

EFECTO DE *Silybum marianum* (L.) Gaertn SOBRE PEROXIDACIÓN DE MICROSOMAS Y MITOCONDRIAS DE CEREBRO DE RATA

Leadén PJ, Savignone CA, Barberón JL, Zeinsteger PA, Palacios A.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 118
(1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.
csavig@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN: La silimarina es un flavonoglicano extraído de las semillas y el fruto de *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Cardo mariano o Cardo asnal). Es una mezcla de tres compuestos diferentes: silibina, silidianina y silicristina. Ha sido utilizada en el tratamiento de las intoxicaciones y en padecimientos hepáticos por su efecto regenerador celular, inhibidor de leucotrienos y efecto antioxidante, ya que actúa como antioxidante en las células de este órgano, protegiéndolas de los daños causados por radicales libres, e incrementa la capacidad de regeneración mediante la producción de nuevas células, así como la eliminación de toxinas del organismo. El objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad antioxidante de diferentes dosis de silimarina sobre el daño oxidativo en membranas de microsomas y mitocondrias obtenidos de cerebro de ratas Wistar. Se sometió a las membranas a un sistema in vitro ascorbato - Fe⁺² dependiente, durante 180 min a 37 °C en presencia de cantidades crecientes de silimarina: 6.25, 12.5, y 25 µg/mg de proteína microsomal o mitocondrial. La peroxidación fue cuantificada en un contador de centelleo líquido Hewlett Packard con programa de quimioluminiscencia (cuentas totales por minuto/mg de proteína).

Palabras clave: silimarina, microsomas, mitocondrias, peroxidación, cerebro.

EFFECT OF *Silybum marianum* (L.) Gaertn ON THE PEROXIDATION OF MICROSOMES AND MITOCHONDRIA RAT BRAIN

ABSTRACT: Silymarin is a flavonoglycan extracted from seeds and fruit of *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Cardo asnal or Cardo mariano). Is a mixture of three different compounds: silybin, silidianin and silicristin. Silymarin has been used in poisoning treatment and liver disease due to its cellular regenerative effect, inhibitor of leukotrienes and antioxidant effect, since it acts as an antioxidant in liver cells, protecting them from the free radicals damage and increases the regeneration capacity through the production of new cells, as well as the elimination of toxins from the organism. The present investigation was carried out to analyze the antioxidant capacity of different doses of Silymarin on the oxidative damage in microsomal and mitochondrial membranes from brain of Wistar rats. Membranes were subjected to an in vitro ascorbate - Fe⁺² dependent system, during 180 min at 37 °C in the presence of increasing amounts of Silymarin: 6.25, 12.5, and 25 µg/mg of microsomal and mitochondrial protein. Peroxidation was quantified with a liquid scintillation analyzer Packard 1900 TR with chemiluminescence program (determined total counts per minute /mg of protein).

Keywords: silymarin, microsomes, mitochondria, peroxidation, brain.

INTRODUCCIÓN

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, un antioxidante actúa principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante finalizador de cadena, (Antolovich y col. 2002). Sin embargo, es necesario distinguir entre actividad estabilizadora de radicales libres y actividad antioxidante (Huang y col. 2005). La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad estabilizadora de radicales libres no siempre se correlaciona con una alta actividad antioxidante en particular. Algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante (Cadenas 1997). De hecho, hasta ahora, no existen métodos mundialmente unificados para medir capacidad antioxidante, en parte debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas (Kishida y col. 2002).

La suplementación con antioxidantes está fundamentada en estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran la estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cán-

cer, diabetes, aterosclerosis, desordenes neuro degenerativos y envejecimiento (Guy y col 2001, Droge 2002). Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes, principalmente especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas (Limón-Pacheco y Gonsebatt Bonaparte 2009). Las ROS, según su propio nombre, presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular. Algunas de ellas pueden ser radicales libres, es decir, moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos periodos de tiempo.

Estudios previos, han demostrado los efectos benéficos de la silimarina protegiendo membranas celulares del daño oxidativo en hígado (Gomez y col. 2005). Se cree que su poder antioxidante y anti envejecimiento es 10 veces superior a la vitamina E. La silibina es el componente más activo de la silimarina y el constituyente mayoritario de la mezcla (Ka So y col. 2009), es un benzodioxano que se utiliza ampliamente para prevenir muchos tipos de trastornos hepato biliares (Knekt y col. 2002). En concentraciones bajas, esta sustancia disminuiría la formación de ROS metabólicos (Fraschini y col. 2002). Además, estudios en mitocondrias hepáticas revelan que la silibina deprimiría la producción de ROS vinculada a la actividad de cadena de transferencia de electrones (Haddad y col. 2009).

En trabajos anteriores, hemos demostrado que la vitamina A y CLA (isómeros dienoicos del ácido linoleico) poseen poder antioxidante protegiendo a las membranas microsomales y mitocondriales del hígado de rata, cuando se las somete a peroxidación no enzimática (Palacios y Piergiacomini, 2003). El presente estudio tiene como objetivo analizar el efecto antioxidante de la silimarina en membranas mitocondriales y microsomales de cerebro de rata mediante estudios de peroxidación no enzimática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas Wistar AH/HOK fueron provistas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Butylated hydroxytoluene, phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) de Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA. Albúmina sérica bovina (BSA) (Fraction V) obtenida de Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan. Silimarina fosfatido de Vetanco S.A., Argentina. Ácido ascórbico L(+) y Tri-fluoruro de Boro de Laboratorios Merck, Darmstadt, Germany. Todos los demás reactivos y productos químicos fueron de calidad analítica de Sigma.

Obtención de mitocondrias de cerebro

Se utilizaron ratas Wistar de peso variable entre 100-120 g, sacrificadas por dislocación cervical y su cerebro fue removido rápidamente, fraccionado en pequeños trozos y lavado con solución 0.15 M NaCl. Se adicionó un 30 % de una solución de sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM y PMSF 0,1 M, pH 7.4 (solución A), se trituró en Ultra-turrax

T-25 aproximadamente 30 segundos, y posteriormente se pasó por un homogeneizador Potter-Elvehjem (Cole Parmer, IL, USA). El homogenato fue centrifugado a 3000 g, 10 min a 4 °C. Se obtuvo un pellet de núcleos y restos celulares y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10.000 g, 10 min a 4 °C, obteniendo de esta manera un pellet de mitocondrias que fue resuspendido en la solución A y un sobrenadante postmitocondrial.

Obtención de microsomas de cerebro

El sobrenadante postmitocondrial fue filtrado en una columna de Sepharosa 4B (1.6 x 12 cm); Sigma chemical Co, St Louis, MO, USA (Tangen y col. 1973). La fracción microsomal filtrada (volumen de 6-10 ml) fue llevada a 0,25 M con sacarosa sólida. Todos los procedimientos fueron realizados a 4 °C.

Determinación de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como estándar.

Peroxidación no enzimática de membranas microsomales y mitocondriales

Las fracciones microsomales y mitocondriales (en una concentración de 1 mg de proteína) fueron suspendidos en una solución de buffer fosfato 0.01 M pH 7.4 y ascorbato 0.4 mM hasta un volumen final de 1 ml e incubados a 37 °C. El buffer fosfato contiene suficiente hierro para proveer el hierro ferroso o férrico necesario para la peroxidación, la cual es iniciada por el ascorbato. La emisión lumínica fue determinada en

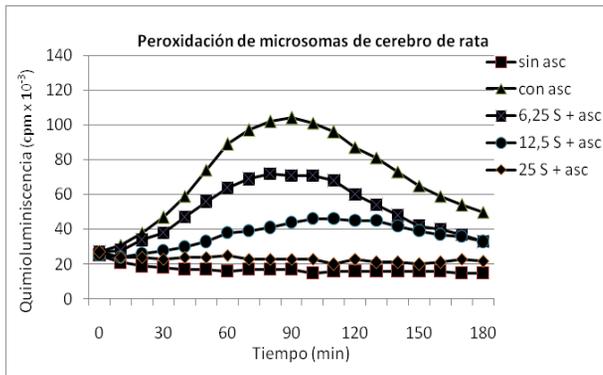


Gráfico 1. Ensayo de peroxidación de microsomas de cerebro de rata incubados con silimarina fosfatido a lo largo del tiempo. Los datos son obtenidos del promedio de cinco experimentos independientes. Medición de la quimioluminiscencia en cuentas por minuto (cpm) x 10⁻³.

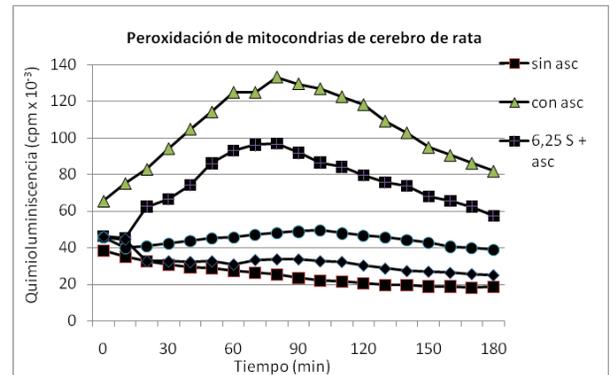


Gráfico 2. Ensayo de peroxidación de mitocondrias de cerebro de rata incubados con silimarina fosfatido a lo largo del tiempo. Los datos son obtenidos del promedio de cinco experimentos independientes. Medición de la quimioluminiscencia en cuentas por minuto (cpm) por 10⁻³.

Tabla 1. Valores de quimioluminiscencia totales (media ± DS) de cinco experimentos. Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los grupos ^ap < 0,001; ^bp < 0,005; ^cp < 0,0005 y ^dp < 0,005.

		Cpm x 10-3	% Inhibición
Microsomas	Control sin asc	735 ± 33 ^a	
	Control con asc	3140 ± 250 ^{a,b,c,d}	
	6,25 µg Silimarina + asc	2158 ± 109 ^b	31,27
	12,5 µg Silimarina + asc	1519 ± 73 ^c	51,62
	25 µg Silimarina + asc	902 ± 215 ^d	71,27

Tabla 2. Valores de quimioluminiscencia totales (media ± DS) de cinco experimentos. Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los grupos ^ap < 0,00005; ^bp < 0,005; ^cp < 0,0005 y ^dp < 0,001.

		Cpm x 10-3	% Inhibición
Microsomas	Control sin asc	652 ± 52 ^a	
	Control con asc	2379 ± 175 ^{a,b,c,d}	
	6,25 µg Silimarina + asc	1712 ± 69 ^b	27,99
	12,5 µg Silimarina + asc	1120 ± 34 ^c	52,92
	25 µg Silimarina + asc	862 ± 18 ^d	63,76

un contador de centelleo líquido por un periodo de 180 minutos. La quimioluminiscencia fue medida en cuentas por minuto (cpm) cada 10 minutos. En estos estudios *in vitro* los microsomas y mitocondrias fueron incubados previamente con silimarina (6.25, 12.5, y 25 µg/mg proteína) y se utilizaron muestras sin silimarina como control de los experimentos.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media ± DS de cinco experimentos independientes. Los datos fueron estadísticamente evaluados por prueba de Tukey. El criterio estadístico para la significación se seleccionó en diferentes valores de p, lo que se indica en cada caso.

RESULTADOS

Peroxidación de membranas microsomales de cerebro

Durante la peroxidación de membranas microsomales de cerebro en un sistema ascorbato Fe⁺⁺, cuantificada mediante quimioluminiscencia, se observó que la emisión de luz fue significativamente menor en las membranas incubadas con silimarina en comparación con las membranas del grupo control (gráfico 1).

Asimismo, se observó una marcada disminución en la emisión lumínica del total de cpm/mg de proteína originado durante la peroxidación por el agregado de la silimarina como se evidencia en Tabla 1. La inhibición de la peroxidación, utilizando la quimioluminiscencia como índice de alteración oxidativa, fue concentración dependiente de la silimarina, confirmando observaciones

previas que indican que este extracto podría actuar como antioxidante protegiendo a las membranas celulares del estrés oxidativo.

Peroxidación de membranas mitocondriales de cerebro

Las mitocondrias se comportaron de manera similar a lo observado en microsomas a lo largo de tiempo (Gráfico 2) mostrando una disminución concentración dependiente en la emisión lumínica con diferentes concentraciones de silimarina. (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Resultados previos indican que la silimarina tiene una potente actividad antioxidante, (Vázquez Frias y col. 2013, Pradhan y Girish, 2006). Los estudios de peroxidación *in vitro* son útiles para la elucidación de un posible mecanismo de la formación de peróxido en vivo (Benzi 1988). En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto de distintos antioxidantes en membranas mitocondriales y microsomales de cerebro de rata (Palacios y Piergiacomini 2003, Piergiacomini y Palacios 2006). Los estudios en animales para evaluar los mecanismos de acción de la silimarina y sus compuestos relacionados, se han incrementado recientemente, como se muestra en la revisión realizada por Pradhan (2006) de los estudios de farmacología experimental. Shaker y col. (2010) mostraron que al utilizar extractos de silimarina (100 mg/kg de agua corporal), la inhibición de la absorción del colesterol puede ser la responsable del cambio positivo presente en el perfil de lipoproteínas de colesterol y el con-

tenido de lípidos plasmáticos, además de que el reforzamiento antioxidante de los hepatocitos dado por la silimarina, puede contraatacar el estrés oxidativo/nitrosativo y contribuir con el bloqueo de la enfermedad hepática. Ka SO y col. (2009), utilizando el análisis de RT-PCR, encontraron que la sibilina disminuye la expresión de genes relacionados con la adipogénesis.

Se encontró que el tratamiento con sibilina mejora la esteatosis hepática, así como la inflamación, disminuyendo la peroxidación de lípidos, insulina plasmática y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Asimismo, disminuye la liberación de superóxido, además de regresar al hígado al tamaño original (Haddad y col. 2009).

Se están realizando estudios (registrados en www.clinicaltrials.gov) para evaluar la eficacia y seguridad de la silimarina en relación con enfermedades hepáticas. La toxicidad de la silimarina se ha estudiado en ratones, ratas, conejos y perros después de infusión intravenosa. La dosis letal 50 (LD₅₀) en ratones es de 400 mg/kg, 385 mg/kg en ratas y 140 mg/kg en conejos y perros. Después de la administración oral la tolerancia es mucho mayor, la cual llega a ser hasta de 10 g/kg. En caso de intoxicación aguda, la causa de muerte parece ser falla cardiovascular. Estos datos demostraron que la toxicidad aguda, subaguda y crónica de la silimarina es muy baja, y con un muy amplio margen de seguridad. A altas dosis se ha reportado diarrea asociada a mayor flujo biliar (Fraschini y col. 2002).

En nuestro trabajo se observa que las membranas microsomales y mitocondriales obtenidas de cerebro de rata fueron protegidas contra la peroxidación

cuando se le adicionó silimarina como antioxidante, en comparación con membranas similares que se peroxidaron sin la presencia del antioxidante vegetal, como se muestra por los resultados obtenidos por quimioluminiscencia.

Las muestras con diferentes dosis de silimarina fueron más resistentes contra la peroxidación, en comparación con los controles.

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha observado un gran incremento en el uso de medicina alternativa entre los pacientes con enfermedad hepática, dentro de ésta, la silimarina es la más utilizada. La silimarina cuenta con diversos mecanismos de acción, predominantemente antioxidantes a nivel hepático, entre los que se destacan su capacidad para prevenir o revertir la fibrosis hepática; cuenta con evidencia científica para ser una opción terapéutica para la enfermedad por hígado graso, aunque aún faltan ensayos clínicos contundentes (Vázquez Frias D y col. 2013). Su combinación con el ácido alfa-lipoico y selenio metionina, tiene sustento teórico y científico adecuado para tener una actividad sinérgica y complementaria en la actividad antioxidante a nivel hepático, y con ella disminuir el «segundo impacto» de la teoría del desarrollo de la fibrosis. Nuestros resultados confirmarían y ampliarían observaciones anteriores que indicaron que la silimarina podría actuar como antioxidante, protegiendo las membranas contra efectos dañinos. Aunque ya se han realizado estudios para caracterizar los cambios, estructura, composición y propiedades físicas de membranas sometidas a oxidación, (Tiwari 2001, Saller y col. 2008), es

importante conocer los compuestos biológicos con propiedades antioxidantes que contribuyen a la protección de las membranas especializadas, contra los efectos producidos por especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres. Nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que la silimarina puede proporcionar un mecanismo de defensa contra el ataque de radicales de oxígeno en las membranas microsomas y mitocondriales del cerebro de rata. Se necesitan más estudios para una más adecuada evaluación de estas observaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonalds S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 2002, 127 (1): 183-198.
2. Benzi G. Peroxidation, energy transduction and microsomes during aging, JhonLiberyEurotext, 1988 London, 51-117.
3. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. En: *BioFactors*. January 1997. Vol. 6 (4): 391-397.
4. Drogue W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. January 2002 vol. 82 (1): 47-95.
5. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest* 2002; 22 (1): 51-65.
6. Gomes A, Fernandez E, Lima J. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. En: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005, 65, (2-3): 45-80.
7. Guy R, Maguirre G, Crandall I, Connelly P, Kain K. Characterization of peroxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36. *Atherosclerosis*. 2001, 155 (1): 19-28.
8. Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS. Antioxidant and hepatoprotective effects of silibin in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Evid Bas Comp Alternat Med*. 2009, 1-11.
9. Ka SO, Kim KA, Kwon KB, Park JW, Park BH. Silibin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential up regulation of the insight pathway. *Int J Mol Med* 2009; 23 (5): 633-637.
10. Kishida E, Tokumar S, Ishitani Y, Yamamoto M, Oribe M, Iguchi H, Kojo S. Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 41 (10): 1598-600.
11. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Helövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 2002, 76 (3): 560-568.
12. Limón Pacheco J, Gonsebatt Bonaparte ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009, 674 (1-2):137-47.
13. Lowry OH; Rosebrough NJ; Farr AL; Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*1951. 193: 265-275.
14. Palacios A, Piergiacomi VA. Antioxidant effect of conjugated linoleic acid and vitamin A during non enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes and mitochondria. *Mol. Cell. Biochem*. 2003, 250: 107-113.
15. Piergiacomi VA, Palacios A. Conjugated linoleic acid and fatty acid binding protein as antioxidants. *In Vet*. 2006, 8: 139-148.
16. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res*. 2006, 124: 491-504
17. Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplement med*. 2008, 15 (1): 9-20.
18. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol*. 2010, 48: 803-806.
19. Tangen O, Jonsson J, Orrenius S. Isolation of rat liver microsomes by gel filtration. *Anal. Biochem*. 1973, 54: 597-603.
20. Tiwari A. Imbalance in antioxidant defence human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current Science*. 2001, 81 (9): 1179-1187.
21. Vázquez Frías R, Reyes García J, Fernández del Valle Laisequilla C, Anaya Reyes M, Rizzoli Córdoba A. Silimarina, ácido alfa-lipoico y seleniomotioninaen el tratamiento de hígadograso. *An Med (Mex)*. 2013, 58 (1): 37-46.