

ESTUDIO DE LA UNIÓN DE SILIMARINA Y (+)-CIANIDANOL-3 A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE POLLO

J. M. Serrano Caballero*, L. F. Cabanas Córdoba** y F. Infante Miranda**

* Cátedra de Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

** Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

Recibido: 26 abril

RESUMEN

Se estudia comparativamente la unión de la silimarina y del (+)-cianidanol-3 a las proteínas plasmáticas del pollo de carne mediante diálisis de equilibrio a temperatura ambiente.

Para la silimarina, los porcentajes de unión han oscilado entre 92'65 y 98'75 (valor medio de 94'53), en tanto que para el (+)-cianidanol-3 el rango ha oscilado entre márgenes mayores, 44'50 y 89'89 con un valor medio de 64'10.

Palabras clave: Unión a proteínas, porcentajes de unión, silimarina, (+)-cianidanol-3.

SUMMARY

The binding of silymarin and (+)-cyanidol-3 to plasmatic proteins of poultry by equilibrium dialysis at room temperature has been studied.

Binding percentages have fluctuated for silymarin between 92'65 and 98'75 (mean value 94'53) and for (+)-cyanidol-3 between 44'50 and 89'89 (mean value 64'10).

Keywords: Protein binding, Binding percentages, Silymarin, (+)-cyanidol-3.

INTRODUCCIÓN

La silimarina y el (+)-cianidanol-3 son dos productos naturales que se obtienen del *Silybum marianum* y del *Uncaria gambir* respectivamente. Ambos productos son de estructura flavonoide y el primero de ellos está constituido por tres isómeros —silibina, silidianina y silicristina—, de los cuales la silibina es el más importante.

La principal característica farmacológica de estos dos principios es su actividad antihepatotóxica, ampliamente recogida en la bibliografía, tanto desde el punto de vista experimental —hepatopatías inducidas por tóxicos muy di-

versos (RAUEN et al., 1973; SCHRIEWER y RAUEN, 1973a, b, VOGEL, 1979, GAJDOS et al., 1969, 1973, VIDELA et al., 1981)— como desde el punto de vista clínico —hepatopatías tóxicas e infecciosas (REALLINI et al., 1975, SABA et al., 1979; BLUM et al., 1977, SONDERN y LEUBE, 1978)—.

En trabajos anteriores, SERRANO (1982), SERRANO e INFANTE (1983), SERRANO et al. (1984, 1985), CABANÁS (1984 y CABANÁS et al. (1984), se estudian las distintas características farmacocinéticas de silimarina y (+)-cianidanol-3 en aves domésticas, así como la interacción con proteínas plasmáticas de diferentes especies.

Por todo ello, en el presente trabajo presen-

tamos los resultados obtenidos en el estudio de la interacción entre la silimarina y el (+)-cianidanol-3 en pollos de carne, debido a que esta especie sufre con relativa frecuencia procesos tóxico-metabólicos que afectan al hígado, como consecuencia, entre otros factores, del tipo de explotación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha utilizado una mezcla de sangres procedentes de pollos con peso comprendido entre 2.5 y 3 kilos. Esta mezcla se centrifugó a 2.500 r.p.m. en una centrifuga MSE Superminor al objeto de recoger el plasma sobrenadante.

Se ha empleado la técnica de diálisis en el equilibrio utilizando membrana de celofán Wiskin Dialysis Tubing, Type 8/32 de Serva preparada como indican RUDMAN y KENDALL (1957) modificada por SERRANO et al. (1984). Acondicionadas las membranas, se han llenado las bolsas con 1 ml., de plasma. Las concentraciones de silimarina (valorada como silibina por Boehringer Sohn Ingelheim S.A.E. con el 72 por ciento de riqueza) empleadas han oscilado entre 5'58 y 44'67 mg/l, en tanto que las de (+)-cianidanol-3 (valorado por Zyma Ibérica, S.A., con riqueza comprendida entre 95 y 100 por ciento) lo han hecho entre 4'03 y 32'25 mg/l.

De las soluciones de silimarina o de (+)-cianidanol-3, realizadas en un tampón de fosfatos de pH 7.4 y a la concentración de 0'065 molar, se tomaron 9 ml., que se dializaron contra 1 ml. de plasma en las bolsas de celofán. La diálisis se ha mantenido durante 22 a 24 horas a temperatura ambiente.

Todos los ensayos se han realizado por triplicado y se han utilizado los valores medios. Siempre se empleó un blanco en el que se dializó el tampón contra plasma.

La determinación cuantitativa de las concentraciones de silimarina se hizo midiendo la absorbencia que presenta este producto en medio alcalino a 320 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 55 B con U.V. (SERRANO, 1982). En relación con el (+)-cianidanol-3, el método de cuantificación empleado ha sido el de GILES y GUMMA (1973) que se basa en la medida del color producido por el aldehído p-dimetilaminoacínámico en medio ácido de 638 nm.

RESULTADOS

A partir de los valores de absorbancia obtenidos se calculan las concentraciones de silimarina total (en el interior de las bolsas de diálisis), libre (en los tampones externos) y conjugada a las proteínas (diferencia entre ambas) que se muestran en el cuadro 1.

CUADRO I
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE SILIMARINA TOTAL, LIBRE Y CONJUGADA A PROTEÍNAS Y PORCENTAJES DE UNIÓN

CONCENTRACIÓN TOTAL mg/l	CONCENTRACIÓN LIBRE mg/l	CONCENTRACIÓN CONJUGADA mg/l	PORCENTAJES DE UNIÓN
34'42	0'43	33'89	98'75
52'24	3'41	48'83	93'47
108'89	7'33	101'56	93'27
205'69	15'11	190'58	92'65

De igual manera, se obtienen las concentraciones total, libre y conjugada a las proteínas plasmáticas de (+)-cianidanol-3 que aparecen en el cuadro 2.

En ambas tablas se indica en la primera columna la concentración de fármaco que se produciría si no hubiese adsorción ni por la membrana de celofán ni por la proteína. La última columna muestra los porcentajes de unión de cada fármaco a las proteínas plasmáticas.

Por último, se señalan en el cuadro 3 los porcentajes medios de recuperación que se han obtenido tras la diálisis para ambos hepatoprotectores.

DISCUSIÓN

Del estudio de los cuadros I y II observamos una marcada diferencia en las proporciones de fármaco total, libre y conjugado entre ambos productos. Mientras que la silimarina conjugada a las proteínas presenta unas concentraciones más elevadas, la concentración libre llega incluso a sobrepasar a la conjugada a proteínas.

Ello incide sobremanera en los porcentajes de unión, como se aprecia en las citadas tablas, ya que para el primero de los fármacos dichos valores son siempre superiores al 90 por ciento, tomando como valor medio un porcentaje de unión de 94'53. Estos valores tan elevados se producen en la interacción entre la silimarina y las proteínas plasmáticas de diversas especies, así SERRANO et al. (1984), encuentran porcentajes que oscilan entre 57'48 para la oveja, como un valor medio más bajo, y 92'96 para la cabra, como valor medio más elevado, estando comprendidos entre estos valores los correspondientes a cerdo,

CUADRO 2
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE (+)-CIANIDANOL-3 TOTAL, LIBRE Y CONJUGADO A PROTEÍNAS Y PORCENTAJES DE UNIÓN

CONCENTRACIÓN TOTAL mg/l	CONCENTRACIÓN LIBRE mg/l	CONCENTRACIÓN CONJUGADO mg/l	PORCENTAJES DE UNIÓN
4'75	0'48	4'27	89'89
9'22	3'04	6'18	67'03
19'60	8'83	10'77	54'95
35'26	19'57	15'69	44'50

vaca y hombre con cifras de 75'00, 84'20 y 90'61 respectivamente.

En un trabajo posterior SERRANO et al. (1985) encuentran que la constante de afinidad de la silimarina a la seroalbúmina humana tiene un valor de $1.3 \times 10^4 M^{-1}$, pudiendo unirse a esta proteína hasta en cinco lugares diferentes, mientras que la afinidad disminuye para la seroalbúmina bovina ($7.5 \times 10^3 M^{-1}$) aunque esta proteína puede fijar hasta siete moléculas de fármaco.

CUADRO 3
PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN MEDIOS TRAS LA DIÁLISIS DE EQUILIBRIO

	Silimarina %	(+)-cianidanol-3 %
	76'00	27'76
	82'52	50'42
	87'00	68'29
	85'00	72'85
Media	82'63	54'83

Con respecto al (+)-cianidanol-3, su porcentaje de unión medio es de 64'10, muy inferior al de la silimarina. Además, es importante señalar que el rango en el que se encuentran los porcentajes de unión para este fármaco es mucho más amplio que el de la silimarina lo que indica que el número de sitios de unión y la constante de afinidad son más bajos, como indica PONFERRADA (1983), al estudiar la interacción entre este fármaco y las seroalbúminas humana y bovina.

En consecuencia, la interacción entre la silimarina y las proteínas plasmáticas es elevada debido a que este fármaco es muy poco soluble

en agua, por lo que para mantenerse en solución en el plasma sanguíneo se une en gran proporción a las proteínas circulantes, mientras que el (+)-cianidanol-3 es más hidrosoluble y no requiere de este tipo de fijación tanto como la silimarina.

Por todo ello, la silimarina podría desplazar a otros fármacos, xenobióticos o autacoides, que se encontrasen fijados a las proteínas plasmáticas y dar lugar a repercusiones, generalmente tóxicas. El (+)-cianidanol-3, por el contrario, puede ser más fácilmente desplazado por fármacos con mayor afinidad.

Por último, en relación a los porcentajes de recuperación, hemos de señalar que las diferencias significativas encontradas entre ambos fármacos pueden ser debidas al hecho de que cuanto mayor afinidad tenga la proteína, ésta fijará más fármaco y, por consiguiente, podrá ser absorbida menos cantidad por el celofán de las bolsas.

BIBLIOGRAFÍA

- BLUM, A. L.; BERTHET, P., DOELLE, W., GOEBELL, H. KORTUM, K., PELLONI, S., PETER, P., POULSEN, H., STROHMEYER, G. y TYGSTRUP, N. (1977): Treatment of acute viral hepatitis with (+)-cyanidanol-3, *Lancet*, II: 8.049, 1.153-1.155.
- CABANAS, L. F. (1984): Farmacocinética del (+)-cianidanol-3 en pollos de carne, Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- CABANAS, L. F., SERRANO, J. M., PONFERRADA, C. J. y SANTIAGO, D. (1984): Farmacocinética de la silimarina y el (+)-cianidanol-3, en pollos de carne. Comunicación presentada a la VIII Reunión de la asociación española de farmacólogos. Jaca (Huesca).
- GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M. y HORN, R. (1973): Effect aigu (en 3 a 6 heures) d'une dose unique de (+)-catechine sur les perturbations biochimiques expérimentales du foie de rat blanc, *C. R. Soc. Biol.* 167, 1.561-1.564.
- GILES, A. R. y GUMMA, A. (1973): Biopharmaceutical evaluation of cyanidanol tablets using pharmacokinetic techniques. *Arzneim. Forsch.* 23:1, 98-100.
- PONFERRADA, C. J. (1983): Unión del cianidanol a las seroalbúminas humana y bovina, Tesina de Licenciatura. Universidad de Córdoba.
- RAUEN, H. M., SCHRIEWER, H., TEGBAUER, U. y LASANA, J. F. (1973): Silymarin verhindert die Lipidperoxidation bei der $C Cl_4$ —leberschädigung, *Experientia*: 29:11, 1372.
- REALINI, S., GONVERS, J. J. y HOFSTETTER, J. R. (1975): Essai clinique de la silimarine dans les affections chroniques du foie, *Paraxis*: 64:6, 1.145-1.151.
- RUDMAN, D. y KENDALL, F. E. (1957): Bile acid content of human serum. II. The binding of cholanolic acids by human plasma proteins, *J. Clin. Invest.* 36, 538-542.
- SABA, P., MIGNANI, E., PAGLIAI, E., GAUDI, G., SCA-

- LABRINO, A., STROPPA, A., GALEONE, F. y TROYER, C. (1979): Efficacia del trattamento con silimarina nella epatite acuta virale. *Epatologia*: 25:5, 277-281.
- SCHRIEWER, H. y RAUEN, H. M. (1973 a): Die antihepatotoxische Wirkung von parenteral verabreichtem Silymarin bei der Gallaktosamin-Hepatitis der Ratte. Kurze Mitteilung. *Arzneim. Forsch*: 23, 159.
- SCHRIEWER, H. y RAUEN, H. M. (1973 b): Die antihepatotoxische Wirkung von Silymarin auf den durch Phalloidinintoxikation bei der Ratte gestörten Phospholipidstoffwechsel. Kurze Mitteilung. *Arzneim. Forsch*: 23, 160.
- SERRANO, J. M. (1982): Estudio farmacocinético de la silimarina en gallina. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- SERRANO, J. M. e INFANTE, F. (1983): Estudio de la unión de silimarina a proteínas plasmáticas. I. Proteínas de bovino. *Arch. Zootec*: 122, 61-66.
- SERRANO, J. M., CABANAS, L. F. y SANTIAGO, D. (1984): Estudio de la unión de silimarina a las proteínas plasmáticas. II. Proteínas de cerdo, ovino, caprino, bovino y hombre. *Arch. Zootec*: 125, 89-95.
- SERRANO, J. M., QUIÑONERO, M. y DE LA PEÑA, M. L. (1985): Interacción de silimarina con seroalbuminas humana (HSA) y bovina (BSA). *Arch. Farmacol. Toxicol.* (en prensa).
- SONDERN, W. y LEUBE, G. (1978): Ein Beitrag zur Wirkung von (+)-Cyanidanol-3 bei chronischen Hepatopathien. *Med. Clin*: 73: 1432-1436.
- VIDELA, L. A., FERNÁNDEZ, V., VALENZUELA, A. y UGARTE, G. (1981): Effect of (+)-cyanidanol-3 on the changes in liver glutathione content and lipoperoxidation induced by acute ethanol administration in the rats. *Pharmacology*: 22: 343-348.
- VOGEL, G., BRAATZ, R. y MENGES, U. (1979): On the nephrotoxicity of alpha-amanitin and antagonistic effects of silymarin in rats. *Agent & Actions*: 9:221-226.