

Efectos de la suplementación con silibina sobre la digestibilidad de los nutrientes, los parámetros hematológicos, los índices de función hepática y la concentración de mi-RNA específica del hígado en perros

- [Maciej Gogulski](#),
- [Adam Cieślak](#),
- [Julia Grabska](#),
- [Marie Ardois](#),
- [Małgorzata Pomorska-Mól](#),
- [Paweł A. Kołodziejcki](#),
- [Kacper Libera](#),
- [Viola Stropfová](#) &
- [Małgorzata Szumacher-Strabel](#)

[BMC Investigación Veterinaria](#) **volume 17**, Número de artículo: 228

(2021) [Citar este artículo](#)

Abstracto

Fondo

Las hepatopatías son un grupo importante de trastornos en perros en los que un cuidado nutricional adecuado es crucial. La suplementación con un hepatoprotector como la silibina puede mejorar la función hepática y no debe interferir con la digestibilidad de los nutrientes. El propósito de este estudio fue investigar el efecto de la silibina pura y el hepatoprotector comercial sobre la digestibilidad de los nutrientes, los índices de función hepática y el estado de salud en perros sanos (EXP1). Además, el segundo experimento (EXP2) investigó el efecto del hepatoprotector comercial en las pruebas de función hepática y la concentración de miRNAs asociados al hígado en perros con trastorno hepático idiopático.

Resultados

La digestibilidad de los nutrientes no se vio afectada por el tratamiento en EXP1. La suplementación alteró el perfil de ácidos grasos séricos, sin relevancia clínica. Los niveles de marcadores hepáticos como ALT, AST y GGT disminuyeron significativamente. En EXP2, la suplementación con hepatoprotector comercial que contenía silibina mejoró las pruebas de

función hepática. Se observó una disminución en los marcadores séricos hepáticos como ALT, AST y concentración de miR122.

Conclusiones

EXP1 confirmó que la silibina (ya sea pura o como hepatoprotector comercial) no interfiere con la digestión, lo que posteriormente no ejerce ningún efecto perjudicial sobre la salud y el metabolismo de los perros. En EXP2, la suplementación dietética con hepatoprotector comercial que contenía silibina dio lugar a una disminución de la actividad de los marcadores hepáticos séricos, acompañada de una disminución de la concentración de moléculas de miARN específicas del hígado. En consecuencia, se mejoraron los índices de función hepática. Por lo tanto, la suplementación con silibina puede servir como una herramienta terapéutica eficaz en perros con hepatopatías.

Fondo

Hoy en día, los dueños de mascotas son más conscientes y responsables del bienestar de sus animales. Afortunadamente, esta tendencia coexiste con un rápido aumento en el alcance de los servicios veterinarios para el asesoramiento dietético [1]. Tanto los dueños de mascotas como los profesionales deben saber que una dieta adecuada es crucial para la buena salud de su animal [2]. La dieta es más importante en caso de enfermedades graves, donde el cuidado nutricional adecuado puede ser una herramienta poderosa para apoyar la lucha del cuerpo contra la enfermedad. La literatura veterinaria describe recomendaciones dietéticas especiales para perros que sufren de trastornos cardíacos [3,4,5], renales [6, 7] o gastrointestinales [6, 8]. Los piensos específicos suelen ser más digeribles, ya que tienen una concentración reducida o elevada de determinados ingredientes o aditivos especiales que suelen ser metabolitos secundarios de las plantas [9,10,11]. Estos se conocen comúnmente como nutracéuticos, un término definido por primera vez por Stephen DeFelice en 1989 como un alimento o un aditivo alimentario que puede ayudar, prevenir o tratar una afección mediante la concesión de beneficios médicos o de salud [12]. Dado que los trastornos hepáticos tienen una alta prevalencia, se debe hacer especial hincapié en la nutrición de los perros hepatopáticos. Según Watson [13], el 12% de los perros en el Reino Unido fueron diagnosticados post mortem con hepatitis crónica. La etiología puede variar desde agentes infecciosos como el adenovirus canino 1 (CAV-1) o la leptospirosis, hasta factores no infecciosos como neoplasias, intoxicaciones o malformaciones hereditarias [14]. Independientemente del problema subyacente, la alimentación adecuada debe considerarse como un medio eficaz para tratar las enfermedades hepáticas. Una pregunta relevante es si la suplementación nutracéutica afecta aún más la digestibilidad de los nutrientes, lo cual vale la pena considerar, ya que se informa que los pacientes con trastornos hepáticos muestran signos de disfunciones gastrointestinales [15,16,17].

La silibina es un metabolito secundario de las plantas que presenta propiedades beneficiosas para la salud. La silibinina, compuesta por los isómeros A y B de la silibina, es uno de los flavonolignanos más activos presentes en el extracto de cardo mariano (*Silybum marianum*) [10]. Junto con otros flavonolignanos (isosilibina, silidianina y silicristina), forma un complejo conocido como silimarina. Hasta donde sabemos, la literatura no discute la

silibina como un antinutriente, y no se han realizado estudios de sus efectos sobre la digestibilidad de los nutrientes. Además, ningún estudio ha comparado la silibina pura con la suplementación con hepatoprotectores comerciales que contienen silibina. Por esta razón, en el primer experimento (EXP1) planteamos la hipótesis de que la suplementación ni de silibina pura (SIL) ni de hepatoprotector comercial (HEP), que contiene silibina como compuesto bioactivo, afecta a la digestibilidad de los nutrientes en perros sanos. Además, un grupo de control (CON) de perros no suplementados también participó en el estudio. A partir de entonces, asumimos que la suplementación mejora la función hepática, sin ejercer un efecto perjudicial sobre la salud general o los parámetros sanguíneos. En el segundo experimento (EXP2), planteamos la hipótesis de que la suplementación con HEP mejora la función hepática en perros hepatopáticos. Los objetivos principales de este estudio fueron: 1) investigar los efectos de la dieta suplementada con SIL o HEP sobre la digestibilidad de los nutrientes, el estado de salud general, los parámetros inmunológicos (citoquinas séricas, inmunoglobulinas y concentraciones de proteínas en fase aguda), así como los índices de función hepática en perros clínicamente sanos, y 2) examinar los efectos de la dieta suplementada con HEP sobre los índices de función hepática en perros con hepatopatías.

Resultados

Observaciones clínicas y mortalidad: EXP1

Durante el EXP1, todos los perros estaban sanos. No se observaron síntomas clínicos ni mortalidad.

Observaciones clínicas y mortalidad: EXP2

Durante el EXP2, todos los perros acudieron a consulta veterinaria con al menos un síntoma relacionado con el hígado, como disminución del apetito (9/15 perros), letargo/depresión (5/15 perros), ictericia (3/15 perros), poliuria y polidipsia (6/15 perros), vómitos (7/15 perros), diarrea (2/15 perros). No se observó mortalidad durante el tiempo de observación.

Composición química y perfil de ácidos grasos de la dieta: EXP1

La composición química de la dieta suministrada a los perros en EXP1 se indica en la Tabla [1](#), junto con su perfil de ácidos grasos.

Discusión

Los trastornos hepáticos son un grupo importante de patologías en los perros. Los pacientes con hepatopatías son nutricionalmente exigentes y se les debe proporcionar un alimento de alta calidad complementado con aditivos que presenten propiedades beneficiosas para el hígado y que no interfieran con la digestión. Un aspecto significativo de la digestibilidad de la dieta del perro es la presencia de factores antinutricionales en ella [18]. Nuestro estudio (en EXP1) sugiere que la silibina, el principio activo de la silimarina, no interfiere con los procesos de digestión. La ligera disminución de la digestibilidad del extracto etérico en los grupos experimentales podría deberse a un efecto laxante insignificante (posiblemente

causado por la reducción de las propiedades emulsionantes de la bilis que contiene metabolitos de la silibina) [19] o a la aparición de gastroenteritis subclínica, que se ha descrito como un efecto adverso raro de la silimarina [20]. Sin embargo, no se observaron signos de diarrea u otros cambios en la consistencia fecal en los grupos experimentales. No obstante, la silibina tiene propiedades colagógicas de las que deberíamos esperar una mejor digestión de los lípidos [21]. Hasta donde sabemos, ningún experimento ha investigado los efectos de la silibina en la digestibilidad de los nutrientes en perros. Sin embargo, la literatura discute estos efectos en otros animales: un informe sugiere que *Silybum marianum* (L.) como fuente de silimarina no tiene ningún efecto sobre la digestibilidad de los nutrientes en búfalos [22], mientras que un experimento con pollos de engorde que incorporaron semillas de *S. marianum* en la dieta resultó en una mayor digestibilidad de los nutrientes en términos de alimentos contaminados con micotoxinas [23]. El presente estudio no encontró diferencias clínicamente significativas en los parámetros hematológicos entre los grupos de perros. Asimismo, Chon y Kim [24] no observaron diferencias significativas en parámetros hematológicos como LEUCOCITOS, GLÓBULOS ROJOS, MCV, MCCH o MCHC entre el grupo control y el grupo tratado con silibina en caso de infestación por giardiasis canina. La actividad de las enzimas hepáticas disminuyó significativamente en los grupos experimentales (tanto SIL como HEP), al igual que en otros estudios con diversas disfunciones hepáticas asociadas [25,26,27]. Nuestro estudio muestra que, en perros sanos, los índices de función hepática no se vieron afectados negativamente por la suplementación con silibina. Además, algunos informes describen un efecto profiláctico de la silimarina que contiene silibina en gatos [28] y ratas [29]. Por ejemplo, la silimarina protegió el hígado en gatos sanos a los que se les administró acetaminofén. ALT/GPT, AST/GOT, ALP y LDH no aumentaron, como sucedió en gatos a los que se les administró paracetamol solo [30]. Es importante destacar que la intoxicación con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) ocurre con relativa frecuencia en la práctica de pequeños animales, como resultado de la administración no autorizada por parte del propietario. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los marcadores hepáticos elevados no siempre se asocian a la enfermedad hepática: el fenómeno puede deberse a un efecto transitorio de la administración de fármacos como el fenobarbital en perros epilépticos [31] o los glucocorticoides [32]. La literatura incluso describe causas congénitas relacionadas con la raza de marcadores hepáticos elevados, como la hiperfosfatemia familiar benigna en los huskies siberianos o el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina en los terriers escoceses (donde el marcador puede ser hasta cinco veces mayor que en otras razas) [32]. La suplementación tanto de HEP como de SIL alteró ligeramente el suero perfil de ácidos grasos. Estos cambios, estadísticamente significativos, se observaron en las pequeñas cantidades de ácidos grasos fisiológicamente presentes en el suero, y no son clínicamente relevantes. El aumento de la concentración de C15:0 y C17:0 y la consiguiente disminución de C20:5 n-3 pueden estar asociados a una interferencia moderada con el metabolismo lipídico [33], como se comenta más adelante. Hasta donde sabemos, no hay estudios que hayan investigado los cambios en la calidad del perfil de ácidos grasos séricos en animales suplementados con silibina. En nuestro estudio, la suplementación con HEP y SIL no afectó la concentración sérica de colesterol, sin embargo, la concentración de triglicéridos aumentó. Los resultados anteriores no se correlacionan con el estudio de Sun [34], quien demostró que en un modelo de ratón con

síndrome de hígado graso no alcohólico, la suplementación con silibina redujo significativamente la acumulación de lípidos séricos y hepáticos. Resultados similares fueron obtenidos por Ramakrishnan en ratas [35] con carcinoma hepatocelular inducido. Además, la combinación de silimarina y suplementos de ácidos grasos n-3 puede mejorar el efecto antihiperlipidémico en ratas con síndrome metabólico [36]. Estas discrepancias con nuestros resultados se deben probablemente al hecho de que se utilizaron diferentes razas y animales con trastornos hepáticos inducidos, en lugar de animales sanos como en nuestro estudio (EXP1).

Se cree que la silimarina, la fuente de la silibina, protege contra la lesión renal al normalizar el metabolismo de los lípidos [37]. Nuestro estudio sugiere que la suplementación no tuvo ningún efecto sobre los parámetros de la orina y, por lo tanto, sobre la función renal, en perros sanos (EXP1). La silimarina se elimina principalmente por la bilis [38], y no altera el pH de la orina, lo cual es una característica significativa en términos de formación de urolito y el diagnóstico de enfermedades (como la diabetes mellitus) mediante análisis de orina, ya que no oculta los síntomas. Además, dado que la excreción de algunos fármacos (como el fenobarbital o la gentamicina) está relacionada con el pH de la orina [39], la falta de efecto tanto de la preparación comercial como de la suplementación con silibina pura sobre el pH de la orina parece ser ventajosa.

La silimarina muestra efectos antiinflamatorios sobre los linfocitos T in vitro [40,41,42]. Las propiedades inmunomoduladoras de la silimarina oral (silibina) in vivo en perros no se han descrito previamente. Este estudio encontró que ni la silibina pura ni el hepatoprotector comercial afectaron la mayoría de los parámetros inmunológicos e inflamatorios. La suplementación tuvo un efecto significativo solo sobre la concentración de IL4 e IL10 en suero. Se ha descrito que las citocinas inmunorreguladoras como la IL4 y la IL10 ejercen propiedades antiinflamatorias en varios tipos de células [43,44,45]. El nivel de IL4 fue significativamente mayor en los grupos de tratamiento que en el grupo CON, mientras que la concentración de IL10 fue mayor en el grupo SIL que en el grupo CON. Estudios previos con sujetos humanos han demostrado una relación significativa entre una mayor inflamación hepática y la posterior progresión de la fibrosis [46, 47]. Por lo tanto, el control de la inflamación puede ser una estrategia útil contra las secuelas de la enfermedad hepática crónica. Aquí hemos demostrado que la silibina tiene la capacidad de aumentar la concentración de citoquinas antiinflamatorias en suero y no tiene ningún efecto sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias in vivo, lo que puede considerarse un efecto positivo. La administración de silibina en perros ha sido bien documentada como una herramienta terapéutica eficaz para diferentes tipos de lesiones hepáticas, como la toxemia inducida, la intoxicación por medicamentos, la quimioterapia y la hepatitis crónica [26,27,28, 48]. Varios informes también describen sus propiedades antivirales y antineoplásicas en animales de laboratorio o cultivos celulares [35, 49, 50]. Del mismo modo, en el estudio actual, la suplementación con silibina mejoró la función hepática independientemente de la enfermedad hepática subyacente. En consecuencia, observamos una disminución significativa de los marcadores enzimáticos hepáticos en perros con trastornos hepáticos (EXP2).

En los últimos años, además de los marcadores tradicionales de enfermedades hepáticas, como ALT, AST, ALP y GGT, se utilizan cada vez más marcadores genéticos, incluidos los

cambios en el nivel de microARN [51,52,53]. Estudios previos han demostrado que miR-122 y miR-126 son altamente específicos para el hígado en perros [52, 54, 55], mientras que miR-192 es menos específico. Sin embargo, la investigación in vitro en ratones también ha demostrado que los cambios patológicos que acompañan al daño hepático pueden reflejarse en la expresión de miR-192 [56]. Por lo tanto, decidimos examinar estos tres tipos de miARN como marcadores potenciales para el metabolismo hepático. En EXP1, investigamos si la administración de SIL y HEP afectaba el metabolismo hepático de perros sanos; Dado que este estudio no mostró ningún impacto negativo, decidimos investigar el efecto de la HEP en animales con trastornos hepáticos. En EXP2, encontramos que HEP disminuyó la expresión relativa de miR-122 después de 28 días de suplementación, y también reguló a la baja miR-126; sin embargo, en el caso de miR-126, solo se observó una ligera tendencia (H1 vs. H28), que no fue estadísticamente significativa ($P = 0,241$).

La utilidad de los miRNAs en el diagnóstico de enfermedades hepáticas ha sido confirmada por datos en la literatura que muestran que se observa un aumento de la expresión de miR-122 en casi todas las enfermedades hepáticas en perros, como la hepatitis aguda y crónica, el carcinoma hepatocelular, el linfoma y otras enfermedades biliares como la obstrucción extrahepática del conducto biliar [51]. Estos resultados también han sido confirmados por Oosthuyzen et al. [55], quienes demostraron que los cambios en este parámetro no están asociados con la raza, la edad o el sexo del perro, y que el número de copias de miR-122 aumenta solo durante la aparición de la enfermedad hepática. Además, demostraron una correlación positiva entre miR-122 y ALT, que es uno de los principales marcadores utilizados en el diagnóstico de enfermedades hepáticas [55]. Basándonos en nuestros resultados en EXP2, y debido a la baja especificidad de los cambios en miR-122 en relación con diversas enfermedades hepáticas (como demostraron Dirksen et al. en 2016), solo podemos concluir que el metabolismo de los órganos mejoró [51].

El segundo tipo de miRNA investigado en nuestro estudio fue el miR-126. Aunque solo se observaron cambios menores para el grupo HEP (H1 vs. H28), decidimos estudiar este tipo de miRNA porque otros estudios en humanos han indicado que miR-126 también podría usarse como marcador de enfermedad hepática [56]. Esto también fue confirmado indirectamente en perros por Dirksen et al. (2016) [51], quienes demostraron que un mayor número de copias de miR-126 es típico de la hepatitis crónica y de otras enfermedades hepáticas, como el adenoma hepatocelular, el carcinoma hepatocelular o la hepatitis aguda. Esto puede indicar una mayor especificidad de este marcador en el diagnóstico de enfermedad hepática en perros. Nuestros resultados mostraron solo una tendencia creciente en miR-126 ($P = 0,053$; sanos vs. H1), lo que, junto con los marcadores bioquímicos, puede indicar que los perros estaban en un estado de transición de la fase aguda a la crónica de la hepatitis. Además, cabe destacar que, después de la suplementación con HEP, se observó una disminución en el número de miR-126 s (H1 vs. H28), aunque este cambio nuevamente careció de significación estadística.

En general, nuestros resultados en EXP2 mostraron que las enfermedades hepáticas se acompañaron de un aumento de miR-122 (H1 vs. H28), mientras que la administración de hepatoprotector comercial lo disminuyó; esto puede indicar que el tratamiento con HEP tiene un efecto positivo. Cabe señalar que solo hay datos limitados en la literatura sobre los cambios en la expresión de miRNAs en la sangre durante las enfermedades hepáticas en

perros. Por lo tanto, decidimos apoyar nuestra investigación con otros parámetros diagnósticos diferentes. También observamos una disminución en la actividad de ALT, AST y GGT después de la administración del hepatoprotector comercial, lo que también confirma que este suplemento mejoró el metabolismo hepático.

Las propiedades hepatoprotectoras de la silimarina, que contiene silibina, se asocian principalmente con su efecto antioxidante, antifibrótico, antiinflamatorio y colagógico [14]. Además, la silimarina acelera la regeneración hepática [57]. A nivel molecular, la silimarina inhibe la peroxidación lipídica y la síntesis de especies reactivas de oxígeno. También se ha encontrado que la silimarina interactúa con las membranas celulares y mitocondriales, modificando el flujo de sustancias a través de ellas [14]. En una práctica regular de animales pequeños, puede ser difícil identificar con precisión el trastorno hepático exacto (siguiendo las pautas de la WSAVA) debido a la falta de equipo médico y las limitaciones financieras, por lo tanto, el tratamiento sintomático con silibina es totalmente aceptable y razonable.

Una limitación importante de nuestros experimentos es el hecho de que no estudiamos ni a los perros utilizados para el perfil hormonal de EXP2 ni realizamos una biopsia hepática. De ahí que nuestro estudio sea considerado como un piloto, llevado a cabo tras el resultado positivo del efecto de los aditivos probados obtenido durante la EXP1. Aunque hemos publicado estos resultados, EXP2 no es un estudio completo que abarque todos los aspectos de los trastornos hepáticos caninos. No obstante, creemos que esto puede apuntar a nuevas direcciones de investigación en relación con este tema. También reconocemos que los resultados de EXP2 requieren más investigación, que planeamos realizar.

Conclusión

En conclusión, hemos confirmado que, en perros sanos, la suplementación con silibina, a razón de 12,75 mg por 10 kg de peso corporal, o con un hepatoprotector comercial que contenga silibina, a la misma dosis, no interfiere con la digestión del nutriente, y posteriormente no ejerce ningún efecto perjudicial sobre los índices de función hepática, la salud o los parámetros sanguíneos. En perros con hepatopatías, la suplementación con hepatoprotector comercial que contenía silibina, a una dosis de 12,75 mg por 10 kg de peso corporal, disminuyó la actividad de los marcadores hepáticos séricos, lo que se acompañó de una disminución en la concentración de moléculas de miARN específicas del hígado (principalmente miR-122). De este modo, se mejoró la función hepática. En general, la suplementación con silibina no tiene ningún impacto adverso en perros sanos y favorece la función hepática en perros con hepatopatías.

Métodos

Animales y diseño experimental: EXP1 y EXP2

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices del Comité Ético Local para la Investigación con Animales (Ministerio de Ciencia y Educación Superior, Polonia), así como de acuerdo con las directrices ARRIVE. El estudio fue aprobado por la declaración 28/2020 de la Comisión Local de Ética para Investigaciones en Animales en Poznań, Universidad de Ciencias de la Vida de Poznań. Los dueños de los perros dieron su

consentimiento informado por escrito. La investigación consistió en dos estudios consecutivos. El primero, EXP1, encuestó a un grupo de dieciocho perros beagle adultos de laboratorio sanos ($n = 18$, nueve hembras y nueve machos, de 2 años de edad). En EXP1 se utilizó un diseño de 3×3 cuadrados latinos con 3 tratamientos (CON, HEP, SIL) y tres períodos. Cada tratamiento se administró a seis perros (tres hembras y tres machos) en un período determinado, dando dieciocho réplicas. La dieta de control (CON) estuvo constituida por una dieta básica comercial (Addvena, Poznań, Polonia) compuesta por cordero (incluida la carne fresca de cordero al 50%), patatas, guisantes, pulpa de remolacha, grasa animal, proteína de patata, puré de tomate, alfalfa seca, linaza, levadura de cerveza, aceite de salmón, fosfato de sodio dihidratado, raíz de achicoria, glucosamina y sulfato de condroitina. La primera dieta experimental estuvo compuesta por el CON suplementado con hepatoprotector comercial que contenía silibina (HEP) (Hepaxan, Vebiot, Dębica, Polonia), mientras que la segunda dieta fue suplementada con CON con silibina pura (SIL). La dieta de ambos grupos contenía silibina, pura o preparada, a una dosis de 12,75 mg por 10 kg de peso corporal. El EXP1 se dividió en tres períodos, cada uno con una duración de 28 días: que consistió en una fase de adaptación de 23 días (días 1 a 23) y una fase de recolección fecal total de 5 días (días 24 a 28), seguida de un período de lavado de 12 días. El experimento duró 108 días (cada perro tuvo tres períodos de 28 días con períodos de lavado de 12 días entre ellos). Dióxido de titanio (TiO_2) se incluyó en las dietas como marcador de digestión al 0,2% de la dieta. La concentración bruta de nutrientes analizada en las dietas y los perfiles de ácidos grasos de la dieta se presentan en la Tabla 1. Cada perro se alojaba individualmente en una perrera que permitía el contacto social entre los animales, se alimentaba dos veces al día y tenía libre acceso al agua. Durante la fase de adaptación, los perros tuvieron acceso a un patio de recreo exterior para hacer ejercicio y socializar. El requerimiento energético de mantenimiento (MER) se estimó de acuerdo con FEDIAF [58] y las dietas cumplieron con el MER de los perros. Todos los animales que participaron en el experimento estaban al día con sus calendarios de vacunación y desparasitación antes del inicio.

EXP2 utilizó perros de clientes ($n = 15$), remitidos al Centro Universitario de Medicina Veterinaria de la Universidad de Ciencias de la Vida de Poznań, en los que se diagnosticó un trastorno hepático. El proceso diagnóstico no reveló un agente etiológico específico, por lo que estos casos se consideraron idiopáticos. En la Tabla Suplementaria 2 se puede encontrar un perfil de los perros que participan en el EXP1. Los criterios establecidos para el diagnóstico de trastorno hepático fueron la demostración clínica de al menos uno de los síntomas descritos como más prevalentes en perros con hepatitis crónica [48], incluyendo disminución del apetito, letargo/depresión, ictericia, ascitis, UP/PD, vómitos, diarrea o, posteriormente, un aumento de al menos tres de estos cuatro marcadores hepáticos: alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT). Los criterios de exclusión fueron enfermedades infecciosas o parasitarias, enfermedades sistémicas, neurológicas o traumáticas, síntomas generales de intolerancia alimentaria o alergia en el pasado. Además, se excluyeron del estudio las personas con hepatocarcinoma confirmado u otros cánceres asociados al hígado. Se aconsejó a los dueños de perros que comenzaran a complementar la dieta de sus mascotas con una preparación disponible comercialmente que contuviera silibina

(Hepaxan, Vebiot, Dębica, Polonia) a la dosis recomendada por el fabricante ([Tabla suplementaria 2](#)).

Estado de salud y puntuación de condición corporal (BCS): EXP1 y EXP2

El peso promedio fue de 18,1 kg para los machos y 12,9 kg para las hembras en la EXP1, y de 28,7 kg para los machos y 22,1 kg para las hembras en la EXP 2. En el EXP1 se midió el peso corporal en los días 1 y 28 del periodo experimental y se registró diariamente la ingesta de alimento. La duración de la suplementación del estudio fue de 28 días. En el EXP2, el peso corporal se midió al inicio (día 1) y al final (día 28) de la suplementación con el hepatoprotector. Para todos los perros en EXP1, la puntuación de la condición corporal (BCS) se evaluó durante todo el período experimental de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales [59]. Los perros de EXP1 y EXP2 se sometieron a controles semanales que consistieron en un examen físico, que incluyó medición de la temperatura rectal, inspección de las membranas mucosas, auscultación cardíaca y pulmonar y palpación de estómago (examen abdominal). Los perros fueron evaluados como clínicamente sanos si el examen físico no reveló hallazgos patológicos.

Toma de muestras de sangre: EXP1 y EXP2

Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción cefálica de la siguiente manera:

1. 1)
EXP1: el último día (día 28) de cada período de tratamiento a las 6:00 a.m.
2. 2)
EXP2: el primer día (H1) de la suplementación y 28 días después (H28).

Tanto en el EXP1 como en el EXP2, las muestras de sangre se recogieron en dos tubos vacutainer. Uno de ellos contenía K_3 anticoagulante EDTA y se utilizó para el examen hematológico; el segundo tubo contenía gel separador de suero y se utilizó para obtener suero para el examen bioquímico y de miARN, perfiles de ácidos grasos y análisis sérico de interleucina, inmunoglobulina y proteínas de fase aguda. La sangre del segundo juego de tubos se dejó a temperatura ambiente para la formación de coágulos sanguíneos y luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C para obtener suero. Las muestras de suero se transfirieron a tubos Eppendorf, se etiquetaron, sellaron y congelaron a -80 °C para esperar el análisis.

Hematología y análisis bioquímico sérico: EXP1 y EXP2

El hemograma se realizó con un analizador hematológico automático Vet ABC Animal Blood Counter (ABX, Montpellier, Francia) con los siguientes parámetros: recuento de glóbulos rojos (RBC), recuento de neutrófilos (NEUT), recuento de linfocitos (LYM), recuento de monocitos (MONO), recuento de eosinófilos (EOS), recuento de basófilos (BASO), hemoglobina (HEM), hematocrito (HTC), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina

corpúscular media (CHC), concentración media de hemoglobina corpúscular (MCHC), recuento de glóbulos blancos (WBC) y plaquetas (PLT).

El análisis bioquímico de ALT, ALP, AST, GGT, alfa amilasa, proteína total, bilirrubina total, colesterol, creatinina quinasa (CK), fructosamina, glutamato deshidrogenasa (GLDH), glucosa (GLUC), creatinina, deshidrogenasa láctica (LDH), lipasa (DGGR), urea, triglicéridos (TG), cloruro, fósforo inorgánico, magnesio, potasio, sodio, calcio, albúmina, globulina y relación albúmina/globulina se realizó utilizando un analizador Dade Behring Dimension RxL (Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, DE, EE.UU.).

Los rangos de referencia utilizados para evaluar el estado de salud a partir de los parámetros hematológicos y bioquímicos se basaron en el *Manual Veterinario Merck* [60].

Análisis de interleucinas séricas, inmunoglobulinas y proteínas de fase aguda: EXP1

Con el fin de determinar las concentraciones de los parámetros inmunológicos seleccionados, se utilizaron kits de ELISA cuantitativos específicos de cada especie disponibles en el mercado de la siguiente manera: para IgA, IgG e IgE (Wuhan Fine Biotech, China), para IgM (Signalway Antibody, MA, EE. UU.), para las concentraciones de IL1 β , IL4, IL6, IL8 e IL10 (Wuhan Fine Biotech, China), proteína C reactiva (PCR) (BlueGene, Shanghái, China), amiloide-A sérico (SAA) (ABclonal, Massachusetts, EE.UU.), haptoglobina (Cusabio, TX, EE.UU.). Antes del análisis, todas las muestras de suero se diluyeron (dependiendo del rango de ensayo y de la concentración esperada de analito). Para cada prueba, se probaron diluciones seriadas de patrones con el fin de obtener una curva de calibración, que luego se ajustó por computadora. A partir de esta curva de calibración, se calcularon los valores de las muestras de concentración de proteínas desconocidas. Todos los análisis se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Recogida de muestras de dieta y heces: EXP1

Las muestras de dieta se recogieron diariamente durante la fase de recogida fecal (días 24 a 28) de cada período y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. Las heces se recogieron diariamente desde el día 24 hasta el 28, incluso en el momento de las caminatas diarias. Las muestras de heces recién recogidas se almacenaron a -20 °C. La excreción fecal diaria individual total se pesó, se mezcló y se almacenó a -20 °C a la espera de un análisis más detallado.

Análisis químico de dietas y heces y cálculo de digestibilidad: EXP1

Las muestras fecales se secaron durante 72 h a 55 °C, siguiendo las directrices de AOAC International [61]. Las heces secas se molieron en un molino de laboratorio (ZM200, Retsch, Haan, Alemania) utilizando un tamiz de 1 mm. La composición química de las muestras de piensos y heces se analizó siguiendo el método AOAC [61] n.º 934.01 para la materia seca, el método n.º 976.05 para la proteína bruta (utilizando un analizador Kjeld-Foss Automatic 16.210) y el método n.º 973.18 para la grasa bruta (utilizando un analizador Soxtec System

HT). La digestibilidad aparente del tracto total (ATTD) de los nutrientes individuales en relación con la proporción de TiO_2 se calculó como porcentaje en base a la siguiente ecuación:

$$ATTD = 100 - 100 \left(\frac{TiO_2 \text{ dieta}}{TiO_2 \text{ heces}} \right) \times \left(\frac{\text{nutrient}_{\text{dieta}}}{\text{nutrient}_{\text{heces}}} \right)$$

Perfil de ácidos grasos (AG) dietéticos y séricos: EXP1

La concentración de AG se determinó mediante un cromatógrafo de gases [62] con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron 3 mL de solución de NaOH 2 M a 1 g de alimento o 0,5 ml de muestra de suero, respectivamente, en tubos con tapón de rosca (vidrio, 15 mL) para la hidrólisis de grasa. Las muestras de AG hidrolizadas se incubaron en un calentador de bloque a 90 °C durante 40 min. El análisis del éster metílico de ácidos grasos (FAME) se realizó en un cromatógrafo de gases (GC Bruker 456-GC, Billerica, MA, EE. UU.) equipado con una columna capilar (sílice fundida de 100 m, diámetro interior de 0,25 mm, espesor de película de 0,25 µm; Chrompack CP7420, Agilent HP). Los ácidos grasos se identificaron en función de sus tiempos de retención y se expresaron como g/100 g AG. Los picos observados se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con los estándares FAME (37 FAME Mix, Sigma Aldrich, PA, EE.UU.) utilizando una estación de trabajo Galaxie 10.1 (Varian, CA).

Muestras de orina y análisis de orina: EXP1

La orina capturada libremente se recolectó el último día de cada período de alimentación utilizando un dispositivo de recolección de orina Uripet (Rocket Medical, Watford, Inglaterra). A continuación, se almacenaron 3 ml de orina a -20 °C y se analizaron la creatinina, el cortisol y el pH utilizando la estación VetLab (IDEXX Polonia) en un plazo de dos semanas tras la toma de muestras.

Expresión de miARN sérico: EXP1 y EXP2

La investigación de los efectos de los compuestos de prueba sobre la expresión de miRNA en el suero sanguíneo se realizó en dos experimentos: en EXP1, se examinó el efecto de la suplementación comercial con hepatoprotector y silibina sobre la expresión de miRNAs en perros sanos (EXP1). En EXP2, investigamos el efecto del hepatoprotector comercial sobre la expresión de miRNA en perros con trastornos hepáticos. Los perros sanos de la EXP1 se utilizaron como grupo control en la EXP2.

El miRNA se aisló utilizando el reactivo de lisis QIAzol y el kit de suero/plasma miRNeasy (Qiagen, Alemania). Se añadió control endógeno a las muestras durante el aislamiento (miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Contro; Qiagen, Alemania). Tras la extracción y elución del ARN, las muestras se congelaron inmediatamente a -80 °C. El contenido de ARN y la pureza relativa se determinaron mediante el método espectrofotométrico UV-Vis con un nanofotómetro NP80 (Implen, Múnich, Alemania). La transcripción inversa se realizó utilizando un kit miScript II RT, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla maestra

se preparó en bloques de enfriamiento y contenía 4 µl de tampón HiSpec de 5×, 2 µl de mezcla de nucleicos de 10×, 2 µl de transcriptasa inversa (RT) y 2 µl de agua libre de RNasa por reacción, lo que da un volumen total de 20 µl. Se añadieron 10 µl de la mezcla maestra a 10 µl del ARN total extraído del suero. La reacción se realizó en un Mastercycler (Eppendorf, Alemania) a 37 °C durante 60 min, seguido de 95 °C durante 5 min para inactivar el RT. La expresión relativa de miRNAs (miR-192, miR-122 y miR-126) se midió mediante PCR en tiempo real en QuantStudio12K Flex (Applied Biosystems, USA) utilizando cebadores específicos (MS00029883; Cf_miR-192_1 miScript, MS00029400; Cf_miR-122_1 miScript, MS00029428; Cf_miR-126_1 miScript; Qiagen, Alemania) y el kit de PCR verde miScript SYBR (Qiagen, Alemania). SNORD72 y RNU6-2 se utilizaron como controles endógenos (MS00033719; Hs_SNORD72_11, MS00033740; Hs_RNU6-2_11; Qiagen, Alemania). La cuantificación relativa de la expresión de miRNA se calculó con el método 2- $\Delta\Delta C_t$.

Análisis de datos

Ambos conjuntos de datos para EXP1 y EXP2 se analizaron con el software IBM SPSS Statistics 24 (SPSS Inc., Armonk, USA). Para cada variable en EXP1 se realizó un análisis de medida repetida (ANOVA de una vía) con la prueba de Tukey como análisis post-hoc. Se aceptó un valor significativo a $p < 0,05$. En ambos conjuntos de datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos, mientras que en los datos de EXP1 se evaluó la homogeneidad de la varianza a través de la prueba de Levene. Las variables en EXP2 se compararon mediante la prueba t de Student dependiente para variables distribuidas normalmente con un valor significativo aceptado a $p < 0,05$.

Disponibilidad de datos y materiales

Los conjuntos de datos utilizados y analizados en el presente estudio están disponibles a través del autor correspondiente previa solicitud razonable.

Abreviaturas

ALT:

alanina aminotransferasa

ALP:

fosfatasa alcalina

AST:

aspartato aminotransferasa

BASO:

Basófilos

CONTRA:

Grupo de control

CRP:

Proteína C reactiva

EOS:

eosinófilos

GLDH:
glutamato deshidrogenasa

GLUC:
glucosa

GGT:
gamma glutamil transpeptidasa

H1:
Primer día de suplementación

H28:
Vigésimo octavo día de suplementación

DOBLADILLO:
hemoglobina

HTC:
hematocrito

HEPATITIS:
Dieta alimentada en grupo suplementada con hepatoprotector comercial

LYM:
linfocitos

MCV:
Volumen corpuscular medio

MCH:
hemoglobina corpuscular media

MCHC:
Concentración media de hemoglobina corpuscular

MONO:
monocitos

NEUT:
Neutrófilos

PLT:
Plaquetas

RBC:
glóbulos rojos

SAA:
amiloide sérico-A

SIL:
Dieta alimentada en grupo suplementada con silibina pura

CMB:
glóbulos blancos