

## EFFECTO DEL ETANOL SOBRE LA DISTRIBUCION DE $Mn^{54}$ EN HIGADO Y OTROS ORGANOS DE CONEJO

Salvador González\* y Ernesto Bonilla\*\*

### RESUMEN

Se estudió el efecto del etilismo agudo y crónico sobre la distribución de  $Mn^{54}$  en hígado y otros órganos de conejos.

El etilismo agudo disminuye la fijación de  $Mn^{54}$  en hígado y bazo (cpm/g de tejido húmedo) y aumenta la concentración hepática de triglicéridos.

El etilismo crónico disminuye la fijación de  $Mn^{54}$  en hígado, riñón, bazo, intestino, corazón y sistema nervioso central. En hígado, al comparar las muestras con sus respectivos controles, la concentración de triglicéridos no varía y las proteínas disminuyen, por lo que se obtienen valores no significativos al expresar la fijación de  $Mn^{54}$  en función del contenido proteico. Se demostró una relación directa, tanto en las muestras como en los controles, entre la concentración de proteínas y el  $Mn^{54}$  fijado en hígado. Es posible que la administración crónica de etanol, al disminuir los sitios de fijación (proteínas), condicione una rápida saturación con el manganeso frío proveniente de la dieta y, por consiguiente, una menor fijación del  $Mn^{54}$  a los tejidos.

---

\* Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

\*\* Sección de Neuroquímica Clínica. Instituto de Investigación Clínica. Apartado 1151. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia.

## INTRODUCCION

Se han demostrado variaciones significativas en la concentración de manganeso en el parénquima hepático después de la ingestión crónica de etanol o de dietas deficientes en colina (2, 3, 12, 20). La ingestión crónica de etanol incrementa los niveles de manganeso en hígado (3, 20), posiblemente debido a una mayor absorción del metal (20). La colina ha sido implicada en el transporte intestinal de manganeso (12) y su deficiencia en la dieta disminuye la concentración de manganeso en hígado, por inhibición del transporte intestinal del metal (3, 12). Se ha sugerido que el descenso en la concentración del manganeso hepático pudiera ser un factor causal en la patogenia del hígado graso producido por dietas deficientes en colina (12). Como se vé, estos dos factores, implicados en la patogenia del hígado graso (etilismo y deficiencia en colina), tienen efectos opuestos sobre la concentración del manganeso en hígado (2, 3, 12, 20).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración aguda y crónica de etanol sobre la distribución e incorporación de  $Mn^{54}$  en hígado y diferentes órganos, con el propósito de obtener una mayor información concerniente a las interrelaciones alcohol-manganeso en ambas condiciones experimentales.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 24 conejos, los cuales fueron divididos en dos series experimentales: Etilismo Agudo y Etilismo Crónico.

El isótopo se administró por vía parenteral con el objeto de demostrar, libre de influencia transmural, el efecto del etanol sobre la fijación de  $Mn^{54}$  en hígado y diferentes órganos.

**Etilismo Agudo.** Catorce conejos jóvenes, de ambos sexos y peso promedio de  $2.214 \pm 360$  g fueron divididos en 2 grupos de 7 animales (muestra y control). Ambos grupos recibieron una dieta consistente en Conejarina (Protinal, Maracaibo, Venezuela) suplementada con vegetales frescos. Al grupo muestra se dejó en ayunas por 12 horas y se le produjo etilismo agudo mediante la administración endovenosa, a través de la vena marginal de la oreja, de alcohol etílico absoluto (2 g/kg peso) diluido en igual volumen de solución salina fisiológica. La solución alcohólica se inyectó mediante infusión continua de 5 minutos de duración. La dosis fue suficiente para provocar pérdida de la motilidad voluntaria durante 15 minutos, con recuperación parcial de la misma al cabo de una hora. Al grupo control (en ayunas) se le administró solución salina fisiológica equivalente, en volumen, al utilizado de solución alcohólica diluida. En cada sesión de trabajo

los conejos fueron procesados en parejas: una muestra y un control. Exactamente 15 minutos después de la inyección de la solución, a cada animal le fue administrada, por vía endovenosa, una dosis estándar de 5  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{Mn}^{54}$  diluido en 0,5 ml de solución salina fisiológica, seguida de 2 ml de la última solución. Los animales se sacrificaron por decapitación, 60 minutos después, previa obtención de una muestra de sangre por punción cardíaca. Como anticoagulante se utilizó EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetate) a razón de 1 mg/ml sangre. Inmediatamente se extrajeron, lavaron en solución salina fisiológica fría, congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se pesaron, cada uno de los siguientes órganos: corazón, hígado, bazo, riñón, segmento distal del miembro posterior derecho (tejido periférico), sistema nervioso central (SNC) (excepto médula) y un segmento de intestino delgado (20 cm a partir del píloro) cuyo lumen fue lavado con 40 ml de solución salina fisiológica (lavado intestinal).

**Etilismo Crónico.** Diez conejos jóvenes, de ambos sexos y peso promedio de  $2.310 \pm 200$  g fueron divididos en 2 grupos de 5: muestra y control.

Al grupo muestra se le administró, *ad libitum*, en lugar del agua de bebida, alcohol etílico disuelto en agua (3 g/100 ml), durante 3 semanas, al cabo de las cuales la dosis de alcohol se duplicó a 6 g/100 ml. Esta última dosis se mantuvo por 4 semanas más. El grupo control ingirió solamente agua corriente. Cumplido el lapso señalado, a cada animal se le administró, por vía endovenosa, 5  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{Mn}^{54}$  disuelto en 0,5 ml de solución salina fisiológica y luego se procedió de igual forma a la descrita en la serie correspondiente a Etilismo Agudo.

En ambas series se utilizó  $\text{Cl}_2\text{Mn}^{54}$  libre de transportador (Amersham/Searle) y la radioactividad de los órganos fue medida en contador de cuerpo entero tipo Armac (Packard Instrument Co., La Grange, Illinois).

Se prepararon homogeneizados de hígado en 10 volúmenes de sacarosa 0,25 M pH 7,4 y, en alícuotas del mismo, se determinaron: a) proteínas totales por el método de Lowry y col. (14); b) triglicéridos por el método de Fletcher (11) modificado mediante el uso de un blanco para cada muestra (sin previa hidrólisis con KOH); c) alcohol etílico (etanol) por el método de Bonnichsen-Theorell (6).

En el plasma se midió igualmente la concentración de etanol por el método de Bonnichsen-Theorell (6) y la radioactividad se determinó en un contador de pozo (Packard Instrument Co., La Grange, Illinois).

Todos los reactivos utilizados fueron de un alto grado de pureza (para análisis) y no ameritaron purificación ulterior.

Para comprobar la significación estadística de los resultados obtenidos en los controles y en los animales objeto de estudio, se determinaron los valores de t (prueba t de Student) para cada órgano (1). Se calculó el coeficiente de correlación y la línea de regresión para demostrar la relación existente entre la concentración de proteína y de  $Mn^{54}$  en el hígado de los conejos sometidos a etilismo crónico (1).

## RESULTADOS

**Etilismo Agudo:** En la tabla I se presenta la distribución de  $Mn^{54}$  en diferentes órganos. El orden de fijación del isótopo a los órganos y tejidos de los animales control fue el siguiente: hígado > riñón > bazo > intestino > corazón > tejidos periféricos > SNC > plasma. En los conejos sometidos a etilismo agudo se observó un cambio en esta relación a nivel del bazo, intestino y corazón (corazón > intestino > bazo). Al comparar las muestras con sus respectivos controles se aprecia una disminución estadísticamente significativa, en la fijación del isótopo en el hígado ( $p < 0,02$ ) y el bazo ( $p < 0,001$ ) de los animales inyectados con etanol. No se observaron variaciones significativas en los otros órganos estudiados.

TABLA I  
ETILISMO AGUDO. DISTRIBUCION DE  $Mn^{54}$  EN DIFERENTES ORGANOS Y TEJIDOS\*

	Hígado	Riñón	Bazo	Intestino	Lavado Intestinal**	Corazon	Tejidos Periféricos	Sistema Nervioso Central	Plasma
Control	35.002 ± 4.060	21.541 ± 2.408	12.043 ± 652	8.468 ± 554	1.156 ± 429	6.973 ± 1.036	613 ± 125	318 ± 26	225 ± 29
Muestra	23.546 ± 2.819	19.849 ± 1.701	5.961 ± 954	7.675 ± 815	1.871 ± 898	8.875 ± 2.128	604 ± 135	400 ± 92	240 ± 46
p	< 0,02	N. S. ***	< 0,001	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.

\* cpm/g de tejido húmedo. Los valores representan las medias ± error estándar.

\*\* cpm/volumen de lavado.

\*\*\* No significativo.

En la tabla III se presentan los niveles de proteínas totales y triglicéridos en hígado. Las proteínas totales no experimentan variación mientras que los triglicéridos aumentan ( $p < 0,001$ ) en todos los casos de etilismo agudo.

En la tabla IV puede observarse que los niveles de fijación del isótopo en hígado permanecen invariables cuando se expresan en función del contenido proteico (cpm/g de proteínas).

La concentración de etanol en las muestras resultó altamente significativa ( $p < 0,001$ ) al compararlas con sus respectivos controles, en los cuales no fue detectable. No hubo diferencias significativa ( $t = 1,46$ ,  $p < 0,2$ ) entre la concentración de etanol en plasma ( $1,94 \pm 0,15$  mg/g) e hígado ( $1,54 \pm 0,25$  mg/g).

**TABLA II**  
ETILISMO CRONICO. DISTRIBUCION DE Mn<sup>54</sup> EN DIFERENTES ORGANOS Y TEJIDOS\*

	Higado	Riñon	Bazo	Intestino	Lavado Intestinal**	Corazon	Tejidos Perifericos	Sistema Nervioso Central	Plasma
Control	29.030 ± 2.574	18.747 ± 575	10.175 ± 552	8.354 ± 561	928 ± 212	5.418 ± 221	363 ± 46	326 ± 24	127 ± 13
Muestra	18.083 ± 1.618	14.767 ± 1.524	7.066 ± 1.025	5.618 ± 524	1.087 ± 329	4.251 ± 205	446 ± 44	240 ± 23	123 ± 27
p	< 0,001	< 0,01	< 0,01	< 0,001	N. S. ***	< 0,001	N. S.	< 0,01	N. S.

\* cpm/g de tejido humedo. Los valores representan las medias ± error estandar

\*\* cpm/volumen de lavado

\*\*\* No significativo

**TABLA III**

ETILISMO AGUDO Y CRONICO. PROTEINAS Y TRIGLICERIDOS EN HIGADO\*

	ETILISMO AGUDO		ETILISMO CRONICO	
	Triglicéridos	Proteínas	Triglicéridos	Proteínas
Control	5,53 ± 0,48	205,85 ± 11,45	5,52 ± 1,55	236,20 ± 24,15
Muestra	13,50 ± 1,98	180,14 ± 13,13	5,67 ± 1,02	160,00 ± 7,60
p	< 0,001	N. S. **	N. S.	< 0,002

\* Los valores están expresados en mg/g de tejido húmedo y representan las medias ± el error estándar.

\*\* No significativo

**Etilismo crónico:** En la tabla II se presenta la distribución de Mn<sup>54</sup> en diferentes órganos y tejidos. Se conserva el mismo orden decreciente de fijación señalado en etilismo agudo, tanto en las muestras como en los controles. Se aprecia disminución en la fijación del isótopo en la mayoría de los órganos (hígado, riñón, bazo, intestino, corazón y SNC). En plasma, tejidos periféricos y lavado intestinal, los niveles de fijación permanecen invariables.

En la tabla III puede observarse que, en oposición al etilismo agudo, los niveles de triglicéridos en tejido hepático no varían, mientras que el contenido de proteínas disminuye hasta niveles estadísticamente significativos ( $p < 0,002$ ).

TABLA IV

ETILISMO AGUDO Y CRONICO. DISTRIBUCION DE  $Mn^{54}$  EN HIGADO\*

	ETILISMO AGUDO		ETILISMO CRONICO	
	cpm/g Tejido	cpm/g Proteína	cpm/g Tejido	cpm/g Proteína
Control	35.002 ± 4.060	164.327 ± 15.879	29.039 ± 2.574	123.544 ± 1.924
Muestra	23.546 ± 2.819	129.157 ± 8.865	18.083 ± 1.618	112.565 ± 5.654
p	< 0,02	N.S.**	< 0,001	N.S.

\* Los valores representan las medias ± el error estandar

\*\* No significativos

Al igual que en el etilismo agudo, la fijación de  $Mn^{54}$  en hígado no sufre variaciones al expresarla en función del contenido proteico (Tabla IV). En el hígado y el plasma de las muestras y de los controles no se detectaron niveles de etanol.

Al calcular el coeficiente de correlación entre la concentración de proteínas y la radioactividad del hígado se comprobaron valores significativos para las muestras ( $r = +0,90$ ) y los controles ( $r = +0,99$ ). En ambos casos la línea de regresión calculada se muestra en la Fig. 1.

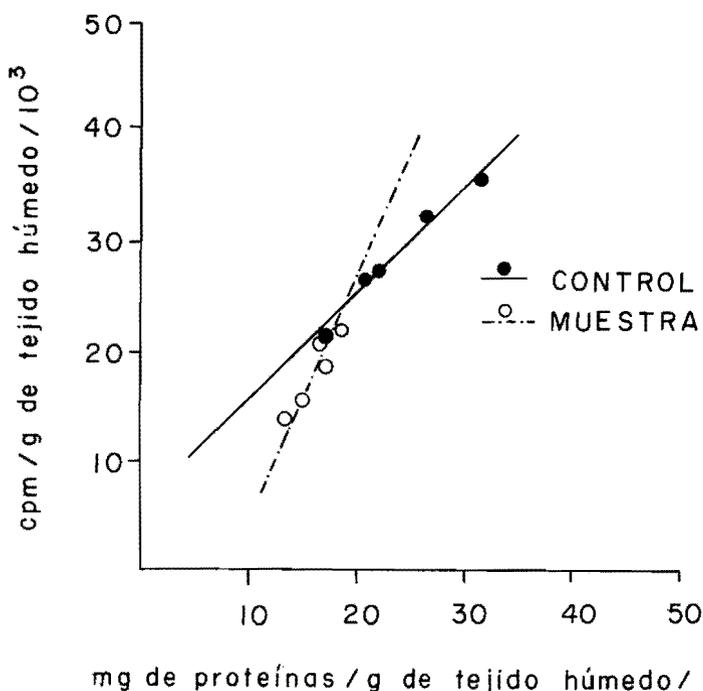


Fig. 1.— Etilismo crónico. Correlación entre fijación de  $Mn^{54}$  y concentración de proteínas en hígado.

## DISCUSION

En concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (4, 7, 9), la mayor fijación del isótopo se localiza en hígado y en otros órganos metabólicamente activos (Tablas I y II). Los bajos niveles plasmáticos de  $Mn^{54}$  observados 60 minutos después de su administración, son debido a una rápida incorporación tisular del isótopo (4, 7, 9).

Los resultados obtenidos demuestran que el etanol, o sus productos metabólicos, interfiere con la fijación de  $Mn^{54}$  en diferentes órganos.

**Etilismo Agudo.**- En el etilismo agudo la disminución en la fijación del isótopo, observable en hígado y bazo, podría explicarse por alteraciones en la permeabilidad celular.

El pH tisular es factor importante en la fijación de manganeso. La acidez disminuye, *in vitro*, la fijación de  $Mn^{54}$  en homogeneizados de hígado (5). En tales circunstancias, cambios en el potencial redox NADH/NAD con desviación hacia la derecha en la relación piruvato/lactato observada en etilismo agudo (13, 19), podría igualmente explicar la menor fijación del isótopo por disminución del pH tisular. Sin embargo, es muy cuestionable que se produzcan variaciones acentuadas del pH, *in vivo*, como para alterar la fijación de  $Mn^{54}$  a nivel del tejido hepático.

El aumento de la concentración hepática de los triglicéridos, después de la administración de una dosis única de etanol, ha sido explicado en base a una disminución marcada de la oxidación de los ácidos grasos (10). Sin embargo, no hay que olvidar que el etanol produce un aumento en la tasa de síntesis de los ácidos grasos y en la movilización de los mismos a partir del tejido adiposo. Todos estos factores condicionan un mayor aporte de ácidos grasos al hígado y producen, por consiguiente, un incremento en la síntesis de triglicéridos a nivel de dicho órgano (15).

**Etilismo Crónico.**- En la mayoría de los órganos hay descenso significativo en la fijación de  $Mn^{54}$ , excepto en plasma, tejidos periféricos y lavado intestinal.

Se ha demostrado que el etanol, al favorecer la absorción intestinal, incrementa los niveles de manganeso estable en el hígado (3, 20). En nuestras condiciones experimentales es posible que sobredepósitos de manganeso estable en hígado, condicionen una menor fijación de  $Mn^{54}$ . En apoyo de tal suposición es importante recordar que en humanos sólo un 3% del manganeso ingerido es absorbido (16) y que la alimentación, suplementada con vegetales, garantiza un elevado contenido de manganeso en la die-

ta (21). En tales circunstancias, es lógico pensar que factores como el etanol, al favorecer la absorción de manganeso (20), puedan incrementar considerablemente su concentración, no sólo en hígado, sino también en otros órganos. La demostración de que tanto *in vivo* (8, 17, 18) como *in vitro* (5), existe un equilibrio dinámico entre manganeso estable y  $Mn^{54}$ , refuerza el concepto previamente expuesto de que sobredepósitos de manganeso estable condicionan una menor fijación de  $Mn^{54}$ . *In vivo* ha sido demostrado que el  $Mn^{54}$ , previamente fijado a los tejidos, puede ser desplazado cuando se administra manganeso estable (8, 17, 18), y se ha señalado que la adición de  $MnCl_2$  a homogeneizados de hígado incubados *in vitro*, disminuye la captación de  $Mn^{54}$  (5).

La significación estadística del descenso en la fijación de  $Mn^{54}$  se pierde cuando se expresa en función del contenido proteico; ésto es debido posiblemente a una disminución en la concentración de proteínas totales. La configuración de la línea de regresión y el hallazgo de coeficientes de correlación significativos entre la concentración de proteína y  $Mn^{54}$  fijado en hígado, tanto en controles como en muestras, sugiere una estrecha relación entre ambos parámetros. La disminución en los sitios de fijación (las proteínas), condicionaría una rápida saturación con el manganeso estable proveniente de la absorción intestinal y una menor fijación del  $Mn^{54}$  en el hígado.

En los casos de ingestión prolongada de etanol se han reportado descensos en la biosíntesis de fosfatidilcolina en microsomas de hígado de ratas (22). Este descenso de fosfatidilcolina también podría relacionarse con la disminución en la fijación de  $Mn^{54}$  por menor disponibilidad de sitios de fijación (fosfolípidos) (5); problema éste semejante a lo que pasa con el descenso en la concentración de proteínas, observable en el etilismo crónico.

## SUMMARY

**The effect of ethanol on the  $Mn^{54}$  distribution in liver and other organs of rabbit.** González S. (Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela) and Bonilla E.- *Invest. Clín.* 17(2): 87-96, 1976.- In this paper we describe the effect of acute and chronic ethanol administration on  $Mn^{54}$  distribution in liver and other organs of rabbit after the intravenous injection of the isotope. Acute ethanol administration produced a decrease in  $Mn^{54}$  content of liver and spleen. In the former it was also observed and increase in triglycerides concentration. After chronic ethanol administration a significant drop in  $Mn^{54}$  content was observed in liver, kidney, spleen, intestine, heart and the central nervous system. Since liver protein content also diminished, it is possible that

any decrease in the sites of manganese binding (proteins) produces a quick saturation of those sites with stable manganese coming from the diet so as to produce a decrease in hepatic Mn<sup>54</sup> uptake. No change in the concentration of liver triglycerides was found.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BANCROFT H: Introducción a la Bioestadística. Editorial Universitaria. Buenos Aires, 1960.
- 2- BARAK AJ, BECKENHAVER HC, KERRIGAN FJ: Zinc and manganese levels in serum and liver after alcohol feeding and development of fatty cirrhosis in rat. Gut 8: 454-457, 1967.
- 3- BARAK AJ, KEEFER RC, TUMA DJ: The possible role of manganese in hepatic lipid transport. Nutr Rept Int 3: 243-246, 1971.
- 4- BONILLA E, DIEZ-EWALD M: Role of submaxillary glands in radiomanganese metabolism. Experientia 28: 1151-1153, 1972.
- 5- BONILLA E: Estudios in vivo e in vitro del metabolismo del manganeso. Manganismo crónico experimental y catecolaminas. Invest Clín 15(2): 2-79, 1974.
- 6- BONNICHSEN RK, THEORELL H: An enzymatic method for the micro determination of ethanol. Scand J Clin Lab Invest 3: 58, 1951.
- 7- BRITTON AA, COTZIAS GC: Dependence of manganese turnover on intake. Am J Physiol 211: 203-206, 1966.
- 8- COTZIAS GC, GREENOUGH JJ: The high specificity of the manganese pathway through the body. J Clin Inv 37: 1298-1305, 1958.
- 9- DASTUR DK, MANGHANI DK, RAGHAVENDRAN KV, JEEJEEBHOY KN: Distribution and fate of Mn<sup>54</sup> in the rat, with special reference to the C.N.S. J Exp Physiol 54: 322-331, 1969.
- 10- DILUZIO NR, HARTMAN AD: Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ethanol-induced fatty liver. Fed Proc 26: 1436-1442, 1967.
- 11- FLETCHER MJ: A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin Chim Acta 22: 393-397, 1968.
- 12- KEEFER RC, TUMA DJ, BARAK AJ: Relationship of hepatic trace metals to intestinal transport in choline deficient rats. Amer J Clin Nutr 26: 409-414, 1973.

- 13-- LIEBER CS: Progress in gastroenterology. Hepatic and metabolic effects of alcohol. *Gastroenterol* 65: 821-846, 1973.
  - 14-- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
  - 15-- MASORO EJ: *Physiological Chemistry of lipids in mammals*. p. 257, WB Saunders, Philadelphia, 1968.
  - 16-- MENA I, VASQUEZ A, HORIUCHI K, COTZIAS GC: Absorción intestinal del manganeso, factor de susceptibilidad de manganesismo crónico. *Rev Biol Med Nucl* 1: 27-33, 1969.
  - 17-- MENA I, HORIUCHI K, BURKE K, COTZIAS GC: Chronic manganese poisoning. Individual susceptibility and absorption of iron. *Neurology* 19: 1000-1006, 1969.
  - 18-- MENA I, LOPEZ G, HORIUCHI K, ARANDA L: La barrera hemoencefálica y los oligoelementos: manganeso. *Rev Med Chile* 100: 171-174, 1972.
  - 19-- RAWAT AK, KURIYAMA K: Ethanol oxidation: Effect on the redox state of brain in mouse. *Science* 176: 1133-1135, 1972.
  - 20-- SCHAFER DF, STEPHENSON DV, BARAK AJ, SORRELL MF: Effects of ethanol on the transport of manganese by small intestine of the rat. *J Nutr* 104: 101-104, 1974.
  - 21-- SCHROEDER HA, BALASSA JJ, TIPTON IH: Essential trace metals in man. A study in man: manganese. A study in homeostasis. *J Chron Dis* 19: 545-571, 1966.
  - 22-- SKURDAL DN, CORNATZER WE: Effect of ethanol ingestion on liver microsomal phosphatidyl choline biosynthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 528-534, 1972.
-