sucede. Al contrario, la actividad recuperada en el CO_2 en los experimentos de incubación sin glucosa fue significativamente mayor en los experimentos realizados con tejido adiposo proveniente de animales tratados que en el grupo testigo.

Los experimentos no permiten concluir nada con respecto a la naturaleza de las alteraciones producidas por el tratamiento con CCl_4 que causan las diferencias mencionadas.

La comparación de los resultados obtenidos en los experimentos realizados con 0,2 mg/ml de etanol en el medio con aquellos en que se usó 2 mg/ml, muestran que la oxidación fue significativamente mayor (testigos: $t=8,8$; $2 P<0,001$

y cirróticos: $t = 14,0$; $2 P < 0,001$) con concentración de etanol más alta. En cambio, la incorporación en lípidos fue equivalente con ambas concentraciones de etanol en los experimentos testigos ($t = 0,35$; $2 P > 0,7$ y levemente mayor con concentración más alta de etanol en los experimentos realizados con tejido adiposo de ratas cirróticas ($t = 2,15$; $2 P < 0,05$).

SUMMARY

The influence of chronic intoxication with CCl_4 and of the presence of glucose in the incubation medium on the ethanol metabolism by adipose tissue was studied in slices of mesenteric fat from rats of both sexes belonging to the "nondrinker" (A) and "drinker" (B) strains. Control groups of untreated rats were studied.

The experimental rats were forced to breath an atmosphere containing CCl_4 vapors one minute daily during at least ten weeks. Only rats exhibiting clear macroscopic liver cirrhosis were employed.

About 500 mg of slices obtained immediately after killing the rats were incubated in 5 ml Krebs phosphate buffer containing 0.2 or 2 mg/ml of ethanol- $1-C^{14}$. In some experiments glucose was added at a concentration of 3.6 mg/ml. After 2 hours of incubation, the proportion of the activity found in CO_2 and in the lipids was measured.

The results obtained in experiments with 0.2 mg/ml of ethanol showed that the oxidation of the carbon one of ethanol to CO_2 (Table I) was not influenced by chronic intoxication with CCl_4 and that the incorporation of this carbon into lipids (Table II) was significantly higher ($2 P < 0.001$) in adipose tissue from rats exhibiting liver cirrhosis than in controls.

In the experiments in which the incubation medium contained 2 mg/ml of ethanol and no glucose, the oxidation of etha-

nol to CO_2 was significantly higher ($2 P < 0.01$) in the adipose tissue of treated rats than in the controls.

The addition of glucose to the incubation medium increased the incorporation of ethanol into lipids from either intoxicated or control rats (Table IV) and did not influence the oxidation of ethanol to CO_2 (Table III).

The comparison of the data obtained in the experiments with 0.2 and 2 mg/ml of ethanol showed that the rate of oxidation to CO_2 was significantly higher with the higher concentration ($2 P < 0.001$). In contradistinction the incorporation of ethanol into lipids was equivalent ($2 P > 0.7$) with both concentrations in control experiments and only a little higher with the 2 mg/ml concentration in cirrhotic rats ($2 P < 0.05$).

No difference of sex or strain concerning the studied fate of ethanol was observed.

REFERENCIAS

- 1.—CAMPOS, I., SOLODKOWSKA, W., MUÑOZ, E., SEGOVIA-RIQUELME, N., CEMBRANO, J. y MARDONES, J. — *Quart. J. Stud. Alcohol.* 25:417, 1964.
- 2.—SOLODKOWSKA, W., MUÑOZ, E., FIGUEROA, I., SEGOVIA-RIQUELME, N. y MARDONES, J. — *Quart. J. Stud. Alcohol.* 25:423, 1964.
- 3.—FROESH, E. R. y GINSBERG, J. L. — *J. Biol. Chem.* 237:3317, 1962.
- 4.—WINEGARD, A. J. y RENOLD, A. E. — *J. Biol. Chem.* 233:267, 1958.
- 5.—LANDAU, B. R. y KATZ, J. — *J. Biol. Chem.* 239:697, 1964.
- 6.—LIEBER, S. y SCHMID, R. — *J. Clin. Invest.* 40:394, 1961.
- 7.—VAUGHAN, M. — *J. Lipid. Res.* 2:293, 1961.
- 8.—MARDONES, J. — *Int. Rev. Neurobiol.* 2:41, 1960.
- 9.—MEDES, J., THOMAS, A. y WEINHOUSE, S. — *J. Biol. Chem.* 197:181, 1952.
- 10.—AULL, Y. C. Jr., ROBERTS, W. Y. Jr. y KINARD, E. W. — *Am. J. Physiol.* 186:380, 1956.