



Estudi de la biodisponibilitat del *trans-resveratrol* i el seu efecte quimiopreventiu del càncer de còlon induït per 1,2-dimetilhidrazina en rata

Irene Alfaras Cardenal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia**

**ESTUDI DE LA BIODISPONIBILITAT DEL
trans-RESVERATROL I EL SEU EFECTE
QUIMIOPREVENTIU DEL CÀNCER DE CÒLON
INDUÏT PER 1,2-DIMETILHIDRAZINA EN RATA**

Programa de doctorat:

Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

Directores:

Dra. Joana Maria Planas Rosselló,
Catedràtica de Fisiologia

Dra. Maria Emília Juan i Olivé,
Professora Agregada de Fisiologia

**Irene Alfaras Cardenal
Barcelona, 2011**

JOANA MARIA PLANAS ROSSELLÓ, Catedràtica d'Universitat de Fisiologia del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia, i MARIA EMÍLIA JUAN OLIVÉ, Professora Agregada del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia,

INFORMEN:

Que la memòria titulada "Estudi de la biodisponibilitat del *trans*-resveratrol i el seu efecte quimiopreventiu del càncer de còlon induït per 1,2-dimetilhidrazina en rata", presentada per IRENE ALFARAS CARDENAL, per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la seva direcció en el Departament de Fisiologia i, considerant-la conclosa, autoritzen la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per a que així consti, signen la present,

Dra. Joana M. Planas Rosselló

Dra. M. Emília Juan Olivé

Barcelona, 1 de juliol del 2011

Aquesta tesi ha estat subvencionada pel Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-05728 i AGL2009-15788) i la Generalitat de Catalunya (2005-SGR-00632 i 2009-SGR-471). Durant la seva realització, l'autora ha gaudit d'una Beca de Col·laboració en Projectes de Recerca. El Grup de Fisiologia i Nutrició Experimental pertany a la Red Española de Investigación sobre Proteínas Transportadoras de Membrana y sus implicaciones Fisiológicas, Patológicas y Farmacológicas (REIT) (BFU2005-24983-E/BFI i BFU2007-30688-E/BFI) el qual ha subvencionat a l'autora l'assistència a cursos especialitzats en transportadors. L'assistència a congressos ha estat subvencionada amb borses de viatge concedides per la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

M'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que des de fa 5 anys han estat al meu costat en tot moment i m'han ajudat d'una manera o altre a realitzar la meva Tesi Doctoral.

En primer lloc, a les meves directores de Tesi, la Dra. Planas i la Dra. Juan o la Joana i l'Emília, per haver-me ensenyat a moure'm en el laboratori, a escriure articles,... en definitiva, mostrar-me en què consisteix el món científic. Agrair-vos la vostra paciència i optimisme nat que mostreu sempre que les coses no surten del tot bé, i que fa que sempre estigueu allà pel que calgui en qualsevol moment. Per la vostra qualitat científica i, el que és més important per mi, qualitat humana.

Al Miquel i la Conxita, voldria donar-vos les gràcies per la vostra acollida al grup i per estar sempre disponibles a ajudar-me. I a l'Anna, perquè sempre m'has resolt els dubtes que pogués haver tingut i per tantes hores compartides no només al departament sinó també al bar parlant de les aventures de l'Ona, el Roc i el Pau.

A les meves nenes favorites del Departament, la Lluïsa i la Mònica. Hem estat juntes des del començament i... no sé ni per on començar... sapigueu que sense vosaltres aquests anys no haguessin estat ni de bon tros l'aventura que finalment he viscut. Per les hores de xerrera, "pelis pastelonas", classes de bateà i torrenc, les hores ^(estressants) invertides en comprar un simple regal (sort de la Moni), per aguantar el meu ritme quan tinc un mapa a les mans... per tots i cadascun dels moments que hem passat juntes.

También ha sido un apoyo muy importante para mí alguien con quien sólo tuve la oportunidad de compartir un año. A Cris. A pesar que ya hace tiempo que volviste a Brasil, sigues estando muy presente. Saudade de você!

A les "noves" incorporacions. A la Marta i la Glòria, gràcies per aquest últim any de suport mutu. Esteu començant i el camí pot semblar molt llarg però no desespereu que al final les coses acaben sortint!!!

A tots aquells estudiants que han pogut compartir uns mesos en el grup i fer més amè el dia a dia al laboratori: la pròpia Glòria en els seus inicis, la Marta Valls, l'Andreu, la Laura, la Marta Rodríguez, la Marta Martí i l'Anna Mensa. Així com la Laia, que tot i ser ex-doctorand de la Joana, també m'ha ajudat en algun moment.

A tots vosaltres, per fer del grup FiNEX la meva família científica.

També m'agradaria dedicar unes paraules a la Dra. Colom, sense la teva col·laboració part d'aquesta tesi no hagués estat possible. Per la teva disposició en tot moment a resoldre els meus dubtes, que no són pocs, del món de la farmacocinètica poblacional.

També hi ha altres membres no només de la UB als quals m'agradaria incloure en aquest apartat.

A la Dra. Garcia i la Dra. Cambras pel seu suport i l'ajuda des dels inicis del Màster.

To Dr. Wenzel and Dr. Boll, for affording me the opportunity of staying in their lab.

To Nadine and Malaika for being my labmates and friends during my stay in Gießen.

A la Dra. Vázquez y al Dr. Mate por su recibimiento y acogida en su laboratorio de Sevilla.

A Sonia por su hospitalidad y que juntamente con Mariví me acogieron en el laboratorio como una más. Y también por su acogida a Patri y Vicky convirtiéndose durante una semana en mis compañeros de piso.

Al Dr. Casals per la seva ajuda i amabilitat quan vaig estar al masses treballant, en especial un 24 de desembre fins ben entrada la tarda.

A tots els membres del Departament de Fisiologia, per fer d'aquesta experiència un record inesborrable.

A tota la gent de l'estabulari, la Tere, la Marta, la Paula, el David... per la seva ajuda amb els animals i els seus consells.

Como no podría ser de otra manera, también debo incluir a tooooodos mis amigos que sin tener ni idea de lo que hacía de vez en cuando preguntaban “¿qué tal las ratas?”.

A los del cole, Gemma, Andrea, Laura, Marta, Rebeca, Ángel, Carlos, Albert, Jaime y Uri que fue quien me acabó llevando al Departament de Fisiologia. Porque sois los que estáis ahí para todo.

Als voluntaris, Marina i Anaïs gràcies pels viatges i aventures i per la vostra amistat. I a l'Estela i el Toni, potser no ens veiem tant però sempre us tenim presents.

Y como no, a las farmacéuticas. A Elena, Carla, Carolina, Sandra, Cristina, Mari y Pati por todo. Por cada momento que hemos pasado juntas durante todos estos años. También a las no farmacéuticas que se han ido uniendo con el tiempo, a Rosa y Vicky, siempre dispuestas a todo. Y a todos los demás que habéis ido apareciendo, Javi, Marcos, Isra, Adrià...

Y no podría acabar de otra manera que dando las gracias a mi familia. Pese a todas las bromas que me han caído (y son unas cuantas), sois lo mejor que tengo. A mis padres, por su paciencia y apoyo. A mis hermanos y cuñadas por vuestra ayuda y cariño. A los peques, el sexy y el rubiales, que han ido llegando a medida que mi tesis avanzaba... porque siendo tan pequeños, se les quiere como si llevarsen toda la vida conmigo. A todos y cada uno, gracias.

ÍNDEX

ÍNDEX.....	I
ÍNDEX DE FIGURES	V
ÍNDEX DE TAULES.....	VII
ABREVIATURES.....	IX
RESUM DE LA TESI	i
I. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS	1
II. INTRODUCCIÓ.....	3
1. Estilbenoides.....	3
2. <i>trans</i> -Resveratrol.....	5
2.1. Característiques físiques i químiques.....	5
2.2. Fonts: plantes i aliments.....	5
2.3. Antecedents del seu ús terapèutic	6
2.4. Propietats biològiques.....	7
2.4.1. Antiinflamatori	7
2.4.2. Efecte sobre la funció reproductora masculina.....	7
2.4.3. Antienvelliment	8
2.4.4. Protecció cardiovascular	8
2.4.5. Malalties neurodegeneratives	9
2.4.6. Obesitat i diabetis	9
2.4.7. Efecte antiviral	10
2.4.8. Propietats anticanceroses.....	10
3. Dihidroresveratrol.....	12
3.1. Característiques físiques i químiques.....	12
3.2. Fonts.....	12
3.2.1. Plantes.....	12
3.2.2. Metabolisme del <i>trans</i> -resveratrol per la microbiota humana	13
3.3. Propietats biològiques.....	13
3.3.1. Antiinflamatori	14
3.3.2. Efecte sobre el potencial d'acció de les neurones.....	14
3.3.3. Activitat antiespasmòdica.....	14
3.3.4. Efecte tòxic	14
3.3.5. Efecte anticancerigen	14

3.3.6. Activitat estrògena	15
4. Farmacocinètica	15
4.1. Metabolisme i eliminació intestinal	16
4.1.1. Reaccions de fase I	17
4.1.2. Reaccions de fase II	17
4.1.3. Reaccions de fase III	18
4.1.3.1. Proteïnes transportadores ABC	18
4.3. Metabolisme hepàtic.....	20
4.4. Distribució.....	20
4.5. L'eliminació de l'organisme.....	21
4.5.1. Excreció renal.....	21
4.5.2. Excreció biliar	21
4.5.3. Flora bacteriana	21
III. RESULTATS	23
CAPÍTOL 1. POSTA A PUNT D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE DIHIDRORESVERATROL EN PLASMA DE RATA.....	25
1.1. Resum de l'article 1	26
PUBLICACIÓ 1.. Determinació del dihidroresveratrol en plasma de rata mitjançant HPLC.	
M. Emília Juan, <u>Irene Alfaras</u> and Joana M. Planas. Determination of dihydroresveratrol in rat plasma by HPLC. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 58 (12), 7472-7475, 2010	29
CAPÍTOL 2. ESTUDI DE L'EFECTE ANTICANCERIGEN DEL <i>trans</i> -RESVERATROL EN UN MODEL D'INDUCCIÓ PER 1,2-DIMETILHIDRAZINA DE CÀNCER DE CÒLON EN RATA	33
2.1. Posta a punt d'un model de càncer de còlon en rata	35
2.1.1. Introducció	35
2.1.1.1. Mecanisme de la carcinogènesi de còlon en humans.....	35
2.1.1.2. Inducció de càncer de còlon en rates	35
2.1.1.3. Dihidroclorur d'1,2-dimetilhidrazina (DMH)	36
2.1.1.4. Descripció de lesions preneoplàstiques induïdes per DMH.....	37
2.1.2. Material i mètodes	38
2.1.2.1. Reactius i substàncies utilitzades	38
2.1.2.2. Animals d'experimentació.....	38

2.1.2.3. Tractament.....	39
2.1.2.4. Obtenció de mostres.....	39
2.1.2.5. Recompte de focus de criptes aberrants.....	40
2.1.2.6. Recompte de focus amb depleció de mucines.....	40
2.1.2.7. Tractament de les dades.....	41
2.1.3. Resultats.....	41
2.1.3.1. Evolució del pes corporal.....	41
2.1.3.2. Consum de pinso i aigua.....	42
2.1.3.3. Dades morfològiques.....	43
2.1.3.4. Recompte de focus de criptes aberrants.....	43
2.1.3.5. Recompte de focus amb depleció de mucines.....	45
2.1.4. Discussió.....	47
2.2. Resum de l'article 2.....	53
PUBLICACIÓ 2.. El <i>trans</i>-resveratrol redueix les lesions preneoplàstiques a còlon en rates tractades amb dimetilhidrazina.	
<u>Irene Alfaras</u>, M. Emília Juan and Joana M. Planas. <i>trans</i>-Resveratrol reduces precancerous colonic lesions in dimethylhydrazine-treated rats. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 58 (13), 8104-8110, 2010.....	
55	
CAPÍTOL 3. ESTUDI DE L'EFECTE DEL <i>trans</i>-RESVERATROL EN UN MODEL DE COLITIS ESPONTÀNIA EN RATOLÍ.....	
63	
3.1. Introducció.....	65
3.2. Material i mètodes.....	66
3.2.1. Preparació de la solució de <i>trans</i> -resveratrol.....	66
3.2.2. Animals d'experimentació.....	66
3.2.3. Tractament.....	66
3.2.4. Obtenció de mostres.....	67
3.2.5. Estudi histopatològic del còlon.....	67
3.2.6. Tractament de les dades.....	67
3.3. Resultats.....	68
3.3.1. Pes corporal.....	68
3.3.2. Consum de pinso i aigua.....	68
3.3.3. Pes de les mucoses de jejú i ili i pes de còlon.....	69
3.3.4. Estudi histopatològic del còlon.....	69
3.4. Discussió.....	70

CAPÍTOL 4. AVALUACIÓ DE LA PARTICIPACIÓ DE LES PROTEÍNES ABC INVOLUCRADES EN LA RESISTÈNCIA A FÀRMACS EN L'ABSORCIÓ I DISTRIBUCIÓ DEL <i>trans</i> -RESVERATROL	73
4.1. Resum de l'article 3	75
PUBLICACIÓ 3. Participació de la proteïna <i>breast cancer resistance protein</i> (Bcrp1/ABCG2) en la biodisponibilitat i la distribució en teixits del <i>trans</i> -resveratrol en ratolins modificats genèticament.	
<u>Irene Alfaras</u> , Míriam Pérez, M. Emília Juan, Gracia Merino, Julio G. Prieto, Joana M. Planas and Ana I. Álvarez. Involvement of breast cancer resistance protein (Bcrp1/ABCG2) on the bioavailability and tissue distribution of <i>trans</i> -resveratrol in knockout mice. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 58 (7), 4523-4528, 2010	77
4.2. Estudi de la biodisponibilitat del <i>trans</i> -resveratrol i els seus conjugats en ratolins que no expressen el transportador <i>mdr1a</i> i ratolins no modificats genèticament.....	83
4.2.1. Introducció	83
4.2.2. Material i mètodes	84
4.2.2.1. Reactius i substàncies utilitzades	84
4.2.2.2. Animals d'experimentació.....	84
4.2.2.3. Obtenció de les mostres	84
4.2.2.4. Determinació de <i>trans</i> -resveratrol i els seus conjugats a plasma.....	85
4.2.2.5. Anàlisis cromatogràfiques.....	85
4.2.2.6. Tractament de les dades	86
4.2.3. Resultats.....	86
4.2.4. Discussió	88
CAPÍTOL 5. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL FARMACOCINÈTIC DEL <i>trans</i> -RESVERATROL SEGUINT UNA APROXIMACIÓ POBLACIONAL	91
5.1. Resum de l'article 4	93
PUBLICACIÓ 4. Modelització de la farmacocinètica poblacional del <i>trans</i> -resveratrol i els seus conjugats glucurònid i sulfat després de l'administració oral i intravenosa en rates.	
Helena Colom, <u>Irene Alfaras</u> , Mònica Maijó, M. Emília Juan and Joana M. Planas. Population pharmacokinetic modeling of <i>trans</i> -resveratrol and its glucuronide and sulfate conjugates after oral and intravenous administration in rats. <i>Pharm. Res.</i> 28 (7), 1606-1621, 2011	95
IV. DISCUSSIÓ GENERAL	111
V. CONCLUSIONS.....	123
VI. BIBLIOGRAFIA	127

ÍNDIX DE FIGURES

Figura II.1.	Classificació de la família dels estilbenoides	3
Figura II.2.	Via del fenilpropanoide per a la formació d'estilbenoides i flavonoides.....	4
Figura II.3.	Estructura molecular del <i>cis</i> -resveratrol i el <i>trans</i> -resveratrol	5
Figura II.4.	Espectre d'absorbància del <i>trans</i> -resveratrol	5
Figura II.5.	Síntesi del <i>trans</i> -resveratrol per la via del fenilpropanoide a partir del <i>p</i> -cumaril-CoA mitjançant l'enzim estilbè sintasa.....	5
Figura II.6.	Estructura del dihidroresveratrol i espectre d'absorbància amb màxim als 276 nm	12
Figura II.7.	Síntesi del dihidroresveratrol per la via del fenilpropanoide a partir del <i>p</i> -cumaril-CoA mitjançant l'enzim bibenzil sintasa	13
Figura II.8.	Absorció de compostos a través de l'epiteli intestinal.....	16
Figura II.9.	Representació esquemàtica de la unió d'una molècula amb un transportador ABC	18
Figura III.1.	Metabolisme de la 1,2-dimetilhidrazina	36
Figura III.2.	Evolució del pes corporal	41
Figura III.3.	Consum de pinso setmanal.....	42
Figura III.4.	Consum d'aigua setmanal.....	42
Figura III.5.	Recompte total de focus de criptes aberrants (FCA) a còlon sencer	44
Figura III.6.	Recompte de focus de criptes aberrants (FCA) a cada segment de còlon	44
Figura III.7.	Multiplicitat, representada com a criptes aberrants per cada focus (CA/FCA), a còlon sencer	45
Figura III.8.	Multiplicitat, representada com a criptes aberrants per cada focus (CA/FCA), a cada segment del còlon	45
Figura III.9.	Recompte total de focus amb depleció de mucines (FDM) a còlon sencer.....	45
Figura III.10.	Recompte focus amb depleció de mucines (FDM) a cada segment de còlon	45
Figura III.11.	Percentatge de focus amb depleció de mucines (FDM) respecte el total de focus de criptes aberrants (FCA) a còlon sencer.....	46
Figura III.12.	Multiplicitat, representada com a criptes aberrants per cada focus (CA/FDM), a còlon sencer.....	46
Figura III.13.	Multiplicitat, representada com a criptes aberrants per cada focus (CA/FDM), a cada segment del còlon.....	46
Figura III.14.	Evolució del pes corporal	68
Figura III.15.	Consum de pinso per rata i dia	68

Figura III.16.	Consum d'aigua per rata i dia	68
Figura III.17.	Pes de les mucoses de jejú i ili i pes del còlon normalitzat pel pes corporal	69
Figura III.18.	Estudi histopatològic del còlon.....	69
Figura III.19.	Cromatogrames característics d'una mostra de plasma després de l'administració oral de 60 mg/kg de <i>trans</i> -resveratrol a ratolins amb manca de glicoproteïna P i ratolins no modificats genèticament	87
Figura III.20.	Concentracions plasmàtiques de <i>trans</i> -resveratrol 10, 15 i 30 minuts després de l'administració de 60 mg/kg de <i>trans</i> -resveratrol a ratolins	87
Figura III.21.	Concentracions plasmàtiques de glucurònid 10, 15 i 30 minuts després de l'administració de 60 mg/kg de <i>trans</i> -resveratrol a ratolins.....	88
Figura III.22.	Concentracions plasmàtiques de sulfat 10, 15 i 30 minuts després de l'administració de 60 mg/kg de <i>trans</i> -resveratrol a ratolins	88

ÍNDIX DE TAULES

Taula III.1. Mesures morfomètriques dels segments de còlon i àrea total del còlon	43
Taula III.2. Gradient d'elució per a mostres de plasma	86

ABREVIATURES

4CL	4-cumarat CoA-ligasa
ABC	Acrònim de l'anglès <i>ATP binding cassette</i>
AhR	Receptor d'hidrocarbur d'aril
APC	Acrònim de l'anglès <i>adenomatous polyposis coli</i>
AM	Azometà
AOM	Azoximetà
AUC	Àrea sota la corba
BBS	Bibenzil sintasa
BCRP	Acrònim anglès de <i>breast cancer resistance protein</i>
BCRP1	Acrònim anglès de <i>breast cancer resistance protein 1</i>
C4H	Cinamat 4-hidroxilasa
CA	Criptes aberrants
cGMP	3',5'-Monofosfat de guanosina cíclica
CHS	Calcona sintasa
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Isoforma constitutiva de la COX
COX-2	Isoforma induïda de la COX
CV	Coeficient de variació
CYP	Citocrom P450
DH	Deshidrogenasa
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
DSS	Sulfat de dextran sòdic
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
ER	Receptor d'estrogen
FCA	Focus de criptes aberrants
FDM	Focus amb depleció de mucines
FPS	Focus de criptes aberrants productores de sialomucines
HID-AB	Ferro diamina-blau alcià
HSV	Virus de l'herpes simple
IL	Interleucina
iNOS	Òxid nítric sintasa induïda
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat
LPS	Lipopolisacàrid

MAM	Metilazoximetanol
MD	Metildiazoni
MII	Malaltia inflamatòria intestinal
MDR	Acrònim anglès de <i>multidrug resistance protein</i>
MRP	Acrònim anglès de <i>multidrug resistance protein</i>
NBD	Domini d'unió a nucleòtids
NF-κB	Factor de transcripció nuclear κB
NK	Acrònim anglès de <i>natural killer</i>
NO	Òxid nítric
NONMEM	Acrònim de l'anglès <i>non-linear mixed-effect modelling</i>
OD	Ornitina decarboxilasa
p53	Factor de transcripció nuclear p53
PAF	Poliposi adenomatosa familiar
PAL	Fenilalanina amoni-liasa
PBS	Tampó fosfat salí
pcVPC	Comprovació visual predictiva corregida per les prediccions típiques
PD	Farmacodinàmica
P-gp	Glicoproteïna P
PML	Proteïna de la leucèmia promielocítica
PK	Farmacocinètica
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
SIRT	Acrònim anglès de <i>silent mating type information regulation 2 homolog</i>
SLC	Acrònim anglès de <i>solute carrier</i>
SPF	Acrònim anglès de <i>specific pathogen free</i>
ST	Sulfotransferasa
STS	Estilbè sintasa
TAL	Tirosina amoni-liasa
TMD	Domini transmembrana
TNBS	Àcid 2,4,6,-trinitrobenzèsulfònic
TNFα	Factor de necrosi tumoral α
UGT	Uridin-difosfat glucuronosiltransferasa
UV	Ultraviolat
VEFG	Factor de creixement endotelial vascular

RESUM DE LA TESI

El *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbè) és un polifenol que es troba a diferents components de la dieta amb propietats beneficioses per a la salut. Per aquesta raó, ha estat considerat com un compost bioactiu i, recentment, com un nutracèutic. En el present treball s'ha aprofundit en l'estudi d'aquest compost per tal de conèixer nous aspectes metabòlics i terapèutics del *trans*-resveratrol. En primer lloc, s'han estudiat els canvis que pateix durant el seu trànsit intestinal així com el seu metabolisme a l'enteròcit al ser administrat per via oral a la rata. S'ha demostrat que el *trans*-resveratrol és metabolitzat a l'enteròcit formant els seus conjugats glucurònid i sulfat. Aquests compostos retornen majoritàriament a la llum intestinal mitjançant les proteïnes transportadores ABC. El *trans*-resveratrol no absorbit i que arriba a l'intestí gruixut és convertit en dihidroresveratrol per acció de la microbiota que redueix el doble enllaç del *trans*-resveratrol. També el dihidroresveratrol és conjugat i convertit en els seus respectius glucurònid i sulfat. Per determinar aquests compostos, s'ha posat a punt una tècnica per a la determinació del dihidroresveratrol a plasma per extracció en fase sòlida i el resveratrol a contingut intestinal mitjançant una extracció líquid-líquid seguides de l'anàlisi per HPLC. Els mètodes que s'han descrit són exactes, precisos i tenen recuperacions superiors al 95%. En una segona part, s'ha posat a punt un model d'inducció de càncer de còlon en rata per tal d'avaluar l'efecte del *trans*-resveratrol sobre les lesions preneoplàstiques induïdes per 1,2-dimetilhidrazina. L'administració de 60 mg/kg durant 49 dies, ha demostrat que el *trans*-resveratrol, el sulfat, el glucurònid i el dihidroresveratrol es troben en el contingut intestinal i que es produeix una reducció del 52% dels focus de criptes aberrants i del 45% dels focus amb depleció de mucines. S'observa una correlació directa entre la disponibilitat del *trans*-resveratrol a còlon i la reducció de les lesions preneoplàstiques. A continuació s'ha fet un estudi de la biodisponibilitat en ratolins modificats genèticament que no expressen la glicoproteïna P (*Mdr1a*^{-/-}) i, per últim, en ratolins sense la *breast cancer resistance protein* (*Bcrp1*^{-/-}), comparant-la amb la dels ratolins control. Els resultats indiquen similar biodisponibilitat en els controls i *Mdr1a*^{-/-} mentre que es modifica en els ratolins *Bcrp1*^{-/-} indicant que aquestes proteïnes contribueixen en l'absorció i la distribució del *trans*-resveratrol i els seus derivats. Finalment, s'ha desenvolupat un model farmacocinètic per al *trans*-resveratrol i els seus conjugats glucurònid i sulfat seguint una aproximació poblacional. El model que millor descriu les concentracions plasmàtiques en rata vincula els models bicompartimentals del *trans*-resveratrol, del glucurònid i del sulfat. Aquest model és robust i capaç de predir adequadament les concentracions plasmàtiques, possibilitant així la planificació de futurs estudis PK-PD per tal d'establir la contribució relativa dels conjugats en l'eficàcia del *trans*-resveratrol.

El *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol que se encuentra en diferentes componentes de la dieta con propiedades beneficiosas para la salud. Por consiguiente, ha sido considerado como un compuesto bioactivo y, recientemente, como un nutracéutico. En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de este compuesto para conocer nuevos aspectos metabólicos y terapéuticos del *trans*-resveratrol. En primer lugar, se han estudiado los cambios que sufre durante su tránsito intestinal así como su metabolismo en el enterocito al ser administrado por vía oral en la rata. Se ha demostrado que es metabolizado en el enterocito formando glucurónido y sulfato, que vuelven mayoritariamente a la luz intestinal mediante las proteínas transportadoras ABC. El *trans*-resveratrol no absorbido y que llega al intestino grueso es convertido en dihidroresveratrol por acción de la microbiota que reduce el doble enlace alifático. También el dihidroresveratrol es conjugado y convertido en sus respectivos glucurónido y sulfato. Para determinar estos compuestos, se ha puesto a punto una técnica para la determinación del dihidroresveratrol en plasma mediante una extracción en fase sólida y el resveratrol en el contenido intestinal mediante una extracción líquido-líquido seguidas del análisis por HPLC. Los métodos son exactos, precisos y tienen recuperaciones superiores al 95%. En una segunda parte, se ha puesto a punto un modelo de inducción de cáncer de colon en rata para evaluar el efecto del *trans*-resveratrol sobre las lesiones preneoplásicas inducidas por 1,2-dimetilhidrazina. La administración de 60 mg/kg durante 49 días, ha demostrado que el *trans*-resveratrol, el sulfato, el glucurónido y el dihidroresveratrol se encuentran en el contenido intestinal y que se produce una reducción del 52% de los focos de criptas aberrantes y del 45% de los focos con depleción de mucinas. Se observa una correlación directa entre la disponibilidad del *trans*-resveratrol en colon y la reducción de las lesiones preneoplásicas. A continuación se ha realizado un estudio de la biodisponibilidad en ratones modificados genéticamente que no expresan la glicoproteína P (*Mdr1a*^{-/-}) y, por último, en ratones sin la *breast cancer resistance protein* (*Bcrp1*^{-/-}), comparándola con la de los ratones control. Los resultados indican similar biodisponibilidad en los controles y *Mdr1a*^{-/-} mientras que se modifica en los ratones *Bcrp1*^{-/-} indicando que estas proteínas contribuyen en la absorción y la distribución del *trans*-resveratrol y sus derivados. Finalmente, se ha desarrollado un modelo farmacocinético para el *trans*-resveratrol y sus conjugados glucurónido y sulfato siguiendo una aproximación poblacional. El modelo que mejor describe las concentraciones plasmáticas en rata vincula los modelos bicompartimentales del *trans*-resveratrol, del glucurónido y del sulfato. Este modelo es robusto y capaz de predecir adecuadamente concentraciones plasmáticas, posibilitando así la planificación de futuros estudios PK/PD para establecer la contribución relativa de los conjugados en la eficacia del *trans*-resveratrol.

trans-Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenol found in several components of the diet with beneficial health properties. Therefore, it has been considered a bioactive compound, and most recently as a nutraceutical. This work has studied this compound in-depth to meet new therapeutic and metabolic aspects of *trans*-resveratrol. Firstly, we evaluated the changes that occur during intestinal transit and metabolism in the enterocyte when it is orally administered in the rat. It has been shown that *trans*-resveratrol is metabolized in the enterocyte forming its glucuronide and sulfate conjugates that mostly return back into the intestinal lumen by ABC transporters. Unabsorbed *trans*-resveratrol reaches the large intestine where microbiota converts this polyphenol in dihydroresveratrol by the reduction of the double bond. Dihydroresveratrol is also conjugated in its glucuronide and sulfate in the intestine. To determine these compounds, a technique has been developed to determine dihydroresveratrol in plasma by a solid phase extraction and *trans*-resveratrol in the intestinal content by a liquid-liquid extraction followed by HPLC analysis. The methods are accurate, precise with recoveries exceeding 95%. Secondly, a model of colon cancer in rats has been developed to evaluate the effect of *trans*-resveratrol on preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine. The administration of 60 mg/kg for 49 days has shown that *trans*-resveratrol, its sulfate and glucuronide, and dihydroresveratrol are found in the intestinal content and produce a reduction of 52% of aberrant crypt foci and 45% of mucin-depleted foci. There is a direct correlation between the availability of *trans*-resveratrol in the colon and the reduction of preneoplastic lesions. Afterward a study of the bioavailability has been carried out in genetically modified mice lacking P-glycoprotein (*Mdr1a*^{-/-}) and in knockout mice for breast cancer resistance protein (*Bcrp1*^{-/-}) as compared with that in wild-type mice. The results indicate similar bioavailability in controls and *Mdr1a*^{-/-} mice while it is altered in *Bcrp1*^{-/-} mice indicating that these transporters contribute to the absorption and distribution of *trans*-resveratrol and its metabolites. Finally, we have developed a pharmacokinetic (PK) model for *trans*-resveratrol and its glucuronide and sulfate conjugates following a population PK approach. A three-linked two-compartment model was built for *trans*-resveratrol, glucuronide and sulfate which describes the plasmatic concentration profile in rat. This model is robust and able to accurately predict plasmatic concentrations, thus enabling future PK/PD studies to establish the relative contribution of the combined efficiency of *trans*-resveratrol.