



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Actividad farmacológica de *Silybum
marianum* (L.) Gaertn. y sus componentes aislados**

Autor: Margarita Cabello Vallejo

Fecha: Julio 2019

Tutor: Olga María Palomino Ruiz-Poveda

ÍNDICE

- Resumen.....	3
- Palabras Clave.....	3
- Abstract.....	3
- Key words.....	3
- Introducción.....	4
- Objetivos.....	6
- Material y métodos.....	6
- Resultados y discusión.....	6
o Actividad farmacológica.....	7
o Resultados en ensayos clínicos.....	15
o Farmacocinética, toxicidad y RAMs.....	16
- Conclusiones.....	17
- Bibliografía.....	18

RESUMEN

El cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) es una planta medicinal espinosa con flores púrpuras. La droga son los frutos, que contienen 1,3-3% de silimarina, una mezcla de flavanolignanos responsables de la actividad farmacológica. Esta planta se ha utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de todo tipo de afecciones hepáticas además de otras patologías. Se ha realizado una revisión bibliográfica del informe de experto del cardo mariano y artículos científicos sobre la actividad farmacológica, ensayos clínicos, farmacocinética y toxicidad de esta planta medicinal. La principal diana del cardo mariano es el hígado donde los flavanolignanos tiene actividad antioxidante, regeneradora, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antifibrótica, anticoléstica y protectora frente a diferentes tóxicos. Además, fuera del hígado se ha visto que puede tener otras actividades como antiviral, neuroprotectora, antiaterogénica, hipocolesterolemiante, protectora de la pérdida de hueso y protectora de la piel, entre otras. La biodisponibilidad es escasa y el metabolismo hepático, sufre recirculación enterohepática y se elimina en su mayoría en heces. Los efectos adversos son leves, principalmente gastrointestinales y los resultados sobre mutagenicidad y carcinogenicidad no son concluyentes. La silimarina tiene actividad terapéutica en el hígado y gracias a sus mecanismos de acción podría utilizarse en el tratamiento de otras patologías si se mejorara su biodisponibilidad. Los resultados en los ensayos clínicos son limitados como para su autorización con indicación de uso bien establecida.

PALABRAS CLAVE: *Silybum marianum*, cardo mariano, flavanolignanos, silimarina, farmacología, antioxidante, hígado.

ABSTRACT

Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) is a thorny medicinal plant with purple flowers. The drug is constituted by the fruits, which contain 1,3-3% of silymarin, a mixture of flavonolignans responsible of pharmacological activity. This plant has been used since ancient times for liver disorders and other diseases. A bibliographic review of the assesment report on milk thistle and scientific articles on the pharmacological activity, pharmacokinetic clinical trials and toxicity of this medicinal plant has been carried out. The main target of milk thistle is the liver, where flavonolignans have antioxidant, regenerating, anti-inflammatory, immunomodulatory, antifibrotic, anticholestatic and protective activity against different toxics. In addition, it has been seen to have other activities outside the liver such as antiviral, neuroprotective, antiatherogenic, hypocholesterolemic, protective of bone loss and and skin protective, among others. The bioavailability is low, and it has hepatic metabolism. It suffers enterohepatic recirculation and it is mostly eliminated in faeces. Side effects are mild, mainly gastrointestinal and data in mutagenicity and carcinogenicity are inconclusive. Silymarin has therapeutic properties in liver and due to its mechanisms of action it could be used in other diseases if bioavailability is improved. Results in clinical trials are limited for its authorization in well-established indication of use.

KEY WORDS: *Silybum marianum*, milk thistle, flavonolignans, silimarin, pharmacology, antioxidant, liver.

INTRODUCCIÓN

El *Silybum marianum* (L.) Gaertn (= *Cardus marianum* L.), cardo mariano, cardo maría o cardo borriquero, entre otras muchas denominaciones, es una planta herbácea de la familia de las Asteráceas o Compuestas que crece en Europa meridional, norte de África y este de Asia y florece en primavera (1).

Es una planta anual o bianual que llega a medir más de un metro. Forma un rosetón basal de hojas verdes, y blancas en torno a los nervios, alabeadas y espinosas que también crecen alternas en el tallo, ramificado en la mitad superior. Los tallos terminan en capítulos solitarios con brácteas involucrales espinosas alrededor de un grueso receptáculo sobre el que se encuentran las flores flosculosas de color púrpura en cuyo interior se encuentran los filamentos estaminales formando un tubo (2).

La droga es el fruto maduro sin vilano, un aquenio fuertemente comprimido ovoide-alargado de 6-8 mm de largo y entre 1,5 y 3 mm de ancho. La superficie es lisa y brillante de color gris o marrón pálido con vetas oscuras. En la base tiene forma cónica y está coronada con una extensión de color amarillo brillante que rodea el resto del estilo. Al cortarlo transversalmente se ven dos cotiledones aceitosos grandes y densos de color blanco.

La droga pulverizada es de color amarillo parduzco y al observarla al microscopio se pueden ver fragmentos de epicarpo compuestos de células poligonales, algunas con materia colorante roja; grandes esclereidas con paredes amarillas, fragmentos de parénquima con células de paredes punteadas en forma de rosario, células con glóbulos de aceite y maclas de oxalato cálcico (3). Además, en la Real Farmacopea Española (RFE) se describe la composición química de la droga de calidad farmacéutica, diferentes las técnicas analíticas y procedimientos para la identificación y cuantificación de sus componentes.

La droga contiene 20-30% de lípidos, principalmente poli- y mono- insaturados como ácido linoleico (30-35%), ácido oleico (24-30%). También otros en menor proporción como ácido palmítico, linoleico... Además, contiene proteínas, azúcares, aceite esencial compuesto principalmente por monoterpenos, β -sitosterol y flavonoides: flavonas como apigenina, crisoerisol, eriodictiol y flavonoles como quercetol, taxifolina, kaempferol y dihidrokaempferol (4).

La actividad farmacológica se atribuye a los flavanolignanos, que son lignoides o lignanos híbridos por su origen biosintético mixto (están formados por un flavonol, la taxifolina, unido a una molécula de fenilpropanoide: el alcohol coniferílico. **Figura 1**).



Figura 1. Reacción entre la taxifolina (flavonol) y el alcohol coniferílico (fenilpropanoide) para formar un flavanolignano. (Imagen creada en Biorender app®)

Forman una mezcla de varios compuestos denominada silimarina cuyo componente mayoritario es la silibina A y B, isosilibina A y B y otros minoritarios como la silicristina y la silidianina. (Figura 2). Están una concentración entre 1,3 y 3 % en la droga (4).

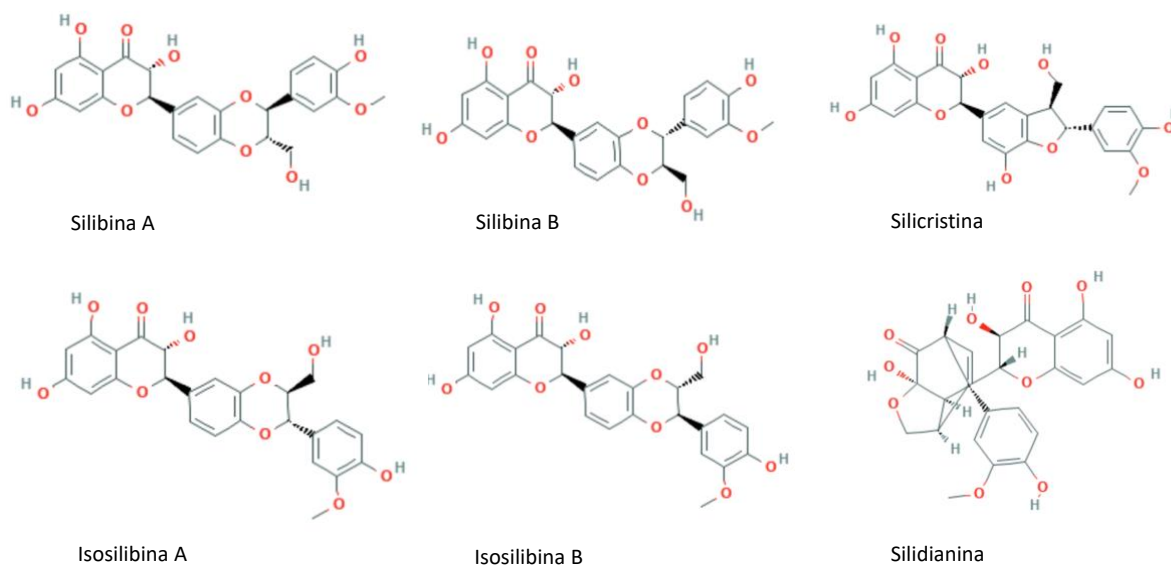


Figura 2. Principales componentes de la silimarina. (Imágenes tomadas de Pubchem).

Se trata de una planta a la que se le han atribuido numerosas propiedades y aplicaciones a lo largo de la historia. Probablemente la primera referencia que haya del cardo mariano es de Teofrasto (siglo IV a.C.) que denominó a esta planta como “*pternix*”. Posteriormente fue utilizada por médicos griegos y romanos. En el siglo I d.C. aparece en obras como *De Materia Médica* de Dioscórides en la que se recomendaba en infusión para las mordeduras de serpiente o Plinio el Viejo indicaba su jugo mezclado con miel para “arrastrar” la bilis. También se han encontrado referencias de su uso en medicina tradicional india y china (1).

En la obra *Physica* de santa Hildegarda de Bigen (siglo XII) aparece recogido el uso de la raíz y las hojas para el tratamiento de la inflamación, edema y la erisipela. Durante los siglos XVI y XVII los botánicos y naturalistas ingleses John Gerard y Nicholas Culpeper lo recogieron en sus obras para el tratamiento de decaimientos o tristeza y la fiebre respectivamente. Más tarde, en el siglo XVIII, el médico alemán Johann Gottfried Rademacher lo utilizó para dolencias hepáticas (5).

En la literatura podemos encontrar numerosas referencias al cardo mariano con diferentes aplicaciones, por ejemplo, como sustituto del cornezuelo de centeno en menorragias, metrorragias y congestiones del útero por su contenido en tiramina e histamina (6,7) ; para abortar crisis asmáticas y de fiebre del heno, aliviar jaquecas, erupciones y varices. También se ha recomendado la decocción de sus hojas contra desfallecimientos del aparato cardiovascular por enfermedades infecciosas o debilidad postoperatoria (6) y para aumentar la secreción de leche, porque esta planta se relacionaba, por los nervios blancos de sus hojas y la secreción lechosa que se secreta al cortarla, con la Virgen María cuando daba el pecho; aquí encontramos el origen de su nombre (8).

Pero su uso más reconocido en todas las guías de plantas medicinales es para todo tipo de afecciones hepáticas como hepatitis de diferente etiología (infecciones víricas, esteatosis hepática, hepatitis tóxica...), cirrosis, fibrosis, como hepatoprotector, colerético, colagogo... (9).

Además, existen varias monografías de organismos internacionales como la Comisión E alemana, la OMS o ESCOP que recomiendan su uso en diferentes afecciones hepáticas.

Actualmente la indicación aprobada en la Unión Europea por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) es para el alivio de problemas digestivos como la sensación de pesadez e indigestión y apoyo de la función hepática cuando se hayan descartado problemas más serios (10). Esta autorización está basada en su uso tradicional durante más de treinta años en la Unión Europea, pero son necesario más datos de ensayos clínicos que respalden su uso bien establecido.

En España hay comercializados medicamentos a base de cardo mariano o sus componentes aislados, como monofármaco o en combinación con otras plantas indicados en digestiones pesadas, dispepsias u otros trastornos gastrointestinales de origen hepático debidas a alteraciones hepáticas (4).

En otros países de la Unión Europea también hay numerosos medicamentos comercializados a base de frutos de cardo mariano, principalmente extractos secos con diferentes concentraciones de silimarina en cápsulas duras y comprimidos, con diferentes indicaciones aunque todas similares: tratamiento de apoyo en todo tipo de problemas hepáticos (hepatitis tóxica por medicamentos, alcohol, drogas, setas tóxicas; enfermedad inflamatoria crónica del hígado, esteatosis hepática alcohólica y no alcohólica, cirrosis...), profilaxis de la insuficiencia hepática cuando se va a hacer una administración prolongada de medicamentos, consumo de alcohol; para problemas digestivos como dispepsias especialmente de origen hepático y indigestiones (4).

OBJETIVOS

- Conocer los mecanismo de acción de los componentes activos de frutos de cardo mariano que explican su actividad farmacológica en el hígado y en otras dianas.
- Conocer las aplicaciones terapéuticas de los frutos de cardo mariano y de sus componentes aislados.
- Conocer la farmacocinética y toxicidad de los componentes activos del cardo mariano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión de la monografía, el informe de experto de la EMA que corresponden al cardo mariano y de su monografía de la RFE.

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica en las principales bases de datos científicas como Pubmed, Scholar Google, Medline... filtrando con términos como “silybum marianum” o “milk thistle”, “silymarin”, “antioxidant”, “liver disease”, “cholestasis”, “intoxication” o “antiviral” ...

Se revisaron los ensayos clínicos realizados en pacientes con enfermedades hepáticas tratados con algún medicamento a base de cardo mariano publicados desde 1970, recogidos en bases de datos como PubMed o en el assesment report. Para clasificar los estudios se dividieron en tres grandes categorías: enfermedad hepática alcohólica, enfermedad hepática no alcohólica y hepatitis víricas. Se consideraron positivos aquellos estudios en los que uno o más de los parámetros (bioquímicos, histológicos, supervivencia, síntomas ...) valorados demostraron mejoras en el grupo tratado.

Para reunir los resultados de los ensayos clínicos y representarlos gráficamente se utilizó Microsoft Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los componentes activos de los frutos del cardo mariano, los flavanolignanos, ejercen una actividad multidiana y multifuncional (4). Las propiedades del cardo mariano sobre el hígado son las más estudiadas y para las que tradicionalmente se ha utilizado, sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado otras posibles aplicaciones sobre otras dianas. A continuación, se recogen las principales actividades de la silimarina y sus componentes aislados en el hígado y fuera de él, su utilidad terapéutica en seres humanos, farmacocinética y toxicidad.

1. Actividad farmacológica

Farmacología primaria

1) Antioxidante

De forma fisiológica en el organismo se forman especies oxidantes que pueden dañar los lípidos, proteínas y DNA de nuestras células. Por ello existen diferentes mecanismos para eliminar esas especies oxidantes de nuestros tejidos. Hay tres niveles para evitar esa oxidación; el primero consiste en enzimas antioxidantes capaces de transformar los radicales libres en otras especies como agua. Enzimas como la superoxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión-peroxidasa (GPx) o metaloproteínas que retienen iones metálicos que catalizan reacciones de oxidación. El segundo nivel son moléculas no proteicas capaces de inhibir la propagación de radicales libres que oxidan los fosfolípidos de las membranas celulares como los tocoferoles, carotenoides, vitamina A, ácido ascórbico, ubiquinol y glutatión (GSH). Por último, participan sistemas de reparación de daños del DNA (ligasas, polimerasas) y sistemas de eliminación de moléculas dañadas (proteasas, lipasas). A pesar de la presencia de estos sistemas de protección endógenos se generan especies radicalarias que dañan los componentes celulares y están directamente relacionados con numerosas enfermedades (11).

El efecto antioxidante de los flavanolignanos ha sido ampliamente demostrado en numerosos estudios *in vitro* en diferentes modelos celulares y en animales de experimentación. Este efecto antioxidante se debe a varios mecanismos de acción actuando sobre los tres niveles antioxidantes del organismo, tanto por mecanismo directos como indirectos:

1.a) Directos: actúan sobre los radicales libres.

La silimarina es capaz de captar radicales libres (12) impidiendo que reaccionen con los componentes celulares. Algunos estudios *in vitro* demostraron que tiene un poder antioxidante similar al butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol o α -tocoferol. Sin embargo, esta acción no es muy efectiva sobre el ion superóxido, uno de los principales oxidantes, aunque sí lo es frente al peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, difenilpicrilhidracilo, bis-azino... y frente a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). En concreto la silibina es el componente capaz de reaccionar rápidamente con radicales hidroxilos. Por ello los efectos antioxidantes son variables en función de la composición de la mezcla de flavanolignanos (11).

1.b) Indirectos: impiden la formación y propagación de los radicales libres.

- Aumenta la actividad de la SOD (actividad detectada en eritrocitos) (13).
- Quela iones de metales de transición como hierro y cobre libres que catalizan reacciones de peroxidación de ácidos grasos y fosfolípidos que constituyen las membranas celulares (11).
- Induce la síntesis hepática de glutatión aumentando la disponibilidad de cisteína, esencial para su síntesis (14)
- Reduce la depleción de glutatión en situaciones de estrés, reduciendo así el daño hepático. En estudio se detectó la disminución de marcadores de daño como aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y peroxidación de ácidos grasos (14).
- Mantiene balance redox óptimo en la célula, con especial importancia en la mitocondria, donde más especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan. Impide la formación de ROS al contribuir en el mantenimiento del funcionamiento óptimo de la cadena de transporte de electrones. Esta actividad se atribuye a la silibina, el principal componente de la silimarina (11).

- Evita la formación de ROS al inhibir enzimas que los forman como la Xantina oxidasa o la NADPH oxidasa (11).
- Activación de vitagenes. El término vitagenes surgió en 1998 y se fue desarrollando para referirse a una familia de genes relacionados con el mantenimiento de la homeostasis celular en situaciones de estrés. Varios estudios muestran como la silimarina puede actuar activando diferentes puntos de esta red de vitagenes (11).

Todos estos mecanismos se traducen en un efecto protector de DNA, proteínas y lípidos frente a la oxidación inducida por radicales libres que provoca alteraciones estructurales en estas moléculas, alterando su funcionalidad. Alteraciones que a nivel de tejido, órganos y sistemas se traducen en todo tipo de patologías.

2) Regulador de la membrana.

La silimarina modifica las propiedades físicas de la membrana celular de los hepatocitos al inhibir la tasa de recambio de los fosfolípidos y la incorporación de precursores de colesterol (15). También induce la reducción de anti-IgE y de la liberación de histamina de los basófilos, lo que se relaciona con mayor estabilidad de la membrana (16). Estos efectos también se dan en la membrana mitocondrial (17). Todo esto traduce en una mayor estabilidad y mantenimiento de la integridad de las membranas, dificultando así la entrada de tóxicos y xenobióticos como el paracetamol, las toxinas de *Amanita phalloides* o el tetracloruro de carbono entre otros tóxicos, que dañan los hepatocitos directamente o al bioactivarse en ellos.

3) Antiinflamatorio, antifibrótico e inmunomodulador.

La fibrosis hepática tiene dos causas, la inflamación y el estrés oxidativo, que se desencadenan por diferentes factores. El más frecuente es la esteatosis hepática no alcohólica, pero hay muchas otras, como la esteatosis hepática alcohólica, las hepatitis víricas, intoxicaciones, atresia biliar... la presencia de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno participa en la activación las células estrelladas del hígado y las células de kuppfer (18), que se transforman en miofibroblastos productores de las proteínas de la matriz extracelular que producen la fibrosis que altera la estructura anatómica del hígado y es responsable de la insuficiencia hepática, hipertensión portal y encefalopatías hepáticas. En numerosos ensayos en células hepáticas humanas, y en animales como ratas y babuinos se han estudiado los mecanismos por los cuales la silimarina es capaz de inhibir esta fibrosis:

- Reduce la inflamación al antagonizar la liberación de leucotrienos en las células de Kuppfer B₄ (19).
- Inhibe la liberación de citoquinas como TNF- α , adhesinas como E-selectina, óxido nítrico (NO) y 5-lipooxigenasa (5).
- Retrasan la activación de las células estrelladas al inhibir la activación de NF- κ B y α -SMA retrasando su transformación en miofibroblastos (4,5)
- Reducen la expresión de componentes de la matriz extracelular como progocolageno- α , colágeno y fibronectina.
- Modifican la expresión de diferentes genes relacionados con la organización del citoesqueleto y con las metaloproteinasas de la matriz extracelular (TIMPs) (enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular) al reducir la expresión TGF- β (5).

4) Regenerador hepático

Diversos estudios confirman la capacidad estimulante de la silimarina sobre la síntesis de DNA, RNA ribosomal y proteínas mediante mecanismos que *Sonnenbichler et al.* en 1984 determinaron en varios estudios.

La silibina es el componente de la mezcla de flavanolignanos responsable de esta actividad al unirse en un sitio específico de una subunidad de la RNA polimerasa I DNA dependiente, activándola. Se determinó un incremento del 20% de la síntesis de las subunidades 5,8S; 18S y 28S en núcleos aislados de hepatocitos, cultivos celulares de hepatocitos humanos e hígado de rata, seguido de una mejor incorporación del RNA en los ribosomas maduros. También se vieron cambios en la síntesis de la subunidad 45S, sin embargo, la subunidad 5S, mRNA y tRNA no se vieron afectadas (20).

Una hipótesis que explica interacción entre el flavanolignanos y la RNA polimerasa I propone que existe similitud estructural entre la silibina y los esteroides. El estradiol tiene un sitio de unión en una subunidad de la RNA polimerasa I que puede que actúe como receptor de esta hormona, de forma que la silimarina actúa mimetizando esta hormona en el su sitio de acción, aunque con una afinidad menor que el agonista endógeno. Los ribosomas una vez maduros pueden producir proteínas, cuya síntesis se ve incrementada respecto a la respecto a síntesis en ausencia de silimarina.

La silibina puede estimular la replicación de DNA y la mitosis cuando esta señal ha sido dada, es decir, que, si la célula de forma fisiológica está dando la señal de replicación del material genético y división celular, la silimarina potencia estos procesos, aunque no induce nuevos genes (21). Se observa una mejora en la regeneración de las células hepáticas que puede deberse a la mejora en la actividad de la maquinaria de la síntesis proteica (20).

En otro estudio, en ratas parcialmente hepatectomizadas se vio que el tratamiento con silimarina durante 7 días por vía oral aumentaba la tasa de síntesis de DNA, RNA y el índice de mitosis (22).

La suma de las tres actividades anteriores: estimulación de la RNA-polimerasa, la replicación del DNA y la mitosis promueven la regeneración hepática.

5) Anticolestásico

La silimarina puede prevenir el fallo en la secreción de sales biliares (colestasis) inducido por taurolitocolato y estradiol-17 β -D-glucurónico, sustancias endógenas capaces de bloquear el transporte de sales biliares a través de la membrana canalicular provocando colestasis aguda reversible por la internalización de Bsep (el transportador canalicular de sales biliares). La silibina es capaz de proteger de la colestasis previniendo la internalización endocítica de Bsep, aunque el mecanismo no es actualmente del todo conocido. Tampoco se descartan otros mecanismos como la protección del estado funcional intrínseco del transportador que se ha visto tras la administración crónica de 17 α -etilniliestradiol, o contrarrestando cambios que se producen en el transportador y su entorno en la membrana (23).

Se ha visto que la silibina aumenta los niveles de cAMP en hepatocitos de rata al actuar como inhibidor de la fosfodiesterasa de cAMP. El cAMP también es protector frente a la colestasis al actuar como segundo mensajero. De forma que la silimarina también protegería frente a las colestasis por un mecanismo indirecto (23).

Un correcto funcionamiento de la secreción biliar mantiene la función digestiva normal al permitir la correcta absorción de las grasas de la dieta y además evita la formación de cálculos biliares.

6) Protector frente a tóxicos

Etanol: el consumo tanto agudo como crónico de etanol produce daños en el hígado pudiendo desencadenar enfermedades graves como la enfermedad hepática alcohólica, que cursa progresivamente con esteatosis hepática, cirrosis y fibrosis del parénquima hepático conduciendo a

una insuficiencia hepática (24). Actualmente no existe consenso en como abordar el tratamiento de la enfermedad hepática alcohólica. Varios estudios *in vitro* y en animales de experimentación han demostrado eficacia en el tratamiento de esta patología con silimarina y han tratado de explicar el mecanismo. Zhagn *et al.* en 2013 estudiaron los efectos de la silimarina en ratas a las que se les administraba alcohol diariamente durante 6 semanas creando un modelo de alcoholismo crónico (25). Los resultados fueron positivos: en las ratas tratadas con silimarina disminuía la AST, ALT, bilirrubina total en sangre, disminuía la expresión de NF- κ B, ICAM-1 (molécula de adhesión), IL-6, la peroxidación de los lípidos, el contenido en triglicéridos hepáticos, los cambios histológicos y aumentaba la actividad de la GPx y SOD, es decir, disminuían los marcadores de daño hepático y la respuesta inflamatoria a la vez que aumentaba la capacidad antioxidante.

Song *et al* diseñaron otro estudio en ratones para ver el efecto de la silimarina en intoxicaciones agudas con etanol (26). En este caso se administraba etanol en tres grandes dosis en un intervalo de 36h y se analizaban las muestras biológicas 4h después. Los resultados fueron similares a los anteriores: los ratones intoxicados con etanol y tratados con silimarina tenía valores significativamente menores de AST, triglicéridos, peroxidación lipídica, acumulación grasa en el hígado y mayor cantidad de glutatión que el grupo que no recibía silimarina, aunque sin alcanzar los niveles de los ratones no intoxicados. No se detectó diferencia entre el grupo tratado y no tratado en cambios en el CYP2E1 y la disminución de TNF- α no fue significativa. A la vista de estos resultados se han propuesto varios mecanismos que expliquen el efecto protector de la silimarina frente al etanol:

- El CYP2E1 es responsable de la formación de ROS en el hígado, efecto que se ve potenciado por el alcohol, que es inductor de este citocromo (26). El estrés oxidativo tiene un importante papel en el daño hepático inducido por el alcohol (27). La silimarina gracias a su actividad antioxidante antagoniza la depleción de glutatión que se produce, reduce la liberación de radicales libres y aumenta la actividad de la SOD (28).
- La actividad antioxidante reduce la peroxidación lipídica.
- Los flavanolignanos controlan la inflamación al reducir la expresión de NF- κ B que se ve aumentada por el alcohol y promueve la transcripción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12, quimioquinas, iNOS, y moléculas de adhesión.

Hongos: Existen numerosas especies de hongos tóxicos y entre ellas dentro de las intoxicaciones graves, la más frecuente es la intoxicación con amanitina, una de las toxinas que contienen los géneros *Lepiota spp.*, *Galeriana spp.* y *Amanita spp.* que produce un fallo hepático muy grave que puede conducir a la muerte en pocos días. Entre estas setas la *Amanita phalloides* es la que más frecuentemente produce este tipo de intoxicaciones.

El mecanismo que se relaciona con la toxicidad hepática propone que la amanitina entra en los hepatocitos e interacciona de la RNA-polimerasa II (**Figura 3**) inhibiéndola. De esta forma disminuye la síntesis proteica que conduce a la muerte celular (29).

También se ha propuesto que induce la apoptosis de los hepatocitos mediada por p53 y caspasa, aunque esto último no está totalmente confirmado (30).

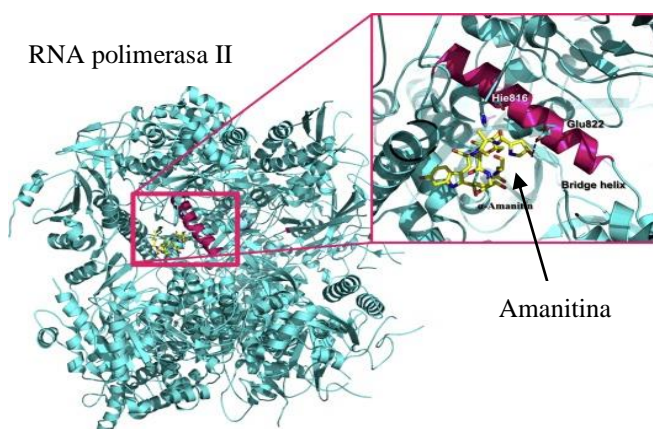


Figura 3. Interacción entre la amanitina y RNA polimerasa II (Imagen tomada de Juliana Garcia *et al.* 2015 (31)).

El efecto protector de la silimarina en intoxicaciones por *A. phalloides* se puede explicar con tres mecanismos de acción:

- Acción antioxidante aumentando la actividad de la SOD y la cantidad de GSH (28).
- Estimulación de la RNA polimerasa I, que aumenta la producción mRNA y proteínas que se ve disminuida por la inhibición de la RNA polimerasa II (17).
- Modificación de la permeabilidad de la membrana que dificulta la entrada de la toxina en los hepatocitos.

Paracetamol: el paracetamol es un analgésico y antipirético muy utilizado en todo el mundo, pero la sobredosificación con este fármaco desencadena una insuficiencia hepática por la formación de un metabolito tóxico en los hepatocitos durante su metabolismo en el CYP2E1. Este metabolito puede alterar la estructura de las proteínas y el DNA, lo que se traduce en daños en las células y en todo el parénquima hepático. Esta intoxicación sin tratamiento puede ser mortal. La silimarina ha demostrado gracias a su actividad antioxidante reducir marcadores de daño hepático como la elevación de AST, ALT, lactato deshidrogenasa (LDH), lípidos peroxidados, aumenta el glutatión disponible y la actividad de la SOD (32). La silidianina y silicristina son los componentes de la silimarina que se relacionan con un mayor efecto protector frente al paracetamol (33). El cardo mariano tiene como se podría aplicar como protector hepático en la administración crónica de paracetamol.

Micotoxinas: las toxinas producidas por hongos son muy variadas y suelen ingerirse de forma accidental cuando están contaminando alimentos. Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos de género *Aspergillus spp.* y son las micotoxinas que más alertas producen en el *Food and Feed safety alerts* (RASFF) (más de 11800 en la UE desde 1979 (34)) además de ser las más peligrosas: una intoxicación aguda produce necrosis hepática exudativa y el consumo crónico de pequeñas cantidades a largo plazo puede llevar al desarrollo cáncer (son carcinógenos de clase I). La bioactivación de estas sustancias y transformación en un compuesto tóxico se produce en el hígado, por lo que es el principal órgano que se ve afectado por estas toxinas. Una forma de eliminarlas es su conjugación con glutatión para su excreción por vía renal; la silimarina en este punto ejerce un efecto beneficioso al aumentar la disponibilidad de GSH y manteniendo el balance redox.

En el estudio de *Naseer O. et al.* en 2016 en terneros intoxicados con aflatoxina B1, la silimarina mostró un efecto beneficioso significativo en el aumento de consumo de la dieta, aumento de peso, disminución de parámetros bioquímicos indicativos de daño hepático como AST, ALT y renal, creatinina y nitrógeno ureico en la sangre (35). Sin embargo, otro estudio en codornices (36) no demostró efectos positivos.

Tetracloruro de carbono: la exposición continuada a este disolvente orgánico produce daños hepáticos como fibrosis y generación de radicales libres. Gracias a la actividad antifibrótica y antioxidante de la silimarina se reducen estos efectos. Numerosos estudios describen la capacidad de la silimarina de proteger frente tetracloruro de carbono, como en el estudio de *Parveen R. et al* se veía una disminución significativa varios parámetros de daño hepático como el incremento de ALT, AST fosfatasa alcalina; además de disminución de especies reactivas de oxígeno y daño histopatológico (37). También dificulta la entrada en las células. La silidianina y silicristina son los principales responsables de esta actividad (33).

Además, otros estudios han demostrado su potencial protector frente a doxorrubicina, cisplatino, tolueno, arsénico y otros fármacos y tóxicos gracias a su poder antioxidante en otros tejidos.

A la vista de estos resultados, la mezcla de flavanolignanos que contienen los frutos de cardo mariano demuestra tener un gran potencial terapéutico en todo tipo de problemas hepáticos gracias su diversidad de mecanismos de acción.

Farmacología secundaria

1) Antiviral

En la **Tabla 1** se recogen los principales mecanismos demostrados en estudios *in vitro* e *in silico* sobre la actividad antiviral de los flavanolignanos de cardo mariano en diferentes virus. En estos estudios se han utilizado diferentes preparados a base de cardo mariano y sus componentes como extractos estandarizados de sus frutos (silimarina), silibina A y B aislada o derivados... Algunos de ellos tienen potenciales aplicaciones muy interesantes ya que se trata de virus que producen enfermedades para las que no existe tratamiento o vacuna como el dengue, virus Chinkunyunga, Mayoro virus, West Nile virus... o el posible tratamiento coadyuvante en coinfección por HCV y VIH.

Virus	Mecanismo	Referencias
Virus de la hepatitis C (HCV)	Activación la vía JAK-STAT que participa en mecanismos antivirales, efecto que se ve potenciado cuando se administra junto a INF.	(38)
	Inhibición la entrada/fusión del virus en los hepatocitos del hospedador	(39)
	Inhibición la replicación del virus al inhibir la síntesis de NS5B RNA polimerasa RNA dependiente	(40)
	Inhibición NS4B, una proteína no estructural del virus que participa en la formación de la membrana.	(41)
	Reducción el estrés oxidativo en las células inducido por la presencia del virus	(38)
Virus del dengue (DENV)	Inhibición de la replicación del virus al actuar sobre NS4B* con una fuerte afinidad. Esta proteína no estructural de virus interfiere en el mecanismo antiviral del INF- α e INF- β (<i>in silico</i>). *NS4B tiene una estructura muy similar en otros flavivirus como virus de la fiebre amarilla o West Nile virus.	(42)
Influenza A (IAV)	Inhibición de la replicación del virus al impedir la síntesis de mRNA tardío.	(43)
Virus inmunodeficiencia humana (VIH)	Inhibición de la replicación del virus al atenuar las funciones celulares implicadas en la activación y proliferación de las células T: modifica la función normal de células T de forma que reducen la expresión de CXCR4 y CCR5.	(44)
Virus Chinkungunya	Inhibición de los efectos citopáticos en las células del hospedador.	(45)
	Inhibición de la replicación del virus y la síntesis proteica al actuar sobre proteínas que participan en este proceso.	(45)
Mayoro virus	Inhibición de la replicación del virus	(46)
	Reducción el estrés oxidativo generado por la presencia del virus y que está relacionado con una actividad	(46)
Virus hepatitis B (HBV)	Inhibición la entrada del virus al bloquear la endocitosis mediada por clatrina.	(47)
Papiloma virus 18 (HPV18)	Inhibición la proteína oncogénica E6 que inactiva la proteína supresora de tumores p53. (<i>in silico</i>).	(48)

Tabla 1. Mecanismo de acción antiviral del cardo mariano frente a diferentes virus.

2) Neuroprotección

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito la capacidad neuroprotectora de la silimarina frente a patologías como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer o isquemia cerebral. El mecanismo principal que explica esta capacidad es su actividad antioxidante, en este caso sobre el sistema nervioso central, aunque también influyen otros (49). En la enfermedad de Parkinson se han descrito efectos beneficiosos tras la administración de silimarina como aumento de dopamina y serotonina, inhibición de la monoaminoxidasa B (MAO-B), o disminución de la agregación de la α -sinucleína, todo ello mediado por el efecto antioxidante (aumenta GSH, SOD, mantiene la integridad de la mitocondria, inhibe CYP2E1, generación de ROS y NO) y antiinflamatorio al inhibir la activación de la microglía que produce mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-1, NO, NF- κ B... que conducen a la pérdida de sustancia nigroestriada (50). En modelos de enfermedad de Alzheimer se ha visto una reducción de las placas seniles de β -amiloide además de una disminución de anomalías cognitivas y de la memoria que están relacionadas con el estrés oxidativo e inflamatorio. Este efecto beneficioso se relaciona con actividad agonista de la silimarina en el receptor de estrógeno β (ER- β), implicado en el aprendizaje y la memoria. En cuanto a la isquemia cerebral, se ha visto que tras la administración de silimarina se reducía el volumen de infarto y la muerte celular mediada por mecanismo de regulación negativa de p53, apaf-1 y caspasa-9, además de reducir la inflamación y el estrés oxidativo (49).

3) Antiaterogénico e hipocolesterolemizante

El efecto antioxidante de los flavanolignanos del cardo mariano también tiene efectos positivos a nivel vascular reduciendo el riesgo de aterogénesis. Las placas de aterosclerosis se forman en los vasos cuando estos se lesionan y las lipoproteínas entran en contacto con el tejido subendotelial del vaso. Este tejido tiene carga positiva, y las LDL circulantes también, sin embargo, cuando se oxidan pasan a tener carga negativa y pueden interactuar con el colágeno de los vasos, depositándose y reduciendo la luz vascular, pudiendo llegar a obstruirlo completamente. La actividad antioxidante de la silimarina evita la oxidación de las LDL impidiendo su depósito en las paredes vasculares (51). Otros estudios demostraron además la capacidad de la silimarina de reducir la síntesis hepática de colesterol al inhibir la hidroximetilglutatil-coenzima A-reductasa (HMG-CoA reductasa) *in vitro* (15). En estudios *in vivo* en ratas con hipercolesterolemia tratados con silimarina se detectó la reducción de colesterol y LDL en plasma (52).

Además, la actividad hepatoprotectora de la silimarina que ayuda a mantener el hígado funcional y evitar hipercolesterolemias secundarias por hepatopatías.

4) Protección frente a hiperglicemias

Los periodos de hiperglucemia que sufren pacientes diabéticos producen daños macro y microvasculares, que a la larga conducen a complicaciones como neuropatías, retinopatías y nefropatías entre otras. La silimarina y en concreto la silibina por su actividad antioxidante ha demostrado en cultivos de células endoteliales tener un efecto protector frente a las hiperglicemias al recuperar el glutatión oxidado, la actividad de las enzimas antioxidantes y reducir la carbonilación de las proteínas generados por el estrés oxidativo que producen las hiperglicemias (53).

Existen estudios que han demostrado efectos positivos en las complicaciones de la diabetes gracias a este efecto protector frente al estrés oxidativo. Se ha visto que la administración de flavanolignanos, gracias a su actividad antioxidante restauran la deficiencia de grupos tiólicos reduciendo el riesgo de neuropatías (54).

En retinopatía, al reducir el edema retinal, neovascularización, destrucción del tejido endotelial e inflamación (55,56). En las nefropatías la silimarina tiene efectos positivos al reducir la albumina en

orina, creatinina sérica, ácido úrico, y las hemorragias además de preservar el tejido epitelial tubular (57).

5) Prevención de la pérdida de hueso

Durante la menopausia la falta de estrógenos que actúen sobre sus receptores ER- α y ER- β en el hueso provocan un desplazamiento del equilibrio formación ósea (por los osteoblastos) – resorción ósea (por lo osteoclastos) hacia la resorción. Esto conduce a osteoporosis y mayor fragilidad ósea. Existen tratamientos eficaces como la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos para evitarlo, sin embargo, su uso a largo plazo aumenta el riesgo de cáncer estrógeno-dependiente. Dos estudios en ratas ovariectomizadas han demostrado la utilidad de la silimarina en la prevención de la pérdida de hueso, en concreto por acción de la silibina. *El-shitnany et al.* (2010) en su estudio tuvieron como resultados la mejora en la histología ósea, aumento de calcio y fósforo en sangre, disminución de osteocalcina (proteína que está incrementada en la menopausia), aumento de PTH (hormona que regula la homeostasis de calcio y fósforo) y estimulación de la proliferación de los osteoblastos por la vía de activación de TGF- β tras la administración de un extracto de silimarina durante 12 semanas (58). *Kim et al* 2013 obtuvieron como resultados aumento de la formación de hueso, inhibición de los osteoclastos, aumento de la densidad mineral y contenido mineral de los huesos e inhibición de RANKL (proteína que participa en la eliminación de hueso) (59). Estos estudios proponen que es la interacción de la silibina como agonista en el receptor de estrógenos en el hueso la responsable de estos resultados (58).

6) Protector de la piel frente a la radiación ultravioleta (UV)

La radiación ultravioleta produce una serie de efectos negativos sobre la piel como, eritema actínico, engrosamiento de la capa córnea y a largo plazo envejecimiento de la piel y riesgo de cáncer cutáneo. Las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras del cardo mariano han llevado a pensar que pueda tener efectos positivos sobre la piel. Algunos estudios han demostrado *in vitro* su efecto protector frente a la radiación ultravioleta. Su efecto antioxidante ayuda a disminuir el envejecimiento, además la silibina es capaz de inhibir metaloproteínas como elastasas y colagenasas que degradan los componentes de la matriz extracelular haciendo que esta pierda firmeza e hidratación. La silimarina absorbe radiación UVA y especialmente UVB, con un máximo de absorción en torno a 325 nm y tiene un efecto fotoprotector frente a UVB de hasta 6 SPF (sun protection factor) (60). Sin embargo, la falta de datos *in vivo* y la controversia con los resultados de otros estudios en los que se confirma la capacidad antioxidante, pero muestran la intensificación de la muerte celular de queratinocitos inducida por UVA (61), obliga a ser cautos a la hora de utilizar productos cosméticos con silimarina, al menos hasta que haya resultados más sólidos acerca de esta aplicación del cardo mariano.

Existen estudios sobre otras actividades de la silimarina y sus componentes aislados el tratamiento de diferentes tipos de parasitosis, frente a la diabetes tipo II o cáncer, sin embargo, los datos son aún escasos.

En resumen, el hígado es la principal diana del cardo mariano, donde existen mayor cantidad de datos sobre la actividad farmacológica *in vitro* y en animales. Los mecanismos de acción están bien establecidos. La actividad antioxidante de los flavanolignanos clave en muchos de ellos, aunque no la única; también son responsables de su actividad su capacidad inmunomoduladora o su similitud estructural con ligandos endógenos entre otros. Estos mecanismos de acción aplicados sobre otras dianas en el organismo hacen que el cardo mariano sea una planta medicinal con gran potencial terapéutico

2. Resultados de ensayos clínicos

Se han realizado numerosos ensayos clínicos en pacientes con enfermedades hepáticas a los que se les administraban productos a base de cardo mariano, tratando más de 3500 pacientes desde 1970. En la **Figura 4** se representa el porcentaje de pacientes incluido en los ensayos clínicos, según su enfermedad: enfermedad hepática no alcohólica, enfermedad hepática alcohólica y hepatitis víricas (4).

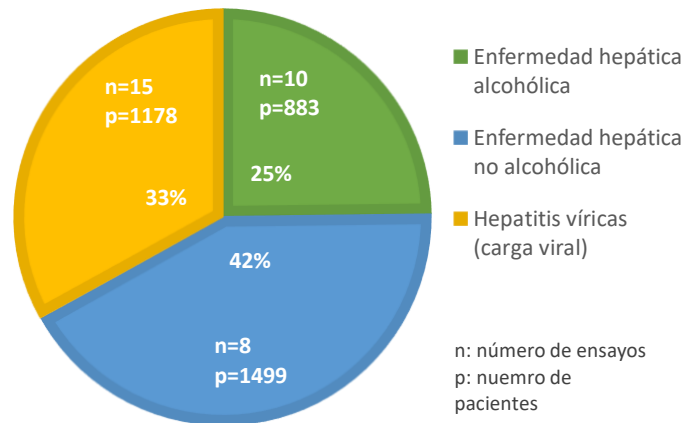


Figura 4. Porcentaje de pacientes incluidos en ensayo clínicos, según su patología.

En la **Figura 5** se representan por enfermedades el número de ensayos con resultados positivos (uno o varios parámetros medidos en el estudio clínico positivo) y negativos.

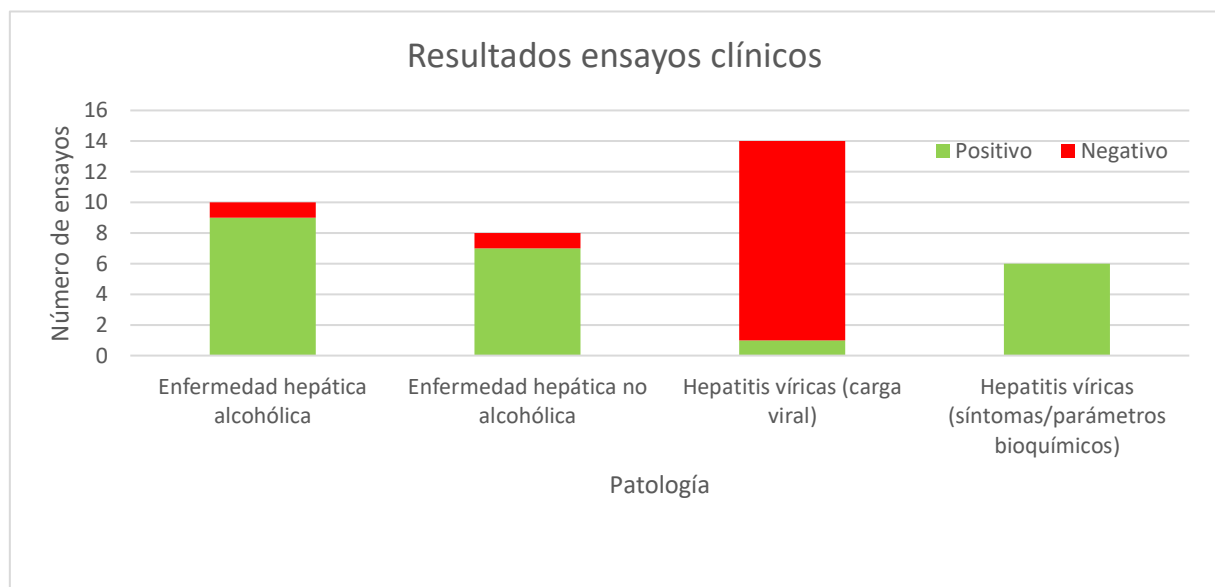


Figura 5. Número de ensayos clínicos con resultados positivos y negativos clasificados según patología

Sin embargo, existen numerosos problemas con el diseño de estos estudios que dificultan la interpretación general de sus resultados: en cada uno de ellos se administran diferentes preparaciones a base de cardo mariano: droga pulverizada, extractos de diferente concentración (incluso misma concentración y se observa diferente biodisponibilidad (62)) o componentes aislados (solo silibina) y en diferentes dosis, pautas y períodos (hay ensayos de 1 mes a 6 años). Todo esto hace que los resultados sean poco consistentes, dificultando el establecimiento de indicaciones claras acerca de las aplicaciones terapéuticas de las silimarina.

En el caso de la intoxicación con hongos, en la literatura hay recogidos más de 1500 *case reports* en los que la administración de silimarina reducían de forma significativa la mortalidad: hasta menos del 10%, mientras que sin tratamiento el riesgo de muerte está por encima del 50%, y con otros tratamientos como derivados de penicilina, por encima del 20% (63).

En España el único tratamiento para este tipo de intoxicaciones existe un derivado de silimarina en solución para administración intravenosa.

3. Farmacocinética, toxicidad y RAMs

Absorción: Los flavanolignanos son muy poco solubles por su hidrofobicidad y estructura no ionizable. Esto condiciona mucho su absorción por vía oral haciendo que sea muy escasa (2-3%) (4). La silibina aislada se absorbe en mayor proporción (23-47%). Además, proceso de absorción está muy condicionado por el contenido intestinal, que puede modificar la solubilidad, pero en cualquier caso la biodisponibilidad es muy baja. El pico máximo de absorción se alcanza a las 2-4h (64).

Distribución: Tras absorberse la silimarina para por el hígado donde una gran parte (75%) (4) es metabolizada, principalmente por conjugación con ácido glucurónico y sulfato. Una pequeña parte pasa a circulación sistémica donde la concentración plasmática máxima se alcanza a las 4-6h. Pero la mayor parte pasa a bilis, donde se alcanzan concentraciones sesenta a cien veces superiores que en plasma.

Metabolismo: la silimarina se metaboliza en el hígado por reacciones de fase I y sobre todo fase II por conjugación formando los monosulfatos y diglucuronatos (64). Además, algunos estudios proponen que la silimarina es inhibidor de enzimas de CYP450 como 3A4, 2C8, 2C9, 2D6 y 2E1 (64) aunque otros no consideran este efecto significativo.

Eliminación: la mayor parte de la dosis administrada se elimina conjugada en heces y solo un pequeño porcentaje se excreta inalterado en orina (2-8%) (4,64). En el intestino grueso las enzimas hidrolíticas de la flora pueden devolver los componentes de la silimarina a su forma de aglicón, de forma que pueden ser reabsorbidos, 20% - 40% se recupera en estos ciclos (64). De manera que los compuestos del extracto de cardo mariano sufren una intensa recirculación enterohepática. La semivida es de 6-8h.

Toxicidad y reacciones adversas: se tienen gran cantidad de datos disponibles sobre la seguridad de productos a base de extractos de cardo mariano, tanto en animales como en seres humanos: en cuanto mutagenicidad y genotoxicidad y carcinogénesis algunos estudios en *S. typhimurium* y *E. coli* han resultado positivos y existen algunas evidencias no clínicas de genotoxicidad. No hay evidencias sobre efectos carcinogénicos. En conclusión, la falta de resultados concluyentes impide demostrar tanto que se produzcan o no estos efectos negativos (4).

En la revisión realizada por *Vahid Soleimani* en 2019 se recogen más de 40 estudios sobre seguridad en seres humanos sanos y enfermos (hepatitis, cirrosis, tuberculosis, talasemia, diabetes, cáncer...) tratados con diferentes dosis (100-400mg) y pautas (1-3 veces al día), durante 3h a nueve meses con silimarina y en ninguno apareció toxicidad ni efectos adversos graves (65). La mayoría de las reacciones adversas son síntomas gastrointestinales leves como sequedad de boca, náuseas, diarrea, sensación de hinchazón y molestias en el estómago. También se ha detectado dolor de cabeza y reacciones de hipersensibilidad que cursan con dermatitis, prurito o exantema. Existe un estudio en mujeres embarazadas (66) con hepatitis C que recibieron lamivudina y silimarina durante el embarazo y no aparecieron reacciones adversas ni anomalías en los fetos. Se realizó otro estudio en 50 mujeres en periodo de lactancia y tampoco se detentaron efectos adversos (67) aunque en estos grupos de población tan sensibles es recomendable la precaución especialmente cuando los datos son escasos. Se han detectado interacciones con medicamentos por efectos inhibidor de algunas isoformas de CYP450 y la UGT1A1, aunque no son clínicamente relevantes (4).

CONCLUSIONES

- La silimarina tiene efectos terapéuticos en diferentes patologías que afectan al hígado, que se explican por varios mecanismos de acción.
- La actividad antioxidante, entre otras, hace que tenga un gran potencial terapéutico en otras dianas, útil en patologías muy variadas.
- La falta de uniformidad en la composición de las preparaciones, dosis, posología, duración, etc. y el reducido número de participantes en los ensayos clínicos dificultan la indicación del cardo mariano basada en un uso bien establecido.
- La escasa biodisponibilidad limita la aplicación clínica, aunque deja una puerta abierta a la investigación en formas para incrementarla.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: Past, present, future. Vol. 24, Phytotherapy Research. 2010.
2. Molina J, Castoldi E, Garcia-Madrid AS, Roca-Valiente B, Lumbreras A, del Estal E, et al. Plantas medicinales de Madrid. Madrid: Dextra; 2015.
3. Ministerio de Sanidad Consumo y bienestar social. *Silybum marianum* L. Gaertner. Monografía 1860. In: Real Farmacopea Española. 5ª. Madrid: Boletín oficial del Estado; 2015.
4. European Medicines Agency (EMA). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report on *Silybum marianum*. Reino Unido: 2015.
5. Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A, Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. Vol. 32, Phytotherapy Research. 2018.
6. Font Quer P. Plantas medicinales: el Dioscórides renovado. 2nd ed. Barcelona: Labor; 1973.
7. Schauenber P, Paris F, Fortes Fortes J, Niestlé V. Guía de las plantas medicinales. 4th ed. Barcelona: Omega; 1980.
8. López Sáez JA. Botánica mágica y misteriosa. Madrid: Mundi-Prensa; 2000.
9. Consejo General de Colegios de farmacéuticos CG de C de F. Catálogo de plantas medicinales 2010. 1st ed. Madrid: Catálogo consejo 2010; 2010.
10. Medicines Agency E. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) European Union herbal monograph on *Silybum marianum* (L.) Gaertn., fructus Final Discussion in Working Party on European Union monographs and list. 2018.
11. Surai PF. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2015 Mar 20;4(1).
12. Serçe A, Toptancı BÇ, Tanrikut SE, Altaş S, Kızıl G, Kızıl S, et al. Assessment of the Antioxidant Activity of *Silybum marianum* Seed Extract and Its Protective Effect against DNA Oxidation, Protein Damage and Lipid Peroxidation. Food technology and biotechnology. 2016 Dec;54(4).
13. Fehér J, Láng I, Deák G, Cornides A, Nékám K, Gergely P. Free radicals in tissue damage in liver diseases and therapeutic approach. The Tokai journal of experimental and clinical medicine. 1986;11 Suppl.
14. Kim SH, Oh D-S, Oh JY, Son TG, Yuk DY, Jung Y-S. Silymarin Prevents Restraint Stress-Induced Acute Liver Injury by Ameliorating Oxidative Stress and Reducing Inflammatory Response. Molecules (Basel, Switzerland). 2016 Apr 1;21(4).
15. Nassuato G, Iemmolo RM, Strazzabosco M, Lirussi F, Deana R, Francesconi MA, et al. Effect of Silibinin on biliary lipid composition. Experimental and clinical study. Journal of hepatology. 1991 May;12(3).
16. Miadonna A, Tedeschi A, Leggieri E, Lorini M, Froidi M, Zanussi C. Effects of silybin on histamine release from human basophil leucocytes. British Journal of Clinical Pharmacology. 1987 Dec;24(6).
17. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. The Indian journal of medical research. 2006 Nov;124(5).
18. Bae M, Park Y-K, Lee J-Y. Food components with antifibrotic activity and implications in prevention of liver disease. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2018 May;55.

19. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4).
20. Sonnenbichler J, Zetl I. [Mechanism of action of silibinin. V. Effect of silibinin on the synthesis of ribosomal RNA, mRNA and tRNA in rat liver in vivo]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*. 1984 May;365(5).
21. Sonnenbichler J, Zetl I. Specific binding of a flavonolignane derivative to an estradiol receptor. *Progress in clinical and biological research*. 1988;280.
22. Savita S, Srivastava A, SS-IJ of, 1994 undefined. Effect of picroliv and silymarin on liver regeneration in rats. *ijp-online.com*.
23. Crocenzi FA, Basiglio CL, Pérez LM, Portesio MS, Pozzi EJS, Roma MG. Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: Possible involvement of cAMP. *Biochemical Pharmacology*. 2005 Apr 1;69(7).
24. MedlinePlus en español [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.) [actualizado 12 ago. 2005]. Enfermedad hepática alcohólica; [revisado 7 oct 2017; consulta 22 abr 20219]; [aprox. 4 p.]. Disponible en <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000281.htm>
25. Zhang W, Hong R, Tian T. Silymarin's Protective Effects and Possible Mechanisms on Alcoholic Fatty Liver for Rats. *Biomolecules and Therapeutics*. 2013 Jul 31;21(4).
26. Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY-W, Liu Y, Ji X, et al. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2006 Mar;30(3).
27. Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology*. 2003 Mar;124(3).
28. Frascini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clinical Drug Investigation*. 2002;22(1).
29. Wieland T. The toxic peptides from Amanita mushrooms. *International journal of peptide and protein research*. 1983 Sep;22(3).
30. Magdalan J, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Sozański T, Szelağ A, Dziegieł P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with α -amanitin. *Human & Experimental Toxicology*. 2011 Jan 8;30(1).
31. Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, de Pinho PG, de Lourdes Bastos M, et al. Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food and Chemical Toxicology*. 2015 Dec;86.
32. González LT, Minsky NW, Espinosa LEM, Aranda RS, Meseguer JP, Pérez PC. In vitro assessment of hepatoprotective agents against damage induced by acetaminophen and CCl₄. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017 Dec 13;17(1).
33. Dvorák Z, Kosina P, Walterová D, Simánek V, Bachleda P, Ulrichová J. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicology letters*. 2003 Feb 3;137(3).
34. Eupean commission. RASFF Portal: Notifications. [data base on the internet. Consultado 6 mayo 2019. Disponible en <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>
35. Naseer O, Khan JA, Khan MS, Omer MO, Chishti GA, Sohail ML, et al. Comparative Efficacy of Silymarin and Choline Chloride (Liver Tonics) in Preventing the Effects of Aflatoxin B1 in Bovine Calves. *Polish journal of veterinary sciences*. 2016 Sep 1;19(3).

36. Sakamoto MI, Murakami AE, Fernandes AM, Ospina-Rojas IC, Nunes KC, Hirata AK. Performance and serum biochemical profile of Japanese quail supplemented with silymarin and contaminated with aflatoxin B1. *Poultry Science*. 2018 Jan 1;97(1).
37. Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Vasudev SS, Ahmad S. Effects of silymarin nanoemulsion against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Archives of Pharmacal Research*. 2011 May 9;34(5).
38. Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Liu Y, Lee DY-W. Inhibition of T-Cell Inflammatory Cytokines, Hepatocyte NF- κ B Signaling, and HCV Infection by Standardized Silymarin. *Gastroenterology*. 2007 May;132(5).
39. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, et al. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6).
40. Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Pallier C, Brillet R, et al. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology*. 2010 Mar;138(3).
41. Esser-Nobis K, Romero-Brey I, Ganten TM, Gouttenoire J, Harak C, Klein R, et al. Analysis of hepatitis C virus resistance to silibinin *in vitro* and *in vivo* points to a novel mechanism involving nonstructural protein 4B. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013 Mar;57(3).
42. Qaddir I, Rasool N, Hussain W, Mahmood S. Computer-aided analysis of phytochemicals as potential dengue virus inhibitors based on molecular docking, ADMET and DFT studies. *Journal of vector borne diseases*. 54(3).
43. Song JH, Choi HJ. Silymarin efficacy against influenza A virus replication. *Phytomedicine*. 2011 Jul 15;18(10).
44. McClure J, Lovelace ES, Elahi S, Maurice NJ, Wagoner J, Dragavon J, et al. Silibinin inhibits HIV-1 infection by reducing cellular activation and proliferation. *Apetrei C, editor. PloS one*. 2012 Jul 25;7(7).
45. Lani R, Hassandarvish P, Chiam CW, Moghaddam E, Chu JJH, Rausalu K, et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific Reports*. 2015 Sep 16;5(1).
46. Camini FC, da Silva TF, da Silva Caetano CC, Almeida LT, Ferraz AC, Alves Vitoreti VM, et al. Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral research*. 2018 Oct;158.
47. Umetsu T, Inoue J, Kogure T, Kakazu E, Ninomiya M, Iwata T, et al. Inhibitory effect of silibinin on hepatitis B virus entry. *Biochemistry and biophysics reports*. 2018 Jul;14.
48. Kumar S, Jena L, Sahoo M, Kakde M, Daf S, Varma AK. In Silico Docking to Explicate Interface between Plant-Originated Inhibitors and E6 Oncogenic Protein of Highly Threatening Human Papillomavirus 18. *Genomics & informatics*. 2015 Jun;13(2).
49. Borah A, Paul R, Choudhury S, Choudhury A, Bhuyan B, das Talukdar A, et al. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013 Nov;19(11).
50. Ullah H, Khan H. Anti-Parkinson Potential of Silymarin: Mechanistic Insight and Therapeutic Standing. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9.
51. Locher R, Suter PM, Weyhenmeyer R, Vetter W. Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation. *Arzneimittel-Forschung*. 1998 Mar;48(3).
52. Rui Y-C. Advances in pharmacological studies of silymarin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1991;86(suppl 2).

53. Palomino O, Gouveia N, Ramos S, Martín M, Goya L. Protective Effect of *Silybum marianum* and Silibinin on Endothelial Cells Submitted to High Glucose Concentration. *Planta Medica*. 2016 Aug 15;83(01/02).
54. Dietzmann J, Thiel U, Ansorge S, Neumann KH, Tüger M. Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002 Nov 15;33(10).
55. Lin C, Li C, Liao P, Tse L, Huang W, Cheng H, et al. Silibinin inhibits VEGF secretion and age-related macular degeneration in a hypoxia-dependent manner through the PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2013 Feb;168(4).
56. Zhang H-T, Shi K, Baskota A, Zhou F-L, Chen Y-X, Tian H-M. Silybin reduces obliterated retinal capillaries in experimental diabetic retinopathy in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2014 Oct 5;740.
57. Sheela N, Jose MA, Sathyamurthy D, Kumar BN. Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic nephropathy in rats. *Iranian journal of kidney diseases*. 2013 Mar;7(2).
58. El-Shitany NA, Hegazy S, El-desoky K. Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats. *Phytomedicine*. 2010 Feb;17(2).
59. Kim J-L, Kim Y-H, Kang M-K, Gong J-H, Han S-J, Kang Y-H. Antiosteoclastic Activity of Milk Thistle Extract after Ovariectomy to Suppress Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis. *BioMed Research International*. 2013;2013.
60. Vostálová J, Tinková E, Biedermann D, Kosina P, Ulrichová J, Rajnochová Svobodová A. Skin Protective Activity of Silymarin and its Flavonolignans. *Molecules*. 2019 Mar 14;24(6).
61. Fidrus E, Ujhelyi Z, Fehér P, Hegedűs C, Janka EA, Paragh G, et al. Silymarin: Friend or Foe of UV Exposed Keratinocytes? *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019 Apr 26;24(9).
62. Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.). *Integrative cancer therapies*. 2007 Jun 26;6(2).
63. Mengs U, Pohl R-T, Mitchell T. Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012 Aug;13(10).
64. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017 Nov 10;22(11).
65. Soleimani V, Delghandi PS, Moallem SA, Karimi G. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. *Phytotherapy Research*. 2019 May 8;
66. Hung J-H, Chu C-J, Sung P-L, Chen C-Y, Chao K-C, Yang M-J, et al. Lamivudine Therapy in the Treatment of Chronic Hepatitis B with Acute Exacerbation During Pregnancy. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2008 Mar;71(3).
67. di Pierro F, Callegari A, Carotenuto D, Tapia MM. Clinical efficacy, safety and tolerability of BIO-C (micronized Silymarin) as a galactagogue. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2008 Dec;79(3).