

## 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 cristallyne 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**, 684.
- 6) MONFORT, R.; ALEMANY, J. R.; SÁNCHEZ DE LA CUESTA, F., y AZNAR, J. (1972). Estudio experimental de los efectos hepatotróficos de la silimarina 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<sup>7, 8, 9</sup>. 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<sup>12, 13, 15, 17, 18</sup>. 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 antibióticos<sup>12</sup>. Estudios previos demuestran efectos relativamente diferentes a nivel de la transmisión neuromuscular, señalándose desde efectos primarios postsinápticos<sup>20</sup> a acciones bloqueantes predominantemente presinápticas<sup>16</sup>. 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.

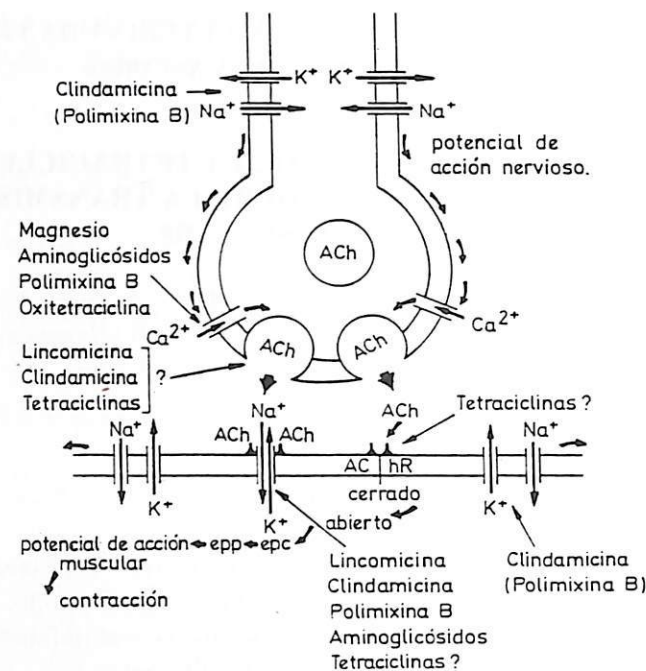


Figura 1.—Representación esquemática de la transmisión neuromuscular y lugares de acción de algunos antibióticos.

bién se han sugerido diferencias en los efectos dentro de la misma serie de las tetraciclina<sup>14</sup>.

Con todo ello, el propósito del presente estudio fue determinar los efectos de la tetraciclina y clortetraciclina sobre la transmisión motora colinérgica en fibra longitudinal de ileon de cobayo. Una comunicación preliminar de los resultados se presentó a la Sociedad Española de Toxicología<sup>2</sup>.

## MATERIAL Y METODOS

*Preparación aislada de la fibra longitudinal conteniendo plexos de Auerbach de ileon de cobayo.*—Se utilizaron cobayos de 400 gramos de peso aproximado. Se sacrificó el animal por conmoción y, una vez sangrado por sección de la yugular, se aisló el intestino delgado descartándose 8-12 cm de la porción terminal del ileon y se procedió a obtener la fibra longitudinal con plexos de Auerbach según el método descrito por AMBACHE<sup>1</sup>. La preparación aislada se suspendió en solución Krebs-Henseleit burbujeada con carbógeno, 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub> en copa de baño de órganos entre dos electrodos de platino a 35°C a una tensión inicial de 0,2 gramos. La composición de la solución Krebs-Henseleit fue la siguiente (mM): ClNa, 11,90; ClK, 4,69; Cl<sub>2</sub>Ca · 2H<sub>2</sub>O, 2,52; SO<sub>4</sub>Mg · 7H<sub>2</sub>O, 1,5; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 1,18; CO<sub>3</sub>HNa, 25,0, y glucosa, 11,1. Dicha solución contenía,

además, dl-propranolol (10<sup>-6</sup> gr/ml, 2 μM) para bloquear los receptores β-adrenérgicos. Las contracciones de la preparación de fibra longitudinal-plexo mientérico se registraron isométricamente. Para la estimulación eléctrica se utilizaron pulsos simples de 1 msec de duración, 0,1 Hz de frecuencia, a voltaje supramaximal.

*Fármacos.*—Se utilizaron los siguientes fármacos: cloruro de acetilcolina (Sigma), dl-propranolol (Sigma), mesilato de fentolamina (Ciba-Geigy), clorhidrato de piperoxan (May & Baker), clorhidrato de yohimbina (Sigma), clorhidrato de tolazolina (Sigma), clorhidrato de naloxona (Sigma), bromuro de hexametónium (Sigma), clorhidrato de tetraciclina (Sigma) y clorhidrato de Clortetraciclina (Sigma). Todos los fármacos fueron disueltos en solución salina de ClNa 0,9 % peso/vol. o en agua destilada inmediatamente después de su uso.

## RESULTADOS

*Efectos de la tetraciclina y clortetraciclina sobre la respuesta a la estimulación eléctrica transmural a 0,1 Hz.*—La estimulación eléctrica transmural de la fibra longitudinal conteniendo plexos de Auerbach de ileon de cobayo a 0,1 Hz produce una respuesta-twitch, es decir, una respuesta contractil que generalmente desarrolla una tensión entre 1 y 2 gramos, existiendo muy poca variación entre preparaciones individuales. Estas respuestas se deben a la estimulación de las neuronas colinérgicas postgangliónicas. Tanto la tetraciclina (5 × 10<sup>-5</sup> — 8 × 10<sup>-1</sup> g/ml; 0,1 — 1,6 mM) como la clortetraciclina (10<sup>-5</sup> — 10<sup>-1</sup> g/ml; (— 194 μM) originan una rápida inhibición de la respuesta contractil a la estimulación eléctrica. La figura 2 muestra una respuesta típica. La respuesta-twitch se recuperó rápidamente tras el lavado de la preparación con solución Krebs-Henseleit libre del antibiótico a estudio. La sensibilidad de la fibra tras la administración repetida del antibiótico permaneció constante durante un período de 3 a 4 horas. En 7 experimentos, la concentración media de tetraciclina que produce el 50 % de la inhibición máxima, CI<sub>50</sub> (95 % límite de confianza), fue de 0,37 (0,31 — 0,45) mM (1,85 × 10<sup>-1</sup> g/ml) (figura 3). La máxima inhibición producida por la tetraciclina fue de un 62 % y únicamente la clortetraciclina originó la máxima inhibición de un 37 % (figura 4).

La inhibición inducida por tetraciclina y clortetraciclina no fue afectada por hexametónium (10<sup>-1</sup>) ni por el pretratamiento con naloxona (10<sup>-6</sup> M), lo que indica que estos efectos inhibitorios de la tetraciclina y clortetraciclina no son mediados vía receptores opioides presinápticos y que probablemente sus lugares de acción son a nivel de las terminaciones nerviosas colinérgicas postgangliónicas. Los antagonistas α<sub>2</sub>-adrenérgicos, piperoxan (2 μg/ml, 8,6 μM), fentolamina (4 — 14 μM) y yohimbina (14 μM) no antagonizaron los efectos inhibitorios de la tetraciclina y clortetraciclina, pero sí la tolazolina (1 — 4 μg/ml, 5 — 20 μM), que revirtió totalmente dichos efectos inhibitorios (figura 5).

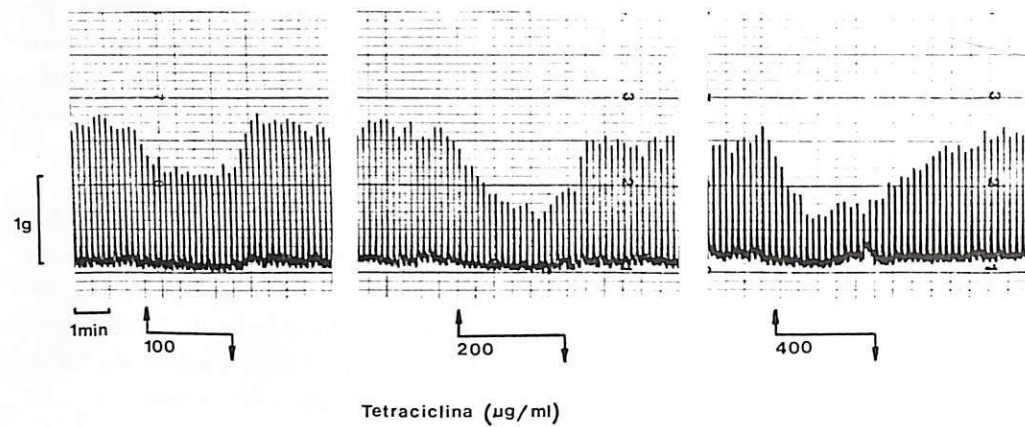


Figura 2.—Respuesta típica del efecto de la tetraciclina en fibra longitudinal-plexo mientérico de cobayo. Las respuestas-twitch fueron generadas por estimulación transmural con pulsos simples (1 msec de duración, frecuencia 0.1 Hz, voltaje supramaximal). La tetraciclina (100-400 µg/ml, 0.2-0.3 mM) fue adicionada como se indica. Observar su rápida acción y la reversión del efecto por lavado.

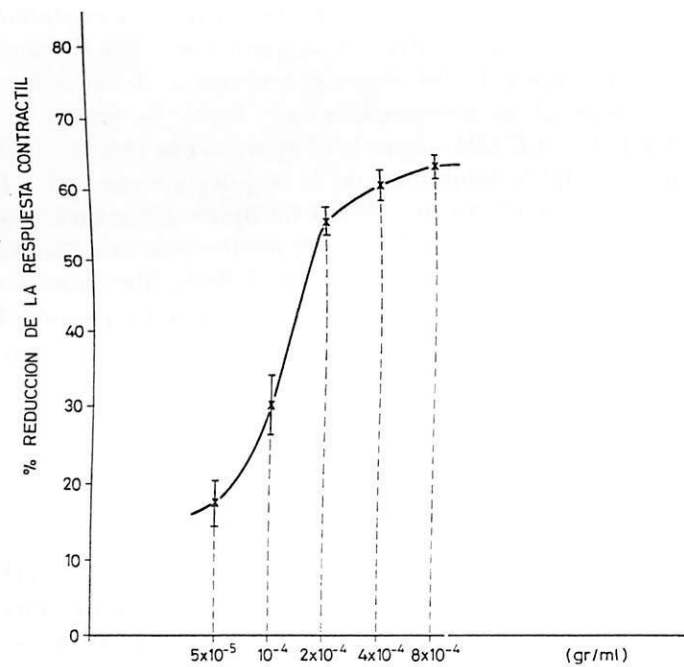


Figura 3.—Efecto de la tetraciclina ( $5 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-4}$  g/ml, 0.1-1.6 mM) sobre la respuesta a la estimulación eléctrica transmural (0.1 Hz). Curva dosis-respuesta de la inhibición por tetraciclina de las contracciones evocadas eléctricamente en fibra longitudinal-plexo mientérico de cobayo (valor medio  $\pm$  E.S.M., n = 7).

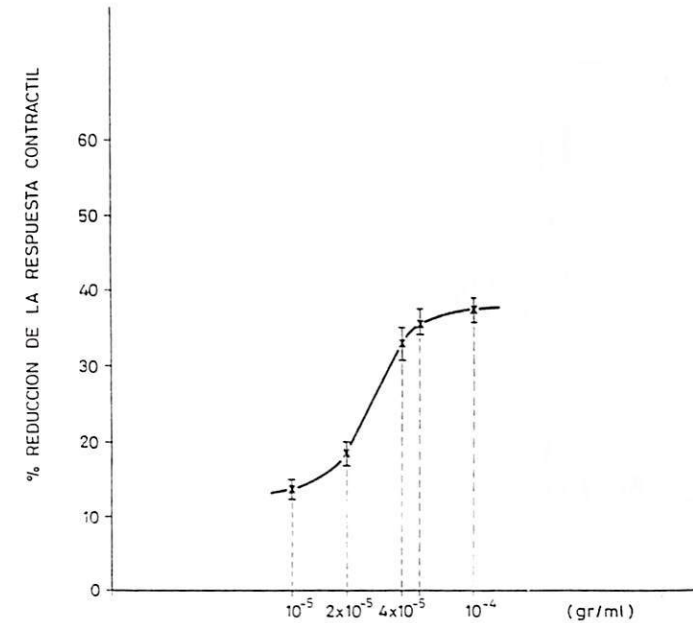


Figura 4.—Efecto de la clortetraciclina ( $10^{-5} - 10^{-4}$  g/ml, 9-194 µM) sobre la respuesta a la estimulación eléctrica transmural (0.1 Hz). Curva dosis-respuesta de la inhibición por tetraciclina de las contracciones evocadas eléctricamente en fibra longitudinal-plexo mientérico de cobayo (valor medio  $\pm$  E.S.M., n = 7).

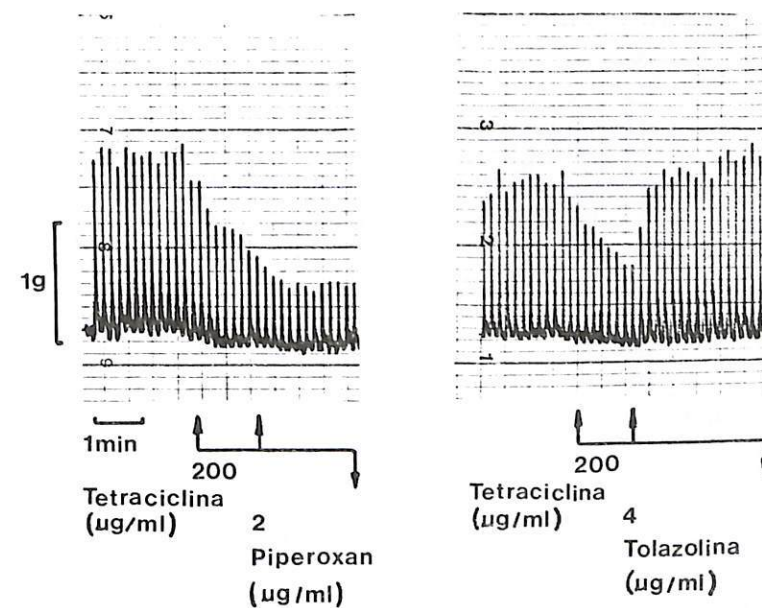


Figura 5.—Efecto inhibitorio de la tetraciclina (200 µg/ml, 0.4 mM) sobre la estimulación eléctrica transmural (0.1 Hz) en fibra longitudinal-plexo mientérico de cobayo y su reversión por tolazolina (4 µg/ml, 20 µM), pero no por piperoxan (2 µg/ml, 8.6 µM).

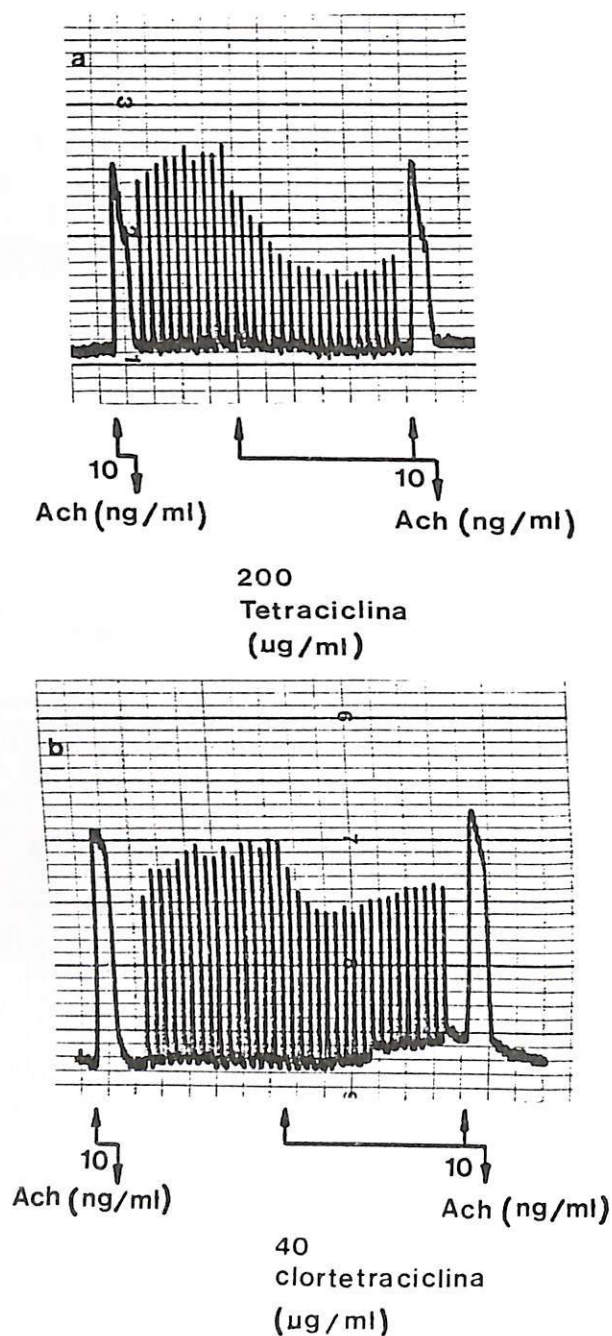


Figura 6.—Efectos de la tetraciclina (200  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1 mM) (panel a) y clortetraciclina (10  $\mu\text{g/ml}$ , 7.7 mM) (panel b) sobre la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica transmural (0.1 Hz) en fibra longitudinal-plexo mientérico de cobayo. La tetraciclina y clortetraciclina reducen la respuesta a la estimulación eléctrica, pero no afectan la respuesta contráctil a la ACh exógeno ( $10\text{ ng/ml}$ ,  $5 \times 10^{-8}\text{ M}$ ).

*Efectos de la tetraciclina y clortetraciclina sobre las curvas dosis-respuesta a la acetilcolina.*—Con el fin de evaluar las propiedades anticolinérgicas postsinápticas de la tetraciclina y clortetraciclina, se estudiaron las curvas dosis-respuesta de la fibra longitudinal conteniendo plexos de Auerbach de ileon de cobayo a la ACh exógena ( $10^{-8} - 2 \times 10^{-7}\text{ M}$ ) y la interacción de dichos antibióticos. La tetraciclina y clortetraciclina no afectaron las contracciones evocadas por la ACh exógena, lo que indica una naturaleza presináptica de la inhibición inducida por tetraciclina y clortetraciclina de la respuesta a la estimulación eléctrica transmural (figura 6).

## DISCUSION

Los resultados del presente trabajo confirman y amplían los estudios previos que demuestran cómo diversos tipos de antibióticos poseen efectos relativamente diferentes a nivel de la transmisión neuromuscular.

En nuestro estudio, la respuesta-twitch de la fibra longitudinal de ileon de cobayo a baja frecuencia de estimulación de los nervios intramurales fue inhibida por los antibióticos tetraciclina y clortetraciclina. El efecto inhibitorio de estos antibióticos fue claramente mediado presinápticamente. La tetraciclina y clortetraciclina reducen las respuestas-twitch a la estimulación nerviosa, inhibiendo la liberación de ACh. La baja potencia del piperoxan, fentolamina y yohimbina para revertir la acción inhibitoria presináptica de la tetraciclina y clortetraciclina no es concordante con el efecto bloqueante de la tolazolina observado. La tolazolina fue un potente antagonista de la acción inhibitoria de estos antibióticos, por lo que parece propio indicar que dicho efecto inhibitorio puede ser mediado vía  $\alpha_2$ -adrenoceptores presinápticos, tolazolina-sensibles, localizados en las terminaciones nerviosas clíngicas del plexo mientérico<sup>4, 6, 9, 11, 19</sup>. No obstante, se conoce que el efecto estimulante de la tolazolina persiste en preparaciones aisladas de animales reserpinizados<sup>5</sup>. Se podría atribuir también el efecto antagonista de la tolazolina como una acción anticolinesterásica, sugerencia quizá válida, pero, a su vez, conflictiva, ya que los efectos potenciadores de la tolazolina son aparentes a concentraciones inferiores a las requeridas para inhibir significativamente la actividad colinesterásica<sup>3</sup>.

En conclusión, la tetraciclina y clortetraciclina inhiben la liberación de ACh de las neuronas colinérgicas postgangliónicas, acción farmacológica asociada con la depresión de la función neuromuscular.

## RESUMEN

Se estudiaron los efectos neuromusculares de la tetraciclina y clortetraciclina a nivel de la transmisión motora colinérgica en preparaciones aisladas de fibra longitudinal de ileon de cobayo. La tetraciclina y clortetraciclina originaron una

inhibición, concentración-dependiente, de la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica transmural. Estos efectos inhibitorios fueron revertidos por tolazolina. La acción inhibitoria de la tetraciclina y clortetraciclina sobre la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica fue de naturaleza presináptica, ya que estos antibióticos no afectaron las respuestas contráctiles a la ACh exógena.

## INHIBITORY EFFECTS OF TETRACYCLINE AND CHLORTETRACYCLINE ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

### SUMMARY

The effects of tetracycline and chlortetracycline on cholinergic motor transmission in the longitudinal muscle preparation of the guinea-pig ileum were studied. Tetracycline and chlortetracycline caused a concentration-dependent inhibition of the response to field stimulation. The twitch-inhibitory effects of tetracycline and chlortetracycline were reversed by tolazoline. The presynaptic nature of tetracycline- and chlortetracycline-induced inhibition of the electrically-evoked twitch was indicated by the finding that ACh-evoked contraction remained unaffected by these antibiotics.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) AMBACHE, N. (1954).—Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as broad sheet. *J. Physiol.*, **125**: 53-55.
- 2) ANADÓN, A.; FUSTEL, M., y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R. (1983).—Actividad colinérgica presináptica de la tetraciclina y clortetraciclina en plexo mientérico de cobayo. *V Jornadas Toxicológicas Españolas*. Madrid, 29-30 noviembre-1-2 diciembre. Resúmenes, **5**: 159-160.
- 3) BOYD, H.; CHANG, V., y RAND, M. J. (1960).—The anticholinesterase activity of some antiadrenaline agents. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, **15**: 525-531.
- 4) DREW, G. M. (1977).—Pharmacological characterisation of presynaptic  $\alpha$ -adrenoceptors which regulate cholinergic activity in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac.*, **59**: 513.
- 5) DZOLJIC, M. (1967).—Stimulatory effect of tolazoline on smooth muscle. *Br. J. Pharmac.*, **30**: 203-212.
- 6) FURNESS, J. B., y COSTA, M. (1974).—The adrenergic innervation of the gastrointestinal tract. *Rev. Physiol.*, **69**: 1-51.
- 7) GROSS, D. R.; KITZMAN, J. V., y ADAMS, H. R. (1979).—Cardiovascular effects of intravenous administration of propylene glycol and of oxytetracycline in propylene glycol in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **40**: 783-791.
- 8) GYRD-HANSEN, N.; RRASMUSSEN, F., y MOGENS, S. (1981).—Cardiovascular effects of intravenous administration of tetracycline in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **4**: 15-25.
- 9) KOSTERLITZ, H. W.; LYDON, B. J., y WATT, A. T. (1970).—The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac.*, **39**: 398-413.
- 10) MATHEW, B. P.; TESKE, R. H.; ROBINSON, J. A., y ADAMS, H. R. (1978).—Neuromuscular blocking effects of certain antimicrobial agents in pigs and lambs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **1**: 171-175.
- 11) PATON, W. D. M., y VIZI, E. S. (1969).—The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br. J. Pharmac.*, **35**: 10-28.
- 12) PITTINGER, C. B., y ADAMSON, R. (1972).—Antibiotic blockade of neuromuscular function. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **12**: 169-184.
- 13) SANDERS, W. E., y SANDERS, C. C. (1979).—Toxicity of antibacterial agents: mechanism of action on mammalian cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**: 53-83.
- 14) SINGH, Y. N.; MARSHALL, I. G., y HARVEY, A. L. (1978).—Reversal of antibiotic induced muscle paralysis by 3,4-diaminopyridine. *J. Pharm. Pharmac.*, **30**: 49-250.
- 15) SINGH, Y. N.; MARSHALL, I. G., y HARVEY, A. L. (1980).—The mechanisms of the muscle paralysing actions of antibiotics and their interaction with neuromuscular blocking agents. *Rev. Drug. Metab. Drug Interact.*, **3**: 129.
- 16) SINGH, Y. N.; MARSHALL, I. G., y HARVEY, A. L. (1982).—Pre- and postjunctional blocking effects of aminoglycoside, polymixin, tetracycline and lincosamide antibiotics. *Br. J. Anaesth.*, **54**: 1295-1305.
- 17) SOKOLL, M. D., y GERGIS, S. D. (1981).—Antibiotics and neuromuscular function. *Anesthesiology*, **55**: 148-152.
- 18) WALL, F. A. (1983).—A comparison between neuromuscular effects of tetracycline and polymixin B. *Br. J. Pharmac.*, **79**: 365.
- 19) WILKBERG, J. (1977).—Localisation of adrenergic receptors in guinea-pig ileum and rabbit jejunum to cholinergic neurons and to smooth muscle cells. *Acta Physiol. Scand.*, **99**: 109-207.
- 20) WRIGHT, J. M., y COLLIER, B. (1976).—The site of the neuromuscular block produced by polymixin B and rolitetracycline. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **54**: 926-936.