

**PROGRAMA DEL CSIC
PARA EL ESTUDIO
DEL SINDROME TOXICO**

**TRABAJOS REUNIDOS
Y COMUNICACIONES
SOLICITADAS**

Vol. 2

1.983



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

TRATAMIENTO CRONICO CON ANILIDAS EN UN ESTUDIO EXPERIMENTAL
SOBRE LA ETIOLOGIA DEL SINDROME TOXICO

J. Fragoso, M. Palacín, A. Zorzano, B. Bonet, M.A. Lasun -
ción, M. Durfort*, M. Díaz y E. Herrera. Servicio de Bio -
química, Departamento de Investigación, Centro Ramón y Ca -
jal, Crtra. Colmenar Km. 9, Madrid-34.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Inicialmente se propuso que las anilidas podrían es -
tar implicadas en la toxicidad del aceite tóxico (1) , y
posteriormente se ha ampliado esta propuesta a la citotoxi -
cidad mediada por eosinófilos, desencadenada por la incor -
poración de anilidas a las membranas plasmáticas celulares
(2,3). En el proceso estarían también implicados el eleva -
do contenido de ácidos grasos insaturados y peróxidos, pre -
sentes en los aceites tóxicos, así como un déficit de vita -
mina E (4). Estudios realizados con anilidas puras en ani -
males experimentales demuestran que la toxicidad de estos
compuestos es baja (5-7), y realmente se ha propuesto que
las anilidas ingeridas con el aceite han participado en el
desarrollo del síndrome tóxico como adyuvantes de otros
factores, aún no bien establecidos (8). Puesto que hasta
ahora no se han realizado experimentos verdaderamente cró -
nicos con anilidas para determinar su posible papel en la
etiología del síndrome tóxico, nosotros hemos abordado es -
te estudio. Dado el papel que parecen desempeñar los agen -
tes reductores de la dieta y la reserva hepática de gluta -
tion en la protección a la acción tóxica de las anilidas
(9), en una segunda fase hemos estudiado también el posi -
ble papel de una deficiencia de vitaminas C y E en la di -
eta y la depleción de glutatión hepático en la respuesta.

*Departamento de Morfología y Microscopía, Facultad de
Biología, Universidad de Barcelona.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratas macho, Sprague-Dawley, y ratones macho, Swiss, procedentes de nuestro animalario, que fueron sometidos a ciclos alternativos de 12 horas de luz-oscuridad, y una temperatura ambiental de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

En una primera serie experimental se realizó un tratamiento crónico con "anilidas" en la rata. Para ello se utilizaron 30 ratas de 160-170 g de peso, al inicio del experimento, las cuales se distribuyeron en tres grupos: I) Controles, II) Aceite de oliva (Carbonell) y III) Aceite de oliva+"anilidas" (0.2 g de "anilidas"/100 ml de aceite). En los grupos II y III, las ratas recibieron una dieta compuesta por 2 g de aceite (18 Kcal) y 8 g de pellets (Pamlab rata-ratón, mantenimiento) (23.2 Kcal), convenientemente triturados y amasados. El grupo I) recibió una dieta isocalórica a la de los otros, constituida por 4.65 g de sacarosa y 8 g de los indicados pellets. Para ajustar isocalóricamente la dieta de todos los grupos, se controlaba diariamente la ingesta de los animales, de tal modo que por cada 10 g de mezcla del aceite+pellets, los controles (grupo I) recibían 12.65 g de su correspondiente dieta. Estos tratamientos se mantuvieron durante 60 días, al cabo de los cuales se sacrificaron los animales por decapitación, recogiendo la sangre sobre heparina y una alícuota del hígado en nitrógeno líquido, para los posteriores análisis. Al mismo tiempo, se pesaron los distintos órganos y tejidos.

En una segunda serie experimental se realizaron tratamientos similares en la rata, pero con dietas deficientes en vitaminas, ampliándose el estudio al tratamiento con un aceite supuestamente tóxico. Para ello se utilizaron 54 ra-

tas de 140-160 g de peso inicial, que fueron distribuidas en los siguientes grupos experimentales:

- I) Aceite de oliva, con dieta deficiente en vitam. E y C.
- II) Aceite de oliva, con dieta deficiente en vitam. C.
- III) Aceite de oliva+"anilidas", deficientes en vit. E y C.
- IV) Aceite de oliva+"anilidas", deficientes en vit. C.
- V) Aceite tóxico, con dieta deficiente en vitam. E y C.
- VI) Aceite tóxico, con dieta deficiente en vitam. C.

En todos los grupos, las ratas fueron alimentadas con una mezcla del correspondiente aceite y de dieta, en la proporción de 2 g y 8 g, respectivamente. El tratamiento con "anilidas" se realizó en la proporción de 0.2 g/100 ml de aceite. A los 35 días, los animales se sacrificaron como se indicó anteriormente.

En una tercera serie experimental, se realizó un experimento similar al de la segunda serie, pero con ratones, de un peso corporal inicial de 13 a 15 g. Los grupos fueron iguales a los de la serie anterior, pero el tratamiento se prolongó por 60 días, y durante los últimos 4 días se administró a todos los ratones por vía intraperitoneal 0.01 ml de dietil-maleato (Sigma, St. Louis, Mo.) / 30 g de peso corporal, vehiculados en 0.3 ml de aceite de oliva. Este tratamiento con dietil-maleato se realizó diariamente entre las 18.00-20.00 h, y los animales se sacrificaron en la mañana siguiente (entre las 10.00-12.00h) de la última inyección, de una forma similar a la indicada anteriormente.

Productos utilizados. Las "anilidas" fueron facilitadas por el Dr. Hernández Bolaños, Jefe del Laboratorio Central de Aduanas, siendo procedentes de síntesis a partir de ácidos grasos de aceite de colza puro, poseyendo la siguiente composición: 70% de oleil-anilida, 15% de pal-

mitil anilida, 8% de linoleil-anilida y 7% de anilidas de otros ácidos grasos. El aceite de oliva fué siempre aceite comercial Carbonell. El aceite tóxico fué facilitado por el Dr. Borregón Martínez, del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, Majadahonda (muestra N° 39.508), compuesto por aceite de colza+grasa animal, con un contenido en oleil-anilida de 600 p.p.m. La dieta deficiente en vitaminas fué harina A.04 (rata-ratón de mantenimiento), carente del componente vitamínico y minerales, de la casa Pamlab, a la que se le adicionaron los requerimientos mínimos de minerales y vitaminas para la rata, a excepción de vitamina E y ácido ascórbico. Estos fueron añadidos únicamente cuando eran requeridos para el grupo experimental correspondiente.

Determinaciones analíticas. Los parámetros bioquímicos, tanto en alícuotas de sangre como de hígado, fueron determinados siguiendo los métodos utilizados por nosotros en anteriores ocasiones (10-14). El fraccionamiento de proteínas plasmáticas se realizó por electroforesis en acetato de celulosa, mientras que la determinación de las IgG plasmáticas se realizó por inmunodifusión radial en placas Kallestad. Las determinaciones hematológicas se realizaron utilizando un autoanalizador Coulter, modelo "S", y otro Technicon, modelo H6000/H601.

Estudio histológico. Las piezas de tejidos fueron inmediatamente fijadas en formaldehído al 10% y tras deshidratación con alcohol etílico y tolueno, fueron incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 6 micras de grosor, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina, hematoxilina férrica, Sudán III, técnica del P.A.S. y método de Mallory, para el reconocimiento específico de componentes.

Estadística. Los datos se expresan en medias[±] error standard, y la comparación estadística entre los grupos se realizó mediante el "t-test" de Student.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el propósito de determinar si la presencia crónica de anilidas en la dieta producía en la rata algún cuadro de toxicidad, durante 60 días se alimentaron con dietas isocalóricas tres grupos de ratas: controles (dieta suplementada con sacarosa), dieta suplementada con aceite de oliva, y dieta suplementada con aceite de oliva conteniendo 0.2g/dl de "anilidas". La cantidad de comida suministrada a los animales se ajustó de forma que no hubiera diferencias en las calorías ingeridas diariamente entre los grupos. Así, en la última semana de tratamiento la cantidad total de comida ingerida fué significativamente superior en los controles (22.3 ± 0.5 g/rata/día) que en los otros dos grupos (18.2 ± 0.3 en las ratas a aceite de oliva y 18.3 ± 0.3 en las de anilidas). A pesar de ello, la cantidad de kilocalorías totales ingeridas/rata/día fué igual en los tres grupos (72.7 ± 1.8 en controles, 74.9 ± 1.2 en las ratas a aceite de oliva y 75.4 ± 1.2 en las de anilidas). Puede calcularse, a su vez, que con la cantidad de comida ingerida por los animales de anilidas, y teniendo en cuenta la composición porcentual de estas (ver Materiales y Métodos), la oleil-anilida ingerida por estas ratas fué de 24.7 mg/Kg de peso corporal/día. En la Tabla 1 se resumen los valores medios de pesos corporales de los tres grupos, en las distintas semanas del experimento. Puede observarse que en ningún momento aparecieron diferencias significativas entre los grupos. De igual forma, como se ve en la Tabla 2, no aparecieron diferencias en los pesos de los distintos órganos de los animales de los tres grupos, al final del experimento. Estos datos nos ponen de manifiesto

to dos aspectos que nos parecen de interés. Por un lado, nos demuestran que las dietas han sido ingeridas por los animales en cantidades realmente isocalóricas para los tres grupos, ya que de forma contraria el aumento de peso corporal y los pesos de órganos y tejidos sensibles a la ingesta, tales como hígado y tejido adiposo (10), habrían sufrido variaciones de unos grupos a otros. Por otro lado, los resultados obtenidos nos permiten concluir que las elevadas cantidades de anilidas suministradas a las ratas no les han producido una reacción tóxica apreciable. Con el propósito de conocer si esta falta de respuesta a las anilidas se presentaba también en parámetros mas sensibles, en todos los animales se determinaron, al término del tratamiento, las concentraciones circulantes de diversos metabolitos, y la de glucógeno en hígado. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 3, donde se observa una disminución significativa en la concentración de glucógeno hepático y un ligero aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y sanguíneos de beta-hidroxibutirato entre los animales que recibieron aceite de oliva (con o sin la adición de anilidas), en relación con los controles. Estas diferencias son lógicas, debido al mayor contenido de carbohidratos en la dieta de los controles. No aparecieron diferencias significativas en estos parámetros entre el grupo de aceite de oliva sólo y el que era suplementado con anilidas (Tabla 3). Tampoco se observaron diferencias entre los tres grupos estudiados en los niveles de glucosa y glicerol en sangre ni en los de colesterol ó de colesterol asociado a HDL en plasma. Nosotros hemos observado previamente que todos estos parámetros son enormemente sensibles a variaciones en la situación metabólica de la rata: periodos cortos (3 h) de ayuno (15), la gestación (11,14), cambios en la situación endocrina (12,15), etc. Así pues, la falta de diferencias entre los grupos estudiados nos permite concluir que esos 24.7 mg de oleil-anilida/Kg de pe-

TABLA 1 PESOS CORPORALES DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS ISOCALÓRICAS Y TRATAMIENTO CRÓNICO CON ANILIDAS DURANTE 60 DIAS

Semanas de tratamiento:	(g del día 0)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Controles (suplemento con sacarosa)	100(150±2)	105±5	135±4	151±4	173±5	187±5	207±7	232±7	243±10	255±10
Aceite de oliva	100(151±3)	113±4	139±4	152±5	176±7	192±7	213±7	231±7	245±7	254±8
Aceite de oliva + "anilidas"	100(163±7)	110±3	136±3	147±4	168±5	181±8	202±8	225±8	233±9	241±9

Los datos se expresan en medias ± E.S. de los 6 del peso al día de inicio del experimento (valores absolutos al día 0 entre paréntesis). N = 7 - 10 ratas / grupo. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas (P > 0.05)

TABLA 2 PESOS DE ORGANOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS ISOCALÓRICAS Y TRATAMIENTO CRÓNICO CON ANILIDAS DURANTE 60 DIAS

	(g de peso fresco)								
	Hígado	Pulmón	Riñones	Bazo	Corazón	Epidídimo graso	Suprarrenales	Timo	
Controles (suplemento con sacarosa)	12.9±0.8	1.94±0.10	2.56±0.12	0.68±0.02	1.09±0.03	3.59±0.30	0.048±0.002	0.524±0.087	
Aceite de oliva	12.5±0.5	1.76±0.11	2.51±0.10	0.57±0.04	1.13±0.10	3.28±0.28	0.044±0.004	0.532±0.043	
Aceite de oliva + "anilidas"	13.3±0.4	1.91±0.06	2.62±0.09	0.71±0.06	1.07±0.05	3.49±0.38	0.048±0.004	0.472±0.038	

Los datos corresponden a los mismos animales de la tabla 1, y se expresan en media ± E.S. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas para ninguno de los órganos (P > 0.05)

so corporal ingeridos por las ratas durante 60 días, no les ha producido una respuesta apreciable.

Puesto que se había propuesto como posible factor en la etiología del síndrome tóxico, la falta de vitamina E asociada a la presencia de oleil-anilida en la dieta (4), decidimos repetir el experimento de tratamiento crónico a la rata, pero con dieta deficiente en dicha vitamina. A su vez, pensamos que una deficiencia de ácido ascórbico en la dieta podría también aumentar las posibles diferencias en la respuesta, ya que el carácter reductor de aquél y su conocida participación en las hidroxilaciones del anillo bencénico (16,17) podrían estar actuando como agente protector en las reacciones que se requieren para la eliminación de las anilidas del organismo (16,18). Con este planteamiento, hemos realizado otra serie experimental en la que se administró a las ratas una dieta pobre de ácido ascórbico y vitamina E, y a la mitad de los grupos se les suplementó con los requerimientos mínimos para la rata de esta vitamina E. En esta serie experimental, además de los grupos que recibieron aceite de oliva (20% en la dieta), suplementado o no con 0.2g/dlde anilidas, otros animales fueron tratados con aceite supuestamente tóxico (muestra N°39.508, del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición de Majadahonda, conteniendo 600 p.p.m. de oleil-anilida) en la proporción del 20% en la dieta. Todos los animales se alimentaron "ad libitum" con su respectiva dieta, durante 35 días. La cantidad de comida ingerida por rata fué igual en todos los grupos, con un valor medio al final del experimento de 19.6±0.6 g/rata/día. En base a la proporción de oleil-anilida contenida en las "anilidas" adicionadas al aceite de oliva y la presente en el aceite tóxico, la cantidad de aquella ingerida por los animales fué de 15.3 mg/Kg de peso corporal/día en los grupos de "anilidas" y de 7.1 mg/Kg/día en los de aceite tóxico.

TABLA 3
PARAMETROS METABOLICOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS ISOCALORICAS Y TRATAMIENTO CRONICO CON ANILIDAS DURANTE 60 DIAS

Controles (suplemento con sacarosa)	Glucogeno Hepático (%)	Glucosa en sangre (µM/l)	Glicerol (µM/l)	β-Ho-butilato en sangre (µM/l)	Triglicéridos en plasma		Colesterol de HDL (mg/dl)
					(mg/dl)	(mg/dl)	
5.89±0.46	121±2	63±7	28±3	66±7	68±4	40±2	
3.52±0.23**	126±4	56±7	47±11	102±13*	73±3	37±3	
3.00±0.49**	123±2	47±8	49±11	88±13	73±4	39±3	

Los datos se expresan en media ± E.S. y corresponden a los mismos animales que las tablas 1 y 2. La significatividad frente a controles se indica con asteriscos (* = P/0.05; ** = P/0.01; sin asterisco = no significativo P > 0.05)

TABLA 4
PESOS CORPORALES, DE HIGADO Y SUPRARENALES DE RATAS ALIMENTADAS DURANTE 35 DIAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN ACIDO ASCORBICO Y VITAMINA E, SUPLEMENTADA O NO CON ESTA VITAMINA (E) Y CON "ANILIDAS" (A) O ACEITE SUPUESTAMENTE TOXICO (T)

Grupo experimental:	O	O-E	A	A-E	T	T-E
Peso corporal inicial (g)	147±6	138±5	155±6	163±0*	143±8	155±7
Peso corporal final (% del inicial)	210±5	212±5	198±6	202±6	199±9	211±9
Peso hígado (g)	9.06±0.44	8.84±0.44	9.33±0.46	9.59±0.75	10.52±0.49*	10.07±0.49
Peso suprarenales (g)	0.034±0.003	0.025±0.002+	0.031±0.003	0.037±0.005*	0.035±0.004	0.039±0.003**

Los grupos O corresponden a controles, con dieta suplementada con aceite de oliva. Los datos son medias ± E.S. de 9 ratas/grupo. Las comparaciones de cada grupo con su respectivo control (*O* 6 "O-E") se expresan por asteriscos: * = P/0.05, ** = P/0.01; *** = P/0.001

Como se observa en la Tabla 4, los pesos corporales de los distintos grupos al inicio del experimento era similar, y al final del mismo (a los 35 días) tampoco se apreciaron diferencias entre los animales tratados con "anilidas" (A) ó con aceite tóxico (T) frente a sus respectivos controles, tratados con aceite puro de oliva (O), tanto con dieta deficiente en vitamina E y ácido ascórbico, como con dieta suplementada con vitamina E. El peso del hígado fué ligeramente superior en los animales tratados con el aceite tóxico que en los de aceite de oliva, aunque la diferencia fué estadísticamente significativa sólo para los animales que no recibieron suplemento de vitamina E en la dieta (T versus O) (tabla 4). El peso de las cápsulas suprarrenales fué inferior en los animales a aceite de oliva, con dieta suplementada con vitamina E (OE) que en los deficiente en ella (O) ($p/0.05$), y la presencia de anilidas (AE) o de aceite tóxico (TE) impidió que el suplemento con dicha vitamina hiciera disminuir el peso de estas glándulas (Tabla 4). De esta forma, dicho parámetro era significativamente superior en AE ($p/0.05$) y en TE ($p/0.01$) que en OE. También aparecieron algunas diferencias entre los grupos en la concentración de componentes plasmáticos (Tabla 5). Así, se observó una disminución en la concentración de IgG y alfa-globulina plasmáticas en las ratas controles (a aceite de oliva) cuando su dieta era suplementada con vitamina E (OE frente a O). Este efecto de la vitamina E no se observó en los valores de alfa-globulina de los animales tratados con anilidas (A) ni en los de IgG ó de alfa-globulina, en los animales tratados con aceite tóxico (T). En estos últimos se apreció una disminución significativa en la concentración de proteínas totales en plasma (T y TE), con relación a los valores observados en sus respectivos controles (O y OE) (Tabla 5). Aunque no pudieron cuantificarse por separado las beta y gamma-globulinas, la suma de ambas apareció

TABLE 5 COMPONENTES PLASMATICOS DE RATAS ALIMENTADAS DURANTE 35 DIAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN ACIDO ASCORBICO Y VITAMINA E, SUPLEMENTADA O NO CON ESTA VITAMINA (E) Y CON "ANILIDAS" (A) O ACEITE SUPUESTAMENTE TOXICO (T).

Grupo experimental:	O	O-E	A	A-E	T	T-E
Glucosa (mm)	6.60±0.49	7.22±0.42	6.55±0.47	6.50±0.60	7.65±0.22	7.81±0.38
β -hidroxibutirato (μ M/l)	27±6	28±9	31±9	51±15	33±10	39±6
Proteínas totales (g %)	6.30±0.13	6.16±0.21	6.28±0.18	5.97±0.35	5.84±0.16*	5.13±0.27**
Albumina (g %)	3.60±0.10	3.71±0.21	3.69±0.16	3.02±0.47	3.50±0.10	2.98±0.24*
IgG (mg %)	364±21	293±21+	301±27	306±14+	318±28	334±25
α -globulina (mg %)	390±20	322±22+	378±22	543±210	311±31	489±22
β - γ -globulinas (g %)	2.19±0.17	1.73±0.15	1.60±0.17*	1.70±0.19	1.33±0.26*	1.51±0.27

Los datos corresponden a los mismos animales que la tabla 4 y se expresan en media \pm E.S. Las comparaciones entre grupos con y sin vitamina E se expresan por cruces y las de cada grupo con su respectivo control ("O" u "O-E") por asteriscos: + o * = $P/0.05$, ** = $P/0.01$

disminuida en las ratas de "anilidas" (A) y de aceite tóxico (T) con relación a sus controles (O), cuando la dieta era deficiente en vitamina E, mientras que esta diferencia entre los grupos desapareció cuando la dieta fué suplementada con dicha vitamina.

Este conjunto de datos nos ponen de manifiesto, en los animales cuya dieta no fué suplementada con vitamina E, un ligero cuadro de deficiencia vitamínica, que junto con la falta de ácido ascórbico en la dieta, ha permitido una ligera respuesta a la ingestión de anilidas, tanto administradas en forma pura como asociadas al aceite supuestamente tóxico. De todas las maneras, los cambios observados no pueden interpretarse como una acción tóxica de estos compuestos, ya que no se habían observado variaciones en el peso corporal de los animales (Tabla 4) ni en ningún otro parámetro representativo de una respuesta tóxica. En estos animales cuantificamos también parámetros hematológicos, tales como hemoglobina, hematocrito, hemafes, leucocitos, linfocitos, neutrófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos. En ninguno de estos parámetros aparecieron diferencias significativas entre los distintos grupos (los datos no se presentan). En tejidos procedentes de estos mismos animales se realizó un estudio histopatológico, determinándose específicamente los siguientes parámetros: nuclearidad celular; estado de la cromatina y picnosis nuclear; reservas paraplasmaáticas (inclusiones lipídicas y presencia de glucógeno); depósitos de lipofucsina en células nerviosas; lisis celular; fibrosis portal e inflamatoria; depósitos de hierro en hígado, pulmón y bazo; eritroblastosis en hígado y bazo; presencia de granulomas; desarrollo de la cápsula fibrosa conjuntiva en suprarrenal, pulmón e hígado, y desarrollo de las trabéculas musculares del bazo. Este estudio no ha revela

do diferencias notorias entre los distintos grupos, a excepción de algunas anomalías en hígado, pulmón, bazo y cápsulas suprarrenales en los animales tratados con "anilidas" (A y AE), con un aumento del calibre de los sinusoides hepáticos, incremento de elementos macrofágicos y disminución de espacios alveolares en el pulmón, disminución del diámetro de los nódulos linfáticos en el bazo e hiperdesarrollo de la cápsula conjuntiva de las suprarrenales. No se apreciaron diferencias morfológicas en músculo esquelético o cerebro, entre ninguno de los grupos.

Puesto que se había propuesto la conveniencia de realizar estudios de tratamientos con anilidas en distintas especies (8) antes de sacar conclusiones definitivas, y en base a la escasa respuesta que habíamos obtenido en las ratas, decidimos llevar a cabo un tratamiento crónico en ratones. En este nuevo experimento distribuimos a los animales en los mismos grupos que en la serie anterior de ratas, siendo también sometidos a una dieta deficiente de ácido ascórbico y vitamina E, suplementando a la mitad de los grupos con vitamina E. Las proporciones de anilidas y de aceites en la dieta fueron también como en el experimento descrito arriba para ratas. El tratamiento a los ratones se prolongó durante 60 días. Puesto que la cantidad de comida ingerida por los ratones en relación a su peso corporal fué muy superior a la de las ratas (la media ingerida por los ratones fué de 370g de comida/Kg de peso/día, mientras que por las ratas era de 47 g/Kg), la cantidad de oleil-anilida fué también muy superior en los primeros (102.5 mg de oleil-anilida/Kg/día en los grupos de "anilidas", y 36.6 mg/Kg/día en los de "aceite tóxico"). A pesar de esta elevada cantidad de oleil-anilida en la dieta, no se observaron diferencias entre los grupos de ratones tratados y sus controles en cuanto a la ingesta diaria de los

animales ni en cuanto al incremento del peso corporal durante los 60 días de tratamiento (no se presentan los datos). Esta falta de respuesta nos llevó a plantearnos la posibilidad de que una depleción de glutatión hepático de los animales antes del sacrificio podría incrementar las posibles diferencias entre los grupos, como había sido observado por otros autores en experimentos mas cortos (19). De hecho, se conoce que la reserva de glutatión en el hígado participa en los procesos de desintoxicación (20,21). Puesto que es conocido que el dietil-maleato acelera el recambio de glutatión hepático (21,22) y su efecto de depleción es relativamente corto (22), tratamos a todos los ratones con 0.01 ml de dietil-maleato/30 g de peso corporal durante los últimos cuatro días del experimento, sacrificándolos a las 14-15 horas de la última inyección. Durante los días de tratamiento con dietil-maleato se observó una ligera disminución del peso corporal de los animales de todos los grupos, y murieron cuatro ratones de los 60 que componían la experiencia (10/grupo): uno del grupo de anilida con dieta suplementada con vitamina E (AE), otro del grupo de aceite tóxico (T) y dos del de aceite tóxico con suplemento de vitamina E (TE). Cuando se sacrificaron los distintos grupos se observó que el peso del hígado y del bazo (Tabla 6) era inferior en los ratones tratados con aceite de oliva (controles) que no tenían suplemento de vitamina E (O) que los que lo habían tenido (OE). Este efecto de la vitamina E no se observó en los ratones que recibieron anilidas o aceite tóxico, haciéndose las diferencias con los controles estadísticamente significativas para el peso del hígado en el grupo A frente al O, y para el peso del bazo en los grupos AE y TE frente al OE (Tabla 6). En estos animales se determinaron también parámetros hemáticos (hemoglobina, hematíes, hematocrito y leucocitos), sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos (no se pre-

sentan los datos). En la actualidad estamos cuantificando otros parámetros metabólicos, así como realizando el estudio histopatológico de estos animales.

A falta de los datos indicados, de esta última serie experimental realizada con ratones, podemos extraer ya algunas conclusiones preliminares, las cuales coinciden con las indicadas anteriormente para las ratas: las diferencias en los pesos de órganos encontradas en los ratones ponen de manifiesto el haber logrado una ligera deficiencia en vitamina E en los grupos que no fueron suplementados con ella. La ingestión crónica con elevadas cantidades de oleil-anilida en la dieta o del aceite supuestamente tóxico, no han producido una reacción de toxicidad manifiesta en los ratones, independientemente de su disponibilidad vitamínica, y los pequeños cambios observados pueden ser simplemente el resultado de una activación de los procesos de eliminación de dichos componentes extraños (pero no tóxicos) de la dieta.

TABLA 6 PESOS DE HIGADO Y BAZO EN RATONES ALIMENTADOS DURANTE 60 DIAS CON DIETA DEFICIENTE EN ACIDO ASCORBICO Y VITAMINA E, SUPLEMENTADA O NO CON ESTA VITAMINA(E) Y CON ANILIDAS(A) O ACEITE SUPUESTAMENTE TOXICO(T).

Grupo experimental:	g de peso fresco					
	O	OE	A	AE	T	TE
Peso del hígado	1.13 [±] 0.07	1.55 [±] 0.19 [†]	1.42 [±] 0.08*	1.26 [±] 0.08	1.27 [±] 0.11	1.22 [±] 0.11
Peso del bazo	0.21 [±] 0.01	0.31 [±] 0.02 ^{†††}	0.19 [±] 0.03	0.21 [±] 0.04	0.18 [±] 0.02	0.21 [±] 0.02

Los ratones de todos los grupos fueron tratados con 0.01 ml de dietil-maleato/30g, los 4 últimos días. Los datos corresponden a medias ± E.S. de 5-8 animales/grupo. †= p "con" versus "sin" vitamina E, y *= p versus el respectivo grupo control (O ó OE): † ó *= p < 0.05, †††= p < 0.001.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos intentado determinar si la ingestión crónica de altas cantidades de oleil-anilida o de aceite supuestamente tóxico en ratas y ratones desencadena una respuesta que llegara a simular el cuadro tóxico descrito en humanos. El tratamiento con 24.7 mg de oleil-anilida/Kg durante 60 días a ratas alimentadas con dieta normal ó con 15.3 mg/Kg durante 35 días a ratas alimentadas con una dieta deficiente en ácido ascórbico y vitamina E, no produjo una respuesta tóxica. El aceite supuestamente tóxico, administrado en cantidades que aportaban 7.1 mg de oleil-anilida/Kg, durante 35 días de tratamiento y con dieta deficiente en ácido ascórbico y vitamina E, tampoco produjo una respuesta de toxicidad en la rata. El mismo tipo de experimento se realizó en ratones, aunque el tratamiento fué durante 60 días con 102.5 mg de oleil-anilida por Kg ó de aceite supuestamente tóxico, en cantidades que aportaban 36.6 mg de oleil-anilida/Kg. A su vez, en estos ratones, dado que los respectivos tratamientos no produjeron alteración de los pesos corporales con relación a los controles, se intentó estimular una posible respuesta mediante la administración de dietil-maleato durante 4 días antes del sacrificio, sin que tampoco se pudiera detectar un cuadro de toxicidad manifiesta, independientemente de una deficiencia o no de vitamina E en la dieta.

Todos estos datos negativos, permiten concluir que la ingesta crónica de oleil-anilida es prácticamente inocua para ratas y ratones. Esta conclusión concuerda con la baja toxicidad encontrada por otros autores en tratamientos con otros acil-derivados de la acetanilida (6), con amidas del ácido linoleico (7,23) ó incluso con la propia oleil-anilida (5), en otros animales experimentales. Todo ello

corroborar la sugerencia de Gordon (24) de que las anilidas de ácidos grasos de cadena larga carecen de toxicidad suficiente como para justificar el cuadro tóxico que se ha desarrollado en humanos.

Agradecimientos

El presente trabajo se ha realizado con una ayuda del Plan Nacional para el Síndrome Tóxico, Presidencia del Gobierno. Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Hernández Bolaños, Director del Laboratorio Central de Aduanas, por habernos facilitado la anilida utilizada, así como al Dr. J.L. Navarro Navarro, Jefe del Servicio de Hematología del Centro Ramón y Cajal de Madrid, por facilitarnos las determinaciones nematológicas realizadas.

REFERENCIAS

- 1.- Tabuenca, J.M., Lancet, Sept. 12, pg.567-568, 1981.
- 2.- Murphy, R.B. & Vodyanoy, V., Lancet i, 98, 1982.
- 3.- Pestaña, A. & Muñoz, E., Nature 298, 608, 1982.
- 4.- Pestaña, A., Mundo Científico 15, 605-610, 1982.
- 5.- Bernhard, K. & Gloor, U., Helv. Chim. Acta 35, 608-616, 1952.
- 6.- Starmer, G.A., McLean, S. & Thomas, J., Toxicol. Appl. Pharmacol. 19, 20-28, 1971.
- 7.- Fukushima, H., Toki, K. & Nakatani, H., J. Atheroscl. Res. 9, 57-64, 1969.
- 8.- Root-Bernstein, R. & Westall, F.C., Lancet, April 24, pg. 969-970, 1982.
- 9.- Vioque, A. y cols., en "Simposium Nacional sobre el Síndrome Tóxico". Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, pg. 514-533, 1982.
- 10.- Herrera, E. & Freinkel, N., Biochim. Biophys. Acta, 170, 244-253, 1968.

- 11.- Herrera, E., Knopp, R.H. & Freinkel, N., J. Clin. Invest. 48, 2260-2272, 1969.
- 12.- Aranda, A., Montoya, E. & Herrera, E., Biochem. J. 128, 597-604, 1972.
- 13.- Lasunción, M.A. & Herrera, E., Horm. Metab. Res. 13, 335-339, 1981.
- 14.- Argilés, J. & Herrera, E., Biol. Neonate 39, 37-44, 1981.
- 15.- Llobera, M., Seibel, M.J. and Herrera, E., Horm. Met. Res. 10, 319-324, 1978.
- 16.- Meyers, F.H., Jawetz, E. & Goldfien, A., en "Review of Medical Pharmacology", 5th ed., Lange Medical Pub. Los Altos, California, 1976.
- 17.- Parke, D.V. & Ioannides, C., Ann. Rev. Nutr. 1, 207-234, 1981.
- 18.- Goodman, L.S. & Gilman, A., en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 2nd. ed. The MacMillan Co., New York, 1955.
- 19.- Rodríguez Farré, E., comunicación personal.
- 20.- Mitchell, J.R. et al., en "Handbook Experimental Pharmacology", vol. XXVIII/3, J.R. Gillete and J.R. Mitchell, eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1975.
- 21.- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillete, J.R. & Brodie, B.B., J. Pharm. Exp. Ther. 187, 211-217, 1973.
- 22.- Lauterburg, B.H., Vaishnav, Y., Stillwell, W.G. & Mitchell, J.R., J. Pharm. Exp. Ther. 218, 51-58, 1980
- 23.- Fukushima, H., Aono, S. & Nakatani, H., J. Nutr. 96, 15-20, 1968.
- 24.- Gordon, R.S., Lancet ii, 1171-1172, 1981.

SUMMARY. Chronic treatment with anilides in an experimental study of the ethiology of the Spanish toxic oil syndrome. J. Frago, M. Palacín, A. Zorzano, B. Bonet, M.A. Lasunción, M. Durfort, M. Díaz y E. Herrera.

The present investigation was performed to determine whether chronic ingestion of large amounts of oleil-anilide or "supposed toxic oil" has toxic effects in rats and mice. Anilides synthesized from rapeseed oil dissolved in olive oil (0.2g/dl) were added to purine chow diet or to an ascorbic acid and vitamin E deficient diet in a final proportion of 20%. Rats fed one of these diets "ad libitum" for either 60 or 35 days were compared with control animals given the same diets supplemented with olive oil but without anilide. Other rats were treated in parallel with "supposed toxic oil" containing 600 p.p.m. of oleil-anilide, in the proportion of 20% in ascorbic and vitamin E deficient diet. In other groups of rats the vitamin deficient diet was supplemented with vitamin E. Food intake was similar in all groups tested and the amount of oleil-anilide ingested was approximately 15.3-24.7 mg/Kg body wt./day in the groups of anilide treatment and 7.1 mg/Kg body wt./day in those receiving the "supposed toxic oil". In comparison with their respective controls test animals exhibited minor changes in body weight change during the treatment, after which there were slight variations in organ weights, liver glycogen concentration, circulating metabolites (glucose, triacylglycerides, beta-hydroxybutirate, cholesterol and HDL-cholesterol), plasma proteins (total proteins concentration, IgG, and alfa, beta and gamma globulins), blood hemathologic parameters and histopathologic study. There was no index of toxicity in the rats treated with anilides or with "supposed toxic oil". These experiments were repeated for 60 days in groups of mice. Those receiving anilide had a daily intake of oleil-anilide of 102.5 mg/Kg body wt./day and those

given "supposed toxic oil" ingested 36.6 mg/Kg. All mice were treated with diet~~ary~~ ~~oil~~ for 4 days prior to sacrifice (0.01 ml/30 g ~~wt.~~ wt./day), for the depletion of hepatic glutathione. ~~Body~~ weight change was similar in all the groups of mice and ~~although~~ four animals died during treatment with diethyl~~er~~ ~~oil~~ (1 from the group of 10 receiving anilide without vitamin E supplement, 1 from the group of 10 receiving ~~anilide~~ plus vitamin E supplement, and 2 from the group of 10 receiving "supposed toxic oil" and vitamin E supplement there were no differences in liver and spleen weights or in hemathologic parameters. These results indicate ~~that~~ anilides are not toxic for rats and mice and support the hypothesis of Gordon (24) that these compounds are not sufficiently toxic to be responsible for the Spanish toxic oil syndrome.