

**ESTUDIO DE ALGUNOS EFECTOS DE LA SILIMARINA
SOBRE EL HIGADO DE POLLOS ESTROGENIZADOS:
HEPATOMEGALIA E INFILTRACION GRASA**

Por J. A. Sánchez García

INTRODUCCION

El papel que desempeña el hígado de las aves en el metabolismo de proteínas, grasas e hidratos de carbono y en la destoxicación de las sustancias xenobióticas con acción terapéutica o tóxica ha sido ampliamente estudiado.

El hígado actúa como órgano distribuidor de nutrientes para el organismo y dispone de una sorprendente flexibilidad metabólica que le permite, bajo mecanismos de inducción e inhibición enzimática, reajustar las fluctuaciones de la dieta a las necesidades del organismo en cada momento.

Sin embargo, esta flexibilidad metabólica la podemos alterar a voluntad de muchas y variadas maneras.

Entre las sustancias que actúan provocando disfunción hepática podemos citar tóxicos diversos, sustancias que se comportan como antimetabolitos y algunos principios hormonales.

Entre estos últimos, las hormonas sexuales femeninas influyen poderosamente en el papel que el hígado desempeña en funciones tan esenciales como el metabolismo de grasas y proteínas.

De todas las interacciones que los principios hormonales pueden exhibir frente a las principales funciones del hígado, llama poderosamente la atención el efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre la formación de lípidos y proteínas plasmáticas, metabolismo del colesterol y función depuradora hepática en la gallina (*Gallus domesticus*, L. Gaernt)¹.

Las hormonas esteroídicas, uniéndose a proteínas receptoras específicas presentes en el citoplasma de las células efectoras, actúan modulando funciones tan importantes como la síntesis de proteínas plasmáticas¹, oxidación de fosfolípidos y triglicéridos², metabolismo del colesterol, producción de acetyl-CoA, alteraciones del equilibrio hidromineral y síntesis de sales biliares. La depuración biliar de tóxicos también está influida por la presencia de sustancias estrogénicas.

An. Fac. Vet. León., 1983, 29, 149-156.

Los principales estrógenos que se han detectado en las aves son el 17-beta-estradiol y la estrona, presentes en el ovario y en la excreta de las gallinas adultas y en el testículo de los machos^{1, 5}.

Los estrógenos sintéticos, que han sido empleados para mejorar la calidad de la canal de los pollos, exhiben tanto en machos como en hembras, una notable actividad hiperlipemiante, una positiva influencia en la formación y depósito de grasas y proteínas en el hígado y producen importantes alteraciones en la síntesis de fosfolípidos y colesterol.

En el presente trabajo nos hemos planteado el estudio de los efectos que sobre el tamaño del hígado y la infiltración grasa en el mismo puede tener una sustancia de origen natural, la silimarina (principio activo de los frutos de *Silybum marianum*, L. Gaernt. de la familia de las Compuestas o Synanthereas), que goza de un gran predicamento terapéutico en la clínica de diversas hepatopatías en la especie humana, administrada previa, simultánea o posteriormente a la caponización química de pollitos en crecimiento con benzoato de estradiol.

Químicamente la silimarina es un flavonoide formado por la condensación de una molécula de taxifolina con un resto de alcohol coniferílico, correspondiendo su nomenclatura a la 3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona-(3'-metil-taxifolina).

MATERIAL Y METODOS

Los animales elegidos para esta experiencia fueron pollitos en crecimiento y se sometieron a las manipulaciones que se describen seguidamente, a partir de las cuatro semanas de edad.

Procedían de una estirpe de híbridos comerciales nacidos el mismo día y destinados a la producción de carne.

Se instalaron en baterías convencionales y fueron mantenidos con permanente iluminación y una temperatura ambiente entre 18-20°C. Los animales disponían de agua y alimento «ad libitum».

Se emplearon un total de 50 pollitos que se dividieron en 5 lotes de 10 animales cada uno, identificados de la siguiente manera:

Lote 0.—Blanco. Los pollos de este lote sólo recibieron durante la experiencia propilenglicol (vehículo en el que se disolvió la silimarina).

Lote A.—Testigo. Recibieron 5 mg/kg y día de benzoato de estradiol durante los primeros seis días de la experiencia.

Lote B.—Los animales pertenecientes a este lote recibieron 20 mg/kg y día de silimarina disuelta en propilenglicol durante seis días consecutivos; el séptimo día no se les administró tratamiento alguno y durante los seis días siguientes recibieron 5 mg/kg y día de benzoato de estradiol.

Lote C.—A estos animales se les administró silimarina y benzoato de estradiol simultáneamente durante los seis primeros días de la experiencia; una vez realizadas estas administraciones, los animales permanecieron en reposo hasta el momento del sacrificio.

Lote D.—En este lote, los pollos recibieron en primer lugar benzoato de estradiol (seis días), el séptimo día permanecieron en reposo y durante los seis días siguientes recibieron silimarina disuelta en propilenglicol.

En todos los casos la administración tanto del propilenglicol como la silimarina y el benzoato de estradiol se realizó por vía intraperitoneal.

La solución de silimarina se preparó a partir de silimarina valorada como silibina por C. H. BOEHRINGER SOHN INGELHEIM S.A.E., con una riqueza media del 62.8 %.

La duración total de la experiencia fue de quince días; al cabo de este tiempo los animales de cada lote se sacrificaron por exanguinación total mediante corte en la vena yugular.

Los animales fueron pesados inmediatamente antes del sacrificio, procediéndose después de éste con toda rapidez a la extracción del hígado.

Las pesadas de los hígados se realizaron previa separación de la vesícula biliar y desecación, no considerándose peso válido hasta conseguir pesada constante.

Para llevar a cabo la extracción de la grasa hepática optamos por un método gravimétrico convencional, el de Thayer et al.⁷, utilizando para ello una solución de cloroformo/metanol (2/1) (v/v). En todos los casos partimos de muestras de 5 gramos de hígado aproximadamente.

A partir de estas muestras de grasa hepática se dispuso la cuantificación de las fracciones de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos, para lo cual cada muestra se disolvió en 20 ml de cloroformo y se pasó a tubos de vidrio con junta de teflón, para evitar la evaporación del solvente.

Antes de cerrar estos tubos se eliminaron las trazas de aire bajo corriente de nitrógeno, llevando los envases finalmente a un arcón congelador, a -20°C, hasta el momento de proceder a su fraccionamiento.

Para determinar la composición en distintas fracciones de los lípidos presentes en la grasa hepática se procedió a su separación mediante cromatografía en columna de ácido silíceico/celita, de acuerdo con el método descrito por Hirsch y Ahrens³.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 aparecen los valores medios del cociente peso hígado/peso total de los animales, en los cinco lotes. Estos valores expresan el tanto por ciento en peso que representa el hígado de los pollos en relación al peso total del animal en el momento del sacrificio. También se incluyen las significaciones estadísticas de las diferencias entre estos valores medios con relación a los lotes blanco y testigo.

En la Tabla 2 presentamos los resultados obtenidos en cuanto a la acumulación grasa en el hígado de los pollos. Los valores medios que presentamos se

TABLA 1
Relación peso hígado/peso total. Porcentajes medios y límites de confianza del 95 por ciento

Lote 0 (1)	2.09 ± 0.11	Significación estadística de la comparación de los porcentajes medios (t) con el lote 0 (p) y el lote A (p').
Lote A	2.41 ± 0.14	
Lote B	2.56 ± 0.20	
Lote C	2.84 ± 0.32	
Lote D	2.78 ± 0.12	

(1) Lote 0. Blanco. Propilenglicol.
Lote A. Testigo. Benzoato de estradiol.
Lote B. Silimarina + benzoato de estradiol.
Lote C. Silimarina y benzoato de estradiol simultáneamente.
Lote D. Benzoato de estradiol + silimarina.

TABLA 2
Acumulación de lípidos en el hígado. Porcentaje sobre peso de hígado. Valores medios y límites de confianza del 95 por ciento

Lote 0 (1)	8.00 ± 1.19	Significación estadística de la comparación de los valores medios (t) con el lote 0 (p) y con el lote A (p').
Lote A	11.06 ± 1.28	
Lote B	8.23 ± 0.69	
Lote C	11.33 ± 0.95	
Lote D	10.01 ± 1.20	

(1) Lote 0. Blanco. Propilenglicol.
Lote A. Testigo. Benzoato de estradiol.
Lote B. Silimarina + benzoato de estradiol.
Lote C. Silimarina y benzoato de estradiol simultáneamente.
Lote D. Benzoato de estradiol + silimarina.

TABLA 3
Tasa de lípidos neutros en la grasa hepática. Porcentajes medios y límites de confianza del 95 por ciento

Lote 0 (1)	35.40 ± 8.96	Significación estadística de la comparación de los porcentajes medios (t) con el lote 0 (p) y con el lote A (p').
Lote A	53.87 ± 16.74	
Lote B	29.55 ± 6.47	
Lote C	30.82 ± 2.57	
Lote D	48.83 ± 3.71	

(1) Lote 0. Blanco. Propilenglicol.
Lote A. Testigo. Benzoato de estradiol.
Lote B. Silimarina + benzoato de estradiol.
Lote C. Silimarina y benzoato de estradiol simultáneamente.
Lote D. Benzoato de estradiol + silimarina.

TABLA 4
Tasa de glicolípidos en la grasa hepática. Porcentajes medios y límites de confianza del 95 por ciento

Lote 0 (1)	4.67 ± 1.07	Significación estadística de la comparación de los porcentajes medios (t) con el lote 0 (p) y con el lote A (p').
Lote A	7.76 ± 2.72	
Lote B	22.60 ± 6.45	
Lote C	8.40 ± 2.97	
Lote D	5.17 ± 0.46	

(1) Lote 0. Blanco. Propilenglicol.
Lote A. Testigo. Benzoato de estradiol.
Lote B. Silimarina + benzoato de estradiol.
Lote C. Silimarina y benzoato de estradiol simultáneamente.
Lote D. Benzoato de estradiol + silimarina.

TABLA 5
Tasa de fosfolípidos en la grasa hepática. Porcentajes medios y límites de confianza del 95 por ciento

Lote 0 (1)	53.65 ± 4.33	Significación estadística de la comparación de los porcentajes medios (t) con el lote 0 (p) y con el lote A (p').
Lote A	33.74 ± 14.8	
Lote B	43.31 ± 3.56	
Lote C	58.41 ± 1.46	
Lote D	41.30 ± 3.28	

(1) Lote 0. Blanco. Propilenglicol.
Lote A. Testigo. Benzoato de estradiol.
Lote B. Silimarina + benzoato de estradiol.
Lote C. Silimarina y benzoato de estradiol simultáneamente.
Lote D. Benzoato de estradiol + silimarina.

refieren a porcentaje de grasa sobre peso de hígado. Como en la tabla anterior, también se establecen comparaciones de estos valores medios en relación a los lotes blanco y testigo.

En las Tablas 3, 4 y 5 vienen expresados los resultados obtenidos en las determinaciones cuantitativas de las fracciones de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos, respectivamente. En todas ellas los valores medios obtenidos representan el porcentaje de cada fracción en relación al total de lípidos hepáticos. También se incluyen las estimaciones estadísticas de las comparaciones de las medias con las de los lotes blanco y testigo.

Índice de hepatomegalia

En los animales del lote 0, el hígado representa el 2.09 por ciento del peso total, porcentaje relativamente bajo ya que se trata de animales de gran desarro-

llo muscular y óseo que alcanzan pasos de 1.500 gramos al final de la experiencia y en los que, lógicamente, el hígado no ha aumentado de peso en la misma proporción.

La administración de benzoato de estradiol (lote A), como cabía esperar, aumenta de manera considerable el tamaño del hígado.

Cuando analizamos los resultados que se obtienen al emplear silimarina, tenemos que admitir que la introducción previa de este producto a la administración de benzoato de estradiol no altera de manera significativa el parámetro que estudiamos frente al resultado obtenido únicamente con el estrógeno.

Sin embargo, tanto la asociación silimarina más benzoato de estradiol como la administración consecutiva del estrógeno y silimarina posteriormente, producen aumento del índice peso del hígado/peso total, estadísticamente significativo en relación al que se obtiene para el lote que sólo recibe benzoato de estradiol.

Podemos, por tanto, afirmar que la silimarina, asociada simultáneamente al benzoato de estradiol o administrada con posterioridad a éste, produce una hepatomegalia adicional que ya se había atribuido a este producto en la especie humana y en la rata, cuando se administraba al mismo nivel de dosis⁶.

Infiltración grasa en el hígado

En cuanto a los resultados obtenidos en relación con la acumulación de lípidos en el hígado (Tabla 2), hemos encontrado en los animales sin tratamiento alguno tasas de lípidos en esta víscera de un 8,0 por ciento en relación al peso total del hígado.

La administración de benzoato de estradiol (lote A), provoca en los pollos un aumento significativamente importante en la deposición de grasa hepática.

Al administrar silimarina con anterioridad al estrógeno hemos comprobado que la infiltración grasa en el hígado es prácticamente igual a la que presentan los animales sin tratar y significativamente inferior a la de los animales que sólo recibieron benzoato de estradiol. En base a este hecho podemos señalar que esta pauta de administración previene en gran medida la infiltración grasa en el hígado provocada por el estrógeno.

Sin embargo, hemos observado que cuando la silimarina la administramos simultánea o posteriormente al benzoato de estradiol (lotes C y D), este efecto protector no se hace patente. Estos resultados nos inducen a pensar que la silimarina junto al benzoato de estradiol, o cuando éste ya ha provocado la esteatosis hepática, es incapaz de reparar la acción tóxica del estrógeno.

Fraciones lipídicas presentes en la grasa hepática

El benzoato de estradiol (lote A) manifiesta su acción por un aumento significativamente importante de la tasa de lípidos neutros (Tabla 3) y glicolípi-

dos (Tabla 4), así como por una disminución significativa de la fracción de fosfolípidos (Tabla 5).

La administración de silimarina con anterioridad al benzoato de estradiol (lote B), lleva consigo una normalización de la tasa de la fracción de lípidos neutros, una relativa recuperación de la fracción y un aumento considerable del porcentaje de glicolípidos.

La administración simultánea de ambas sustancias (lote C), recupera hasta valores normales, semejantes a los del lote en blanco, las tasas de las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos, aunque la fracción de glicolípidos sigue siendo significativamente más elevada que la de los animales que no recibieron tratamiento alguno.

A la vista de los resultados obtenidos en los lotes B y C, creemos poder afirmar que la silimarina, administrada previamente o con el benzoato de estradiol, determina que las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos se aproximen en términos cuantitativos a los observados en los animales sin tratar. En este sentido, la administración de silimarina, de alguna manera, evita la inversión de la cuantía de estas cantidades observada cuando se administra benzoato de estradiol. En ambos lotes, el aumento de la tasa de fosfolípidos por encima del nivel de lípidos neutros describe una situación de normalización en el metabolismo graso del hepatocito.

Cuando la silimarina se administra después del benzoato de estradiol, los animales presentan, sin embargo, una tendencia al aumento de la fracción de lípidos neutros a expensas de los fosfolípidos.

En este sentido estimamos que el benzoato de estradiol desvía el metabolismo graso hacia la síntesis y acumulación hepática de lípidos neutros, y la silimarina, en razón de su estructura química, provoca, de alguna manera, un aumento de la tasa de fosfolípidos, indicadora de la proliferación en los hepatocitos de estructuras membranas que justifican una cierta tendencia a la inducción enzimática por parte de esta sustancia.

RESUMEN

Se ha provocado a pollos machos en crecimiento una esteatosis hepática mediante la administración de benzoato de estradiol. Se estudian los efectos que sobre este hígado graso provoca la silimarina administrada previa, simultánea y posteriormente al estrógeno. Se han estudiado los siguientes parámetros: índice de hepatomegalia, acumulación de lípidos hepáticos y cuantificación de las fracciones de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos presentes en la grasa hepática.

STUDY OF SOME EFFECTS OF SILYMARIN ON LIVER OF STROGENIC CHICKENS: HEPATOMEGALIA AND FATTY INFILTRATION

SUMMARY

An hepatic steatosis has been provoked on male growing chickens with the administration of estradiol benzoate. The effects produced by silymarin administered before, while and after the strogen over the fatty liver were studied. The following parameters were studied: hepatomegalia rate, accumulation of hepatic lipids and the cuantification of neutral lipids, glycolipids and phospholipids fractions present on the hepatic fatty.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CAMPBELL, J. G. (1957). Studies on the influence of sex hormones on the avian liver. I: Sexual differences in avian liver clearance curves. *J. Endocrinol.* **15**, 339.
- 2) ENTENMANN, C.; LORENZ, F. W., y CHAIKOFF, I. L. (1940). The endocrine control of lipids metabolism in the bird. III. Effects of crystalline sex hormones on blood lipid of birds. *J. Biol. Chem.*, **134**, 495.
- 3) HIRSCH, J., y AHRENS, E. H. (1958). The separation of complex lipid mixtures by the use of silicic acid. *Chromatography*, **233**, 311.
- 4) LAYNE, D. S.; COMMON, R. S.; MAW, W. A., y FRAPS, R. M. (1958). Presence of estrone, estradiol and estriol in extracts of ovaries of laying hen. *Nature*, **181**, 351.
- 5) MAC RAE, H. F.; LAYNE, D. S., y COMMON, R. H. (1959). Formation of estrone, estriol and an unidentified steroid from estradiol in the laying hen. *Poultry Sci.* **38**, 681.
- 6) MONFORT, R.; ALEMANY, J. R.; SÁNCHEZ DE LA CUESTA, F., y ÁZCAR, J. (1972). Estudio experimental de los efectos hepatotróficos de la silymarina en ratas hepatectomizadas. *Medicina Suiza*, IV.
- 7) THAYER, R. H.; NELSON, E. C.; CLEMENS, E. T.; JOHNSON, R. R., y MALLE, A. L. (1973). Lipid composition of livers from laying hens. *Poultry Sci.* **52**, 2270.

CATEDRA DE TOXICOLOGIA Y VETERINARIA LEGAL
(Prof. Dr. ARTURO ANADON NAVARRO)

EFFECTO INHIBITORIO DE LA TETRACICLINA Y CLORTETRACICLINA SOBRE LA TRANSMISION NEUROMUSCULAR*

Por A. Anadón
R. Martínez-Larrañaga**
Fustel

INTRODUCCION

El bloqueo neuromuscular, como efecto secundario, en la terapia antimicrobiana es un problema bien conocido desde hace algún tiempo. Existen datos experimentales y clínicos que evidencian cómo diversos antibióticos pueden provocar respuestas adversas agudas o tóxicas de diferentes tipos, principalmente por depresión de ciertas funciones fisiológicas^{7, 8, 9}. Se ha demostrado que se puede originar una parálisis muscular por cuatro grupos principales de antibióticos: aminoglicósidos, polimixinas, tetraciclina y lincosamidas. Sin embargo, los mecanismos de acción de estos grupos de antibióticos no están del todo elucidados y existe controversia sobre sus lugares de acción^{12, 13, 15, 17, 18}. Los principales mecanismos neuromusculares que se sugieren implicados son: a) reducción de la liberación de acetilcolina (ACh) de las terminaciones nerviosas; b) bloqueo de receptores postsinápticos colinérgicos, y c) bloqueo de receptores-canales iónicos activados. Cualquiera de estos mecanismos, solos o en combinación, podrían reducir el potencial de la placa terminal (e.p.p.) a un nivel inferior al necesario para el inicio del potencial de acción muscular, produciéndose el bloqueo de la concentración muscular (figura 1). Adicionalmente, los antibióticos poseen también acciones anestésicas locales que pueden prevenir, asimismo, los potenciales de acción musculares.

Los efectos paralizantes musculares de las tetraciclina, antibióticos objeto de nuestro estudio, han sido mucho menos estudiados que los de otros tipos de antibióticos¹². Estudios previos demuestran efectos relativamente diferentes a nivel de la transmisión neuromuscular, señalándose desde efectos primarios postsinápticos²⁰ a acciones bloqueantes predominantemente presinápticas¹⁶. Además, tam-

* Este trabajo ha sido financiado con la ayuda de la CAICYT, Presidencia del Gobierno. Madrid. N.º Ref. 0497/81.

** Instituto Mixto de Farmacología y Toxicología. C.S.I.C. Universidad Complutense, Madrid-3. *An. Fac. Vet. León.*, 1983, 29, 157-165.