

ESTUDIO DE LA UNION DE SILIMARINA A PROTEINAS PLASMATICAS. II. PROTEINAS DE CERDO, OVINO, CAPRINO, BOVINO Y HOMBRE.

(STUDY OF THE SILYMARIN BINDING TO THE PLASMATIC PROTEINS. II. PROTEINS OF THE PIG, SHEEP, GOAT, CATTLE AND MAN).

por

J.M. Serrano Caballero, L.F. Cabanás y D. Santiago Laguna

Cátedra de farmacología y terapéutica veterinaria. Departamento de farmacología y toxicología de la Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Sección de zoocología y contaminación ambiental. Instituto de zootecnia. C.S.I.C.

Palabras clave: Veterinaria. Patología comparada. Toxicología. Diálisis al equilibrio. Porcentajes de unión. Sylibum marianum. Botánica aplicada.

Keywords: Veterinary Science. Toxicology. Compared pathology. Equilibrium dialysis. Binding percentage. Sylibum marianum. Applied botanics.

S u m m a r y

The rate of binding of silymarin to pig, sheep, goat, cattle and man plasmatic proteins has been calculated by the equilibrium dialysis method. The analytical procedure has been carried out at 18°C.

The binding rate has been averaged for three series of each species at 7 concentration levels of silymarin ranging from 3.72 to 74.46 mg/l.

For the human plasma protein this value was 90.61 ± 1.98 percent, and for the remaining species 75.00 ± 3.74 , 57.48 ± 4.16 , 92.96 ± 3.00 and 84.20 ± 2.90 respectively.

R e s u m e n

Se estudia la tasa de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas de cerdo, ovino, caprino, bovino y hombre, por el procedimiento

Recibido para publicación el 29-9-1983.

de diálisis al equilibrio. Dicha tasa se ha promediado sobre tres series con 7 niveles de concentración del fármaco, que van desde 3.72 hasta 74.46 mg/l, para cada especie.

Para la proteína plasmática humana este valor fue del 90.61 ± 1.98 p.100. Para las restantes especies fue del 75.00 ± 3.74 , 57.48 ± 4.16 , 92.96 ± 3.00 y 84.20 ± 2.90 p.100, respectivamente.

Las experiencias se han realizado a 18° C de temperatura ambiente.

Introducción

Con el nombre de silimarina se conoce a la mezcla de silibina, sili-dianina y silicristina que se obtiene del Sylibum marianum (L.) Gaertn. y que posee actividad antihepatotóxica. La solubilidad de estas sustancias es buena en solventes orgánicos polares como el etanol y otros alcoholes, mientras que en agua es casi nula; de ahí que cuando se administre al hombre o a las especies animales se una fuertemente, y en gran proporción, a las proteínas plasmáticas para mantenerse en solución en el torrente circulatorio, como ocurre con los fármacos poco hidrosolubles (Gibaldi (3)).

Efectivamente, experiencias realizadas en aves domésticas demuestran que la unión a las proteínas plasmáticas se sitúa alrededor del 94 p.100 (Serrano (7)). Este porcentaje es menor (sólo del 68.21 p.100) cuando se utiliza plasma bovino y la interacción se realiza a 4° C (Serrano e Infante (8)), ya que la temperatura de trabajo y la procedencia animal de las proteínas son factores determinantes de la tasa de unión (Edsall y Wyman (1)).

En el presente trabajo continuamos informando sobre los resultados de la unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas de diversas especies; concretamente, cerdo, ovino, caprino, bovino y hombre, que ya iniciamos en una publicación anterior (Serrano e Infante (8)).

Material y métodos

A partir de una solución etanólica de silimarina a la concentración de 67 mg/ml (valorada como silibina con el 72 p.100 de riqueza, por Boehringer Sohn Ingelheim S.A.E.), hemos preparado otras soluciones etanólicas cuyas concentraciones fueron 0.413, 0.827, 1.654, 3.309, 4.963, 6.618

y 8.273 mg/ml. De estas soluciones hemos tomado 0.1 ml y evaporado con posterioridad el solvente, en estufa a 60° C, para redissolver a continuación el residuo seco, en 0.5 ml de una solución al 11 p.100 (p/v) de carbonato sódico. Luego se completó hasta 9 ml con un tampón fosfato 0.085 M. De esta forma hemos obtenido soluciones acuosas de silimarina cuyas concentraciones finales han sido de 3.72, 7.44, 14.89, 29.78, 44.67, 59.56 y 74.46 mcg/ml, a un pH de 7.4, con las que hemos realizado la diálisis al equilibrio. En el interior de la bolsa de diálisis hemos puesto 1 ml de plasma y lo hemos enfrentado a 9 ml de las distintas soluciones de fármaco.

Las bolsas de celofán para diálisis (Wisking Dialysis Tubing, type 8/32, de Serva) se prepararon, a diferencia de lo que preconizan Rudman y Kendall (6), hirviéndolas durante 15 minutos en una mezcla de etanol/bicarbonato de sodio al 1 p.1.000 (1/4), la primera vez, y posteriormente, con etanol/agua destilada (1/4), tres veces, durante 15 minutos cada vez; y una última vez, con agua destilada durante igual período de tiempo. Una vez enfriadas se llenaron con 1 ml de plasma de las distintas especies y se mantuvieron durante 48 horas a 4° C, dializando frente al tampón, frecuentemente renovado. Transcurrido este tiempo se introducía una bolsa en cada uno de los tubos, con 9 ml de solución de silimarina, preparados inmediatamente antes. Se realizaron tres series completas para cada tipo de plasma y se utilizaron blancos para cada serie, con tampón, en lugar de solución de silimarina.

El proceso de diálisis lo mantuvimos durante 20-22 horas a temperatura ambiente; período durante el cual, con toda certeza, se establece el equilibrio (Evans et al. (2)).

La determinación de silimarina la hemos realizado utilizando el método cuantitativo descrito por Serrano (7), que se basa en la lectura espectrofotométrica del producto, en medio alcalino, a 320 nanómetros. A tal fin, se diluían los plasmas del interior de las bolsas con carbonato de sodio 0.1M al 1/5; y los tampones externos, con el mismo producto al 1/2, empleando como blanco el correspondiente de cada serie.

Con los valores medios de las absorbancias obtenidas en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer, modelo 55 B, hemos calculado las correspondientes concentraciones, sobre rectas de calibración, considerando los títulos de dilución empleados. El porcentaje de recuperación medio de los ensayos ha sido de 102.65 ± 3.81 . Los porcentajes de unión, por último, se han obtenido relacionando la concentración de fármaco adsorbi-

do por las proteínas (concentración en plasma menos concentración en tampón) con la concentración plasmática de medicamento y multiplicando este cociente por 100.

Resultados y discusión

Las absorbancias obtenidas en las tres series, correspondientes a cada una de las especies, de plasmas y tampones, se han sometido a la prueba del análisis de la varianza para estimar la homogeneidad y consistencia de nuestros resultados. En todos los casos hemos obtenido valores de F no significativos, por lo que deducimos que las absorbancias obtenidas en las tres series de cada especie son estadísticamente iguales. Hemos utilizado, por tanto, valores medios de cada una de ellas para calcular las concentraciones de silimarina en los plasmas y en los tampones externos.

En la tabla I aparecen los porcentajes de unión de silimarina a las proteínas plasmáticas, calculados a partir de las concentraciones del fármaco en los plasmas y en los tampones externos. En general, los porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas son más elevados en las concentraciones más bajas, debido al agotamiento de los puntos de unión que proporciona cada molécula de albúmina a medida que aumenta la concentración de fármaco. No obstante, la riqueza proteica en el plasma es muy elevada, y a las concentraciones de silimarina utilizadas no se producen diferencias importantes en los porcentajes de unión, ya que la capacidad de fijación es también alta. En este sentido, podemos indicar que la constante de afinidad del fármaco para la albúmina humana, así como el número de sitios de unión por molécula, es de 1.4×10^4 M para K_a , en los cinco sitios posibles de la molécula (de la Peña (4)), mientras que la albúmina bovina presenta siete lugares de unión con unas constantes de afinidad de 7.5×10^3 M (Quiñonero (5)).

Los valores medios de unión (tabla II) oscilan entre 57.48 ± 4.16 , para la oveja, y 92.96 ± 3.00 , para la cabra. Entre estos valores extremos se encuentran los de cerdo, vaca y hombre, cuyos porcentajes de unión medios son de 75.00 ± 3.74 , 84.20 ± 2.90 y 90.61 ± 1.98 , respectivamente.

La homogeneidad intraespecífica se manifiesta a través de los coeficientes de variación que en esta misma tabla aparecen. Observamos la escasa variabilidad de éstos, por los valores de 2.19, para la especie

humana; y de 7.25, para los ovinos, como valores extremos.

Cuando comparamos los porcentajes de unión entre las diferentes especies estudiadas (tabla III) concluimos, con Edsall y Wyman (1), que la procedencia de las proteínas es un factor determinante de la variabilidad en este tipo de ensayos. En efecto, la comparación de las medias (estadístico *t* de Student) muestra diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) en todos los casos, salvo cuando comparamos las albúminas humana y caprina (en nuestro caso $t = 1.6$, cuando su valor es 1.782, para 12 grados de libertad).

Estos resultados nos permiten concluir: de una parte, por su alta afinidad para las proteínas séricas, la silimarina desplazará probablemente a otras sustancias endógenas o xenobióticas, con posibles repercusiones negativas para los individuos que la reciben. Por otro lado, la filtración renal sería escasa, aunque ello no implica que la eliminación de este fármaco sea tan lenta, como podría deducirse de los datos que aportamos, toda vez que la fracción conjugada está muy disponible en el hígado, que metaboliza y excreta por vía biliar un alto porcentaje de la dosis administrada (Serrano (7)).

Bibliografía

1. Edsall. J.T. y J. Wyman. *Biophysical Chemistry*, t. 1. Academic Press, New York (1958).
2. Evans, G.H., A.S. Nies y D.G. Shand. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 186, 114-122 (1973).
3. Gibaldi, M. *Introducción a la biofarmacia*. Acribia. Zaragoza (1974).
4. De la Peña, L. *Unión de la silimarina a proteínas plasmáticas*. Tesina de licenciatura. Facultad de farmacia. Universidad de Sevilla (España) (1982).
5. Quiñonero, M. *Unión de silimarina a proteínas plasmáticas de bovino*. Tesina de licenciatura. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España) (1982).
6. Rudman, D. y F.E. Kendall. *J. Clin. Invest.* 36, 538-542 (1957).
7. Serrano, J.M. *Estudio farmacocinético de la silimarina en gallinas*. Tesis doctoral. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España) (1982).
8. Serrano, J.M. y F. Infante. *Arch. Zootec.* 32, 61-66 (1983).

Tabla I. Porcentajes de unión de la silimarina a las proteínas plasmáticas en las especies estudiadas.

| Concentración a diluir en <u>buffer</u> | Porcentajes de unión | | | | |
|-----------------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| | Cerdo | Oveja | Cabra | Vaca | Hombre |
| 3.72 mg/l | 81.62 | 49.72 | 98.57 | 77.87 | 93.51 |
| 7.44 mg/l | 75.47 | 60.28 | 95.94 | 82.89 | 91.69 |
| 14.89 mg/l | 75.66 | 63.68 | 93.36 | 86.01 | 92.14 |
| 29.78 mg/l | 76.75 | 57.42 | 89.58 | 86.24 | 90.76 |
| 44.67 mg/l | 75.35 | 58.66 | 91.81 | 86.61 | 89.13 |
| 59.66 mg/l | 71.02 | 53.96 | 90.70 | 83.71 | 90.10 |
| 74.46 mg/l | 69.11 | 58.65 | 90.74 | 86.08 | 86.98 |

Tabla II. Valores medios de los porcentajes de unión, en las especies estudiadas, con intervalos de confianza del 95 p.100 y coeficientes de variación.

| Especie | Valor medio | Intervalos de confianza del 95% | Coefficientes de variación |
|---------|-------------|---------------------------------|----------------------------|
| Cerdo | 75.00 | 3.74 | 4.99 % |
| Oveja | 57.48 | 4.16 | 7.25 % |
| Cabra | 92.96 | 3.00 | 3.23 % |
| Vaca | 84.20 | 2.90 | 3.44 % |
| Hombre | 90.61 | 1.98 | 2.19 % |

Tabla III. Valores del estadístico t de Student, obtenidos al comparar los porcentajes de unión entre las diferentes especies.

| | Oveja | Cabra | Vaca | Hombre |
|-------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Cerdo | 7.664*** | 9.166*** | 4.757*** | 9.026*** |
| Oveja | | 16.928*** | 12.894*** | 17.596*** |
| Cabra | | | 5.137*** | 1.600 |
| Vaca | | | | 4.467*** |

*** Nivel de significación superior al 99 p.100 ($p < 0.001$).