



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.

I. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS

En els darrers anys, s'ha aprofundit en el coneixement dels components no nutritius de la dieta, dels quals ara se sap que tenen propietats beneficioses per a la salut. Aquests components anomenats bioactius han rebut molta atenció per part de la comunitat científica. Un gran nombre d'investigacions *in vitro* i *in vivo* s'han dut a terme per esclarir l'eficàcia i els mecanismes pels quals actuen. Aquesta recerca continua per tal de revelar la farmacodinàmia, la farmacocinètica i la biotransformació dels components bioactius dels aliments en un intent de combinar la nutrició i la farmacologia.

Entre els compostos de la dieta àmpliament distribuïts a la natura, es troben els polifenols. Un dels més estudiats és el *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbè) i es troba en alguns aliments com ara el raïm, el vi, els cacauets i els nabius. És, precisament, sobre aquest polifenol que el Grup de Fisiologia i Fisiopatologia Nutricional del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona ha estat treballant durant els darrers anys per tal d'estudiar els seus efectes beneficiosos sobre la salut. Entre els resultats obtinguts, s'ha demostrat que aquest compost té capacitat apoptòtica i antiproliferativa en cultius cel·lulars HT29 de carcinoma de còlon humà (Juan *et al.*, 2008). També s'ha comprovat que el *trans*-resveratrol és absorbit a l'intestí prim per un mecanisme de difusió simple i retorna al lumen intestinal en forma de conjugats (Juan *et al.*, 2010). Aquesta baixa biodisponibilitat és causada per processos de metabolisme en fase II i III a nivell de l'enteròcit. Els enzims englobats a la fase II s'encarreguen de metabolitzar al *trans*-resveratrol produint els seus conjugats glucurònid i sulfat a dins de l'enteròcit per després retornar-los al lumen intestinal a través de les proteïnes transportadores ABC dins el que es coneix com a fase III.

A partir d'aquests resultats i en el marc del projecte titulat *Estudi de la biodisponibilitat del trans-resveratrol*, es van plantejar els següents objectius:

- I. *Posar a punt una tècnica per determinar el dihidroresveratrol en plasma de rata mitjançant HPLC.*

El dihidroresveratrol és un estilbenoide d'origen natural que també s'ha descrit com a derivat del *trans*-resveratrol que s'ha trobat a orina (Walle *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005), però del que no hi ha dades a plasma, tot i que sembla procedir de l'activitat metabòlica de la microbiota intestinal. Per tant, com a primer objectiu es va posar a punt una tècnica que permetés la seva identificació i quantificació en plasma.

- II. *Estudiar l'efecte de l'administració de trans-resveratrol en l'aparició de lesions preneoplàsiques a còlon induïdes mitjançant 1,2-dimetilhidrazina en rates.*

A causa de la baixa biodisponibilitat del *trans*-resveratrol, aquest es troba a majors concentracions a nivell intestinal, a on podria arribar a còlon per exercir l'activitat

anticancerígena descrita *in vitro* (Juan *et al.*, 2008). Per tant, es va avaluar l'efecte d'una administració diària oral de *trans*-resveratrol en un model animal en el qual s'indueixen lesions preneoplàstiques a còlon.

III. *Estudiar l'efecte de l'administració de trans-resveratrol en la colitis espontània de ratolí.*

Atès que el *trans*-resveratrol i els seus metabòlits són presents en el contingut intestinal i que s'ha demostrat que aquest polifenol té efecte antiinflamatori, es va avaluar l'efecte de l'administració diària de *trans*-resveratrol a ratolins genèticament modificats que desenvolupen de manera espontània colitis severa.

IV. *Avaluar la participació de les proteïnes ABC involucrades en la resistència a fàrmacs en l'absorció i distribució del trans-resveratrol.*

- La biodisponibilitat del *trans*-resveratrol ve condicionada per l'acció de les proteïnes ABC (Juan *et al.*, 2010a). Per tant, mitjançant l'ús de ratolins modificats genèticament es va estudiar la participació de la proteïna *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) en l'absorció i distribució del *trans*-resveratrol i els seus conjugats glucurònid i sulfat després d'una administració única en ratolins *Bcrp1^{-/-}*.
- Posteriorment, es va avaluar la participació de la glicoproteïna P (MDR1A) en l'absorció del *trans*-resveratrol després d'una administració única de *trans*-resveratrol en ratolins *Mdr1a^{-/-}*.

V. *Desenvolupar un model farmacocinètic del trans-resveratrol seguint una aproximació poblacional.*

Tot i que s'han realitzat diferents estudis de farmacocinètica clàssica del *trans*-resveratrol (Juan *et al.*, 2002; Baur i Sinclair, 2006) se sap que els models tradicionals tenen certes limitacions. És per aquesta raó que s'ha investigat la farmacocinètica del *trans*-resveratrol seguint una aproximació poblacional. La farmacocinètica poblacional pretén descriure el comportament farmacocinètic d'un fàrmac a partir d'un grup d'individus que representen una població. A diferència de la clàssica, l'aproximació poblacional permet determinar els paràmetres típics farmacocinètics a partir de mostres obtingudes en diferents individus, així com estimar millor la variabilitat interindividual i la residual (intraindividual i la mesura de l'error), i identificar el seu origen.

II. INTRODUCCIÓ

1. ESTILBENOIDES

Els estilbenoides són una família molt àmplia de compostos d'estructura fenòlica (Figura II.1.). Van ser aïllats per primera vegada el 1899 però no va ser fins el 1980 que van rebre el nom d'estilbenoides (Gorham, 1995). S'han trobat més de 1000 estilbenoides a les plantes i alguns d'ells s'han estudiat més específicament a causa de les seves propietats beneficioses per a la salut (Xiao *et al.*, 2008). Es classifiquen en 6 grups: estilbens, bibenzils, bisbibenzils, fenantrenoides, oligòmers d'estilbens i altres estilbenoides (Xiao *et al.*, 2008).

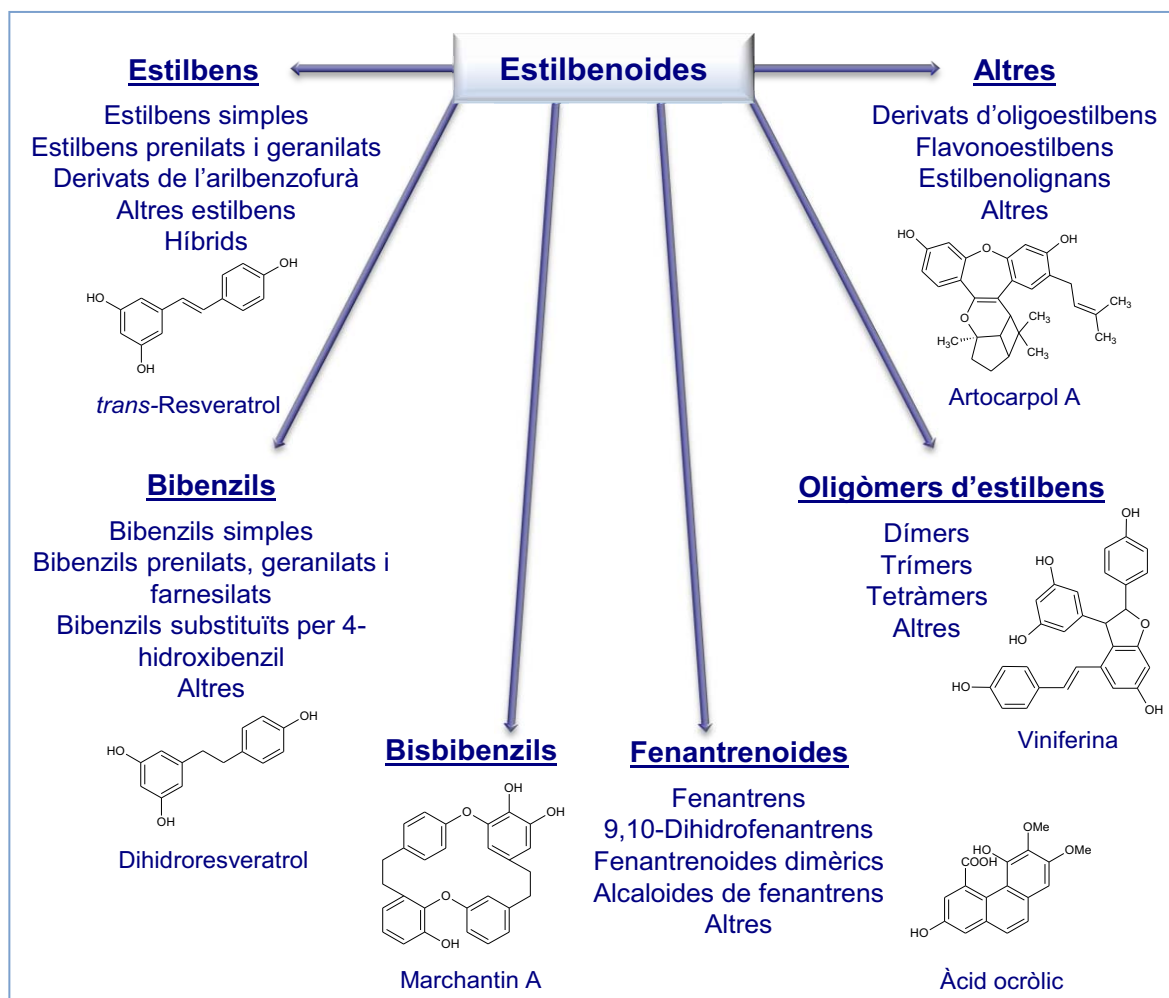


Figura II.1. Classificació de la família dels estilbenoides.

Els estilbenoides es sintetitzen per la via del fenilpropanoide a partir de la fenilalanina (Figura II.2.) compartint la primera part d'aquesta ruta amb els flavonoides (Gorham, 1995). Aquesta ruta s'inicia amb la conversió de la fenilalanina en àcid cinàmic mitjançant la fenilalanina amoni-liasa (PAL). L'àcid cinàmic és convertit en àcid 4-cumàric o àcid *p*-cumàric, mitjançant la cinamat 4-hidroxilasa (C4H). En algunes espècies, la PAL també té activitat tirosina amoni-liasa (TAL), convertint directament la tirosina en àcid 4-cumàric

(Jiang *et al.*, 2005). En el següent pas, l'àcid 4-cumàric és transformat en 4-cumaril-CoA mitjançant la 4-cumarat CoA-ligasa (4CL). El 4-cumaril-CoA és el punt central de la ruta fenilpropanoide. La formació d'estilbenoides a partir del 4-cumaril-CoA està controlada pels enzims estilbè sintasa i bibenzil sintasa, a diferència de la dels flavonoides que està controlada per la calcona sintasa (Kodan *et al.*, 2002).

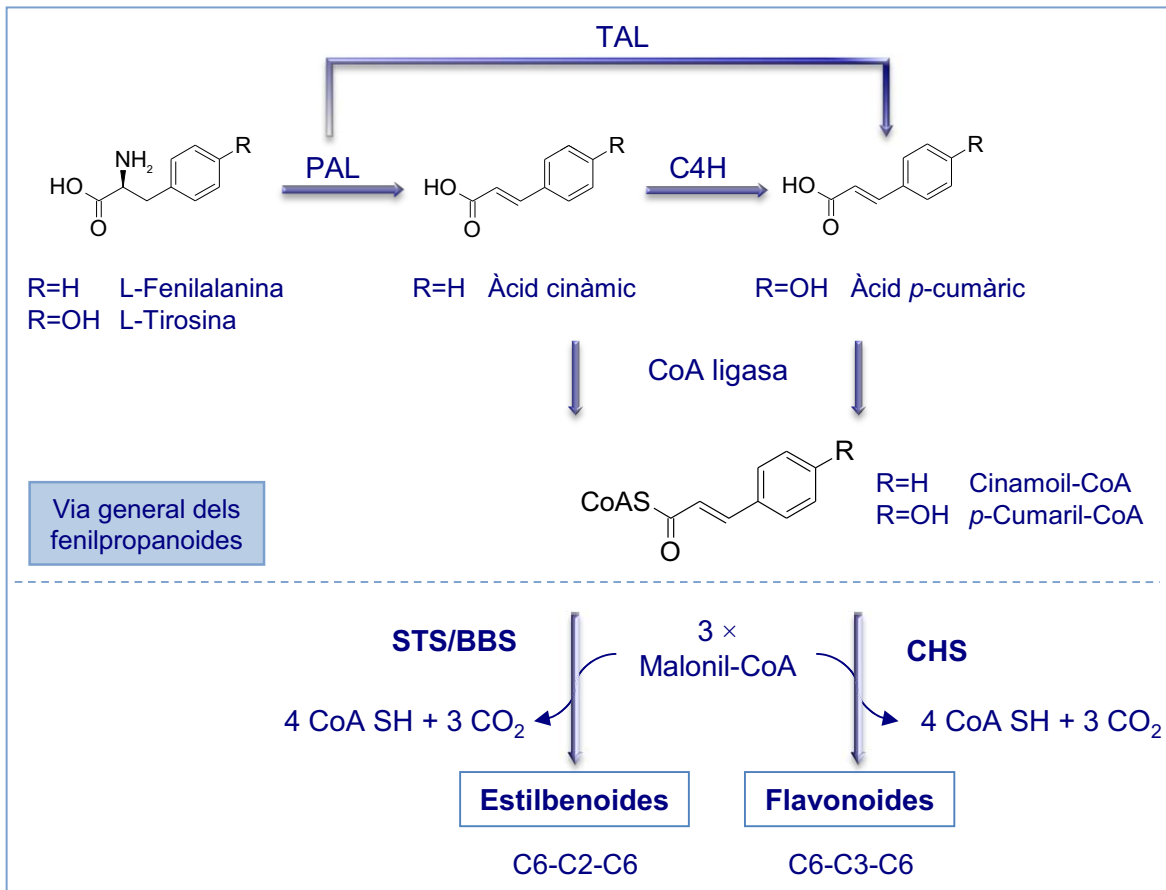


Figura II.2. Via del fenilpropanoide per a la formació d'estilbenoides i de flavonoides. PAL: fenilalanina amoni-liasa; TAL: tirosina amoni-liasa; C4H: cinamat 4-hidroxilasa; STS: estilbè sintasa; BBS: bibenzil sintasa; CHS: calcona sintasa.

Les plantes responen davant qualsevol lesió amb mecanismes de defensa que moltes vegades impliquen la producció de metabòlits secundaris que poden ser constitutius, també anomenats fitoanticipines, o induïbles, coneguts com fitoalexines (Pedras i Ahiahonu, 2005). Els estilbenoides són compostos que es sintetitzen *de novo* en resposta a una d'aquestes lesions i, per tant, es consideren fitoalexines (Xiao *et al.*, 2008).

A més a més, els estilbenoides a elevades concentracions poden inhibir la germinació de les llavors de les plantes si les condicions ambientals no són òptimes. De fet, en determinades espècies són capaços d'inhibir el creixement de la planta sencera. Aquest període de temps en el qual el creixement està inhibit es diu període de latència (Gorham, 1995).

2. *trans*-RESVERATROL

2.1. Característiques físiques i químiques

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbè) és un polifenol no flavonoide del grup dels estilbens. Presenta dos anells benzènics units per un pont etilè i tres grups hidroxil en les posicions 3, 5 i 4'. Existeixen dos isòmers d'aquest

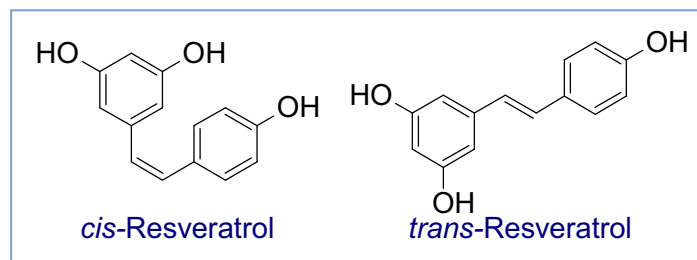


Figura II.3. Estructura molecular del *cis*-resveratrol i el *trans*-resveratrol.

polifenol, la forma *cis*- i la *trans*- (Figura II.3.). Aquesta última s'isomeritza en la forma *cis*- per acció de la radiació ultraviolada.

El *trans*-resveratrol és un pols blanc estable a condicions d'estabilitat accelerada d'un 75% d'humitat i 40°C de temperatura (Bertelli *et al.*, 1998). A més a més, les propietats d'absorció a l'ultraviolat (UV) del *trans*-resveratrol fan que tingui un espectre característic amb el màxim d'absorbància a 306 nm (Figura II.4.).

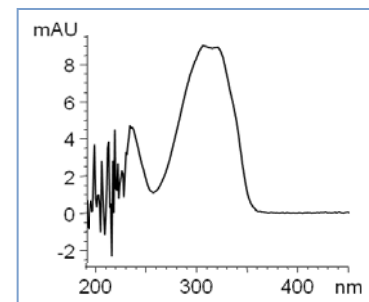


Figura II.4. Espectre d'absorbància del *trans*-resveratrol.

2.2. Fonts: plantes i aliments

El *trans*-resveratrol es troba en més de 70 espècies de plantes. A la natura, la síntesi d'aquest polifenol es realitza a partir de la fenilalanina a la via del fenilpropanoide. L'estilbè sintasa (STS) catalitza de forma específica la formació del *trans*-resveratrol

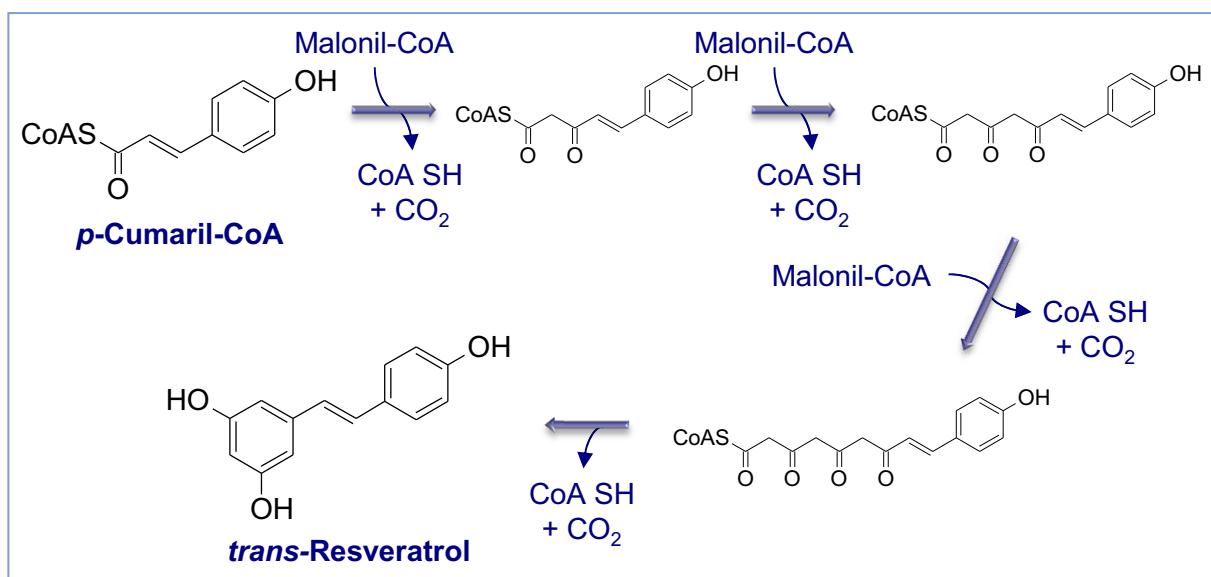


Figura II.5. Síntesi del *trans*-resveratrol per la via del fenilpropanoide a partir del *p*-cumaril-CoA mitjançant l'enzim estilbè sintasa.

(Figura II.5.) a partir del *p*-cumaril-CoA i tres molècules de malonil-CoA (Pervaiz i Holme, 2009).

La quantitat de *trans*-resveratrol produït a les plantes incrementa quan aquestes estan sotmeses a estrès ja sigui climàtic, per elevades concentracions d'ozó, radiació ultraviolada o infecció per fongs ja que aquest polifenol actua com a fitoalexina (Harikumar i Aggarwal, 2008). En canvi, el *trans*-resveratrol no és molt abundant en aliments i es troba en els cacauets, els festucs, mores, nabius i, principalment, el raïm i el vi (Halls i Yu, 2008). La pell del raïm conté uns 50-100 µg/g de *trans*-resveratrol, havent més concentració al raïm negre quan ha patit estrès, com per exemple a causa d'una infecció pel fong *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. La variabilitat que hi ha entre els diferents vins és elevada, des de 0,09 mg/L al Cabernet Sauvignon dels Estats Units d'Amèrica fins 13 mg/L al Pinot Noir australià (Bertelli i Das, 2009). La collita, els mètodes emprats per a l'obtenció del vi i la barreja de vins són també factors que poden fer variar la concentració de *trans*-resveratrol (Vrhovsek *et al.*, 1997; Bertelli i Das, 2009).

2.3. Antecedents del seu ús terapèutic

Les plantes que contenen *trans*-resveratrol s'han utilitzat en la medicina tradicional de cultures orientals com l'Índia, la japonesa i la xinesa. A la medicina tradicional índia, anomenada *Ayurveda*, s'utilitza un extracte, majoritàriament de *Vitis vinifera* L., conegut com *darakchasava*. Està descrit el seu ús des d'aproximadament el primer o segon segle dC. Aquest extracte s'utilitza pel tractament de diverses alteracions com pèrdua de gana, malalties cardiovasculars, anèmies, tumors, infestació per cucs i tuberculosi. També s'utilitza com a estimulant cardíac, antipirètic, diürètic i diaforètic (Paul *et al.*, 1999). Més endavant, des del segle 5 dC aproximadament, es té coneixença de l'ús del *Polygonum cuspidatum* Sieb. i Zucc. o polígon japonès com a terapèutic en la medicina tradicional japonesa i xinesa. Aquesta planta és més coneguda al Japó com a *kojo-kon* i a la Xina com a *Hu Zhang* (Vastano *et al.*, 2000). Les arrels seques d'aquesta planta s'utilitzen pel tractament de diverses malalties inflamatòries, hepatitis, tumors i diarrea (Fan *et al.*, 2009) i són una font molt important de *trans*-resveratrol (Vastano *et al.*, 2000).

Però no va ser fins el 1989 que el *trans*-resveratrol va adquirir importància com a possible compost per a un ús terapèutic. Aquest any es van donar a conèixer els resultats d'un estudi realitzat per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), el projecte MONICA, a on es va observar que l'índex de mortalitat a causa de malalties cardiovasculars era inferior a França que a altres països industrialitzats com ara els Estats Units o el Regne Unit. En canvi, el consum de grasses saturades i les concentracions de colesterol a sèrum així com altres factors de risc com la pressió arterial, l'índex de massa corporal i el consum de

tabac no eren inferiors als d'altres països (Renaud i de Lorgeril, 1992). Aquests resultats es van donar a conèixer com a "Paradoxa Francesa" i es va concloure que hi havia una relació inversa entre el consum de vi negre i la incidència de malalties cardiovasculars (Renaud i de Lorgeril, 1992). Aquell mateix any Siemann i Creasy van detectar el *trans*-resveratrol al vi negre i, tot remarcant la presència d'aquest compost en plantes utilitzades a la medicina tradicional oriental, van suggerir que l'efecte cardioprotector del vi podria ser degut a aquest polifenol. A partir d'aquest moment, es van incrementar els estudis destinats a esbrinar les possibles propietats beneficioses del raïm i el vi negre així com les del *trans*-resveratrol.

2.4. Propietats biològiques

Els efectes beneficioses per a la salut del *trans*-resveratrol són múltiples. La investigació de les possibles activitats d'aquest polifenol ha portat a la seva caracterització com a antiinflamatori, amb efecte sobre la funció reproductora masculina, efecte antienvelliment, cardioprotector, neuroprotector, antidiabètic, antiviral i anticancerigen (Penumathsa i Maulik, 2009).

2.4.1. Antiinflamatori

Aquest polifenol inhibeix l'alliberació de mediadors inflamatoris per part de macròfags i mastòcits, i de proteases i oxidants per part dels neutròfils (de la Lastra i Villegas, 2005). També regula l'alliberació de citocines proinflamatòries com ara el factor de necrosi tumoral α (TNF- α), interleucines 6 (IL-6) i 8 (IL-8) i, a més a més, és un potent inhibidor de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) i el factor de transcripció nuclear κ B (NF- κ B), per tant, afecta el metabolisme de l'àcid araquidònic i els eicosanoides (Kang *et al.*, 2009). Considerant que la inflamació crònica està implicada en moltes malalties com ara el càncer, la diabetis i els problemes cardiovasculars, pulmonars i neurològics, l'ús del *trans*-resveratrol pot ajudar a la seva prevenció.

2.4.2. Efecte sobre la funció reproductora masculina

La similitud estructural del *trans*-resveratrol amb el dietilestilbestrol i l'estradiol, juntament amb la seva capacitat moduladora dels sistemes de resposta a estrògens, ha portat a la seva classificació com a fitoestrogen (Gehm *et al.*, 1997). Aquest polifenol té activitat agonista/antagonista parcial de receptors d'estrògens (ER) i competeix amb l'estradiol pels ER en diferents tipus de línies cel·lulars (Gehm *et al.*, 1997). El 2005 va ser descrit per primera vegada que el *trans*-resveratrol és capaç d'incrementar el recompte d'espermatozous a través de l'estimulació de l'eix hipotalàmic-pituitari-gonadal en rates sanes (Juan *et al.*, 2005). També s'ha observat que protegeix l'esperma del dany en

l'ADN induït per benzopirè (Revel *et al.*, 2005) així com l'apoptosi causada per la isquèmia i la posterior reperfusió en casos de torsió testicular (Uguralp *et al.*, 2005).

2.4.3. Antienvelliment

Entre les activitats que se li atribueixen està la d'actuar sobre l'envelliment. S'ha observat que aquest polifenol és capaç d'imitar alguns processos que es produeixen en condicions de restricció calòrica mitjançant l'acció sobre les sirtuïnes (Howitz *et al.*, 2003). Les sirtuïnes són una família de proteïnes que s'han vinculat a la longevitat i els gens que les codifiquen són considerats gens antienvelliment ja que la seva activitat allarga el període de vida (Westphal *et al.*, 2007). Aquestes sirtuïnes afecten el metabolisme cel·lular regulant diferents gens i responen d'una manera epigenètica a factors ambientals (Kelly *et al.*, 2010). *In vitro*, s'ha observat que el *trans*-resveratrol té un efecte dependent de SIRT1 (acrònim anglès de *silent mating type information regulation 2 homolog 1*) en cèl·lules de mamífers (Csiszar *et al.*, 2009 i Fischer-Posovszky *et al.*, 2010, entre d'altres). *In vivo*, mitjançant l'acció sobre aquest gen també s'ha observat que aquest polifenol pot incrementar la longevitat d'algunes espècies, tot i que estudis en *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster* han resultat contradictoris (Bass *et al.*, 2007). A més a més, s'ha observat que, tot i que el *trans*-resveratrol és capaç de reduir la mortalitat en models animals associats a obesitat (Baur *et al.*, 2006). Els últims anys, però, s'ha plantejat la possibilitat que l'efecte del *trans*-resveratrol no es produeixi per una activació directe sobre les sirtuïnes (Pacholec *et al.*, 2010; Baur, 2010) ja que no té efecte en la supervivència en ratolins sans (Baur, 2010; Miller *et al.*, 2011).

2.4.4. Protecció cardiovascular

El *trans*-resveratrol té diferents maneres de produir un efecte cardioprotector sobre l'organisme. Aquest polifenol té activitat vasorelaxant mitjançant la modulació de vies de senyalització relacionades amb l'òxid nítric (NO). Aquest efecte és causat per la seva acció sobre la via del NO-cGMP (guanosina 3'-5'-monofosfat), augmentant l'expressió de les proteïnes òxid nítric sintasa induïda (iNOS) i endotelial (eNOS) i incrementant els nivells de cGMP en teixit vascular sa (Das i Maulik, 2006).

Per una altra banda, la seva acció com a antiagregant plaquetari també ha estat descrita. En suspensions de plaquetes humanes, el *trans*-resveratrol és capaç d'inhibir l'agregació plaquetària i, a més a més, estimula l'apoptosi (Lin *et al.*, 2009). Per tant, el *trans*-resveratrol podria ser un potencial terapèutic en pacients amb problemes de trombosi (coàgul a l'interior dels vasos sanguinis) o trombocitosi (presència d'un elevat nombre de plaquetes en sang) (Lin *et al.*, 2009).

A 1993, es va indicar que el *trans*-resveratrol inhibia l'oxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) humanes (Frankel *et al.*, 1993). També s'ha observat que el metabolisme dels lípids pot ser modificat pel *trans*-resveratrol, inhibint deposicions de colesterol i triglicèrids a fetge de rates (Arichi *et al.*, 1982). Per tant, això pot portar a la disminució del risc de patir malalties cardiovasculars ja que la hipercolesterolèmia i altres anomalies lipídiques són importants factors de risc.

2.4.5. Malalties neurodegeneratives

Hi ha diversos estudis *in vitro* i *in vivo* que demostren l'activitat neuroprotectora del *trans*-resveratrol. Una de les causes de les malalties neurodegeneratives és el dany produït a les neurones pels radicals lliures i l'estrès oxidatiu. Aquest polifenol ofereix protecció contra l'insult, atenua el dany oxidatiu i reverteix els dèficits cognitius (Hung *et al.*, 2010). En un model *in vivo* d'isquèmia cerebral, es va demostrar que el *trans*-resveratrol arribava a cervell a on protegia les neurones del dany oxidatiu i suprimia l'activació de les cèl·lules de la micròglia i els astròcits, per tant, oferia protecció front la neuroinflamació (Wang *et al.*, 2002). També s'ha vist que té efecte protector en altres malalties com l'Alzheimer, el Parkinson, la malaltia de Huntington i l'esclerosi amiotròfica lateral. *In vitro*, el *trans*-resveratrol redueix la secreció de β -amiloide i inhibeix la formació i l'extensió de fibril·les β -amiloïdes (Sun *et al.*, 2010). A més a més, al sistema nerviós central (SNC), s'ha trobat que la proteïna SIRT1 juga un paper molt important en el desenvolupament neuronal i la neuroprotecció (Pallàs *et al.*, 2009). La inducció de l'expressió de SIRT1 redueix la degeneració i mort neuronal en models animals d'Alzheimer i malaltia de Huntington. Per tant, el paper neuroprotector del *trans*-resveratrol no només està relacionat amb les seves propietats antioxidants sinó també amb la seva capacitat antiinflamatòria així com moduladora de les sirtuïnes (Brisdelli *et al.*, 2009).

2.4.6. Obesitat i diabetis

En obesitat l'activació de la proteïna SIRT1 per part del *trans*-resveratrol porta a la prevenció d'aquesta malaltia mitjançant la inducció del metabolisme mitocondrial oxidatiu i redueix la resistència a insulina en ratolins alimentats amb una dieta hipercalòrica (Dal-Pan *et al.*, 2010). També en ratolins obesos així com diabètics s'ha observat que el *trans*-resveratrol minimitza la hiperglucèmia i en rates obeses la dislipèmia (Dal-Pan *et al.*, 2010).

Per una altra banda, el *trans*-resveratrol és capaç d'inhibir la secreció d'insulina. Aquest polifenol inhibeix la via d'amplificació de la secreció d'insulina (Szkudelski, 2007) i té un efecte supressor de la insulina independent a l'activitat estrògena-antiestrògena. També permet canviar el metabolisme de la glucosa d'oxidació mitocondrial a anaeròbica a les

cèl·lules de l'illot pancreàtic i l'alliberació d'insulina quan no hi ha esdeveniments metabòlics que ho indiquin. A més a més, té la capacitat d'evitar la supressió de la secreció hormonal com a resultat de la inhibició directe de l'entrada de calci a través de canals voltatge-dependents (Pervaiz i Holme, 2009).

2.4.7. Efecte antiviral

S'ha demostrat que el *trans*-resveratrol és un potent antiviral enfront diferents tipus de virus ADN i ARN (Campagna i Rivas, 2010). El primer estudi relacionat amb la capacitat antiviral del *trans*-resveratrol va ser publicat a 1999. Es va demostrar que el resveratrol bloqueja la replicació vírica en la infecció pel virus de l'herpes simple tipus 1 (HSV-1) (Docherty *et al.*, 1999). A més a més, s'han observat efectes sobre el virus Varicella Zoster, HSV-2, el citomegalovirus humà, l'Eppstein-Barr, el poliomavirus i el virus de la grip, així com el virus de la immunodeficiència humana (VIH-1) que causa la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) (Campagna i Rivas, 2010). Els mecanismes cel·lulars implicats en l'activitat del *trans*-resveratrol no es coneixen bé, tot i que es creu que estan implicades el factor de transcripció nuclear p53, el NF-κB, la proteïna de la leucèmia promielocítica (PML) i SIRT-1 (Campagna i Rivas, 2010).

2.4.8. Propietats anticanceroses

A l'any 1997, Jang i col·laboradors van demostrar l'habilitat del *trans*-resveratrol per inhibir la carcinogènesi. Van veure que l'aplicació tòpica d'aquest polifenol reduïa el nombre de tumors a la pell en ratolins. A partir d'aquest estudi s'han desenvolupat molts treballs que han intentat descobrir el paper d'aquest compost en la prevenció i la terapèutica front el càncer i quins són els mecanismes cel·lulars i bioquímics implicats en aquests processos (Shukla i Singh, 2011; Namasivayam, 2011). A continuació es presenten els mecanismes proposats pels quals aquest polifenol actuaria com agent quimiopreventiu:

a) Inhibició de la COX i l'ornitina decarboxilasa (OD)

Hi ha evidències epidemiològiques que indiquen que la inhibició durant llargs períodes de COX redueix significativament el risc de desenvolupar molts càncers i la supressió del gen que codifica la COX-2 protegeix en casos de càncer colorectal en ratolins (Oshima *et al.*, 1996).

El *trans*-resveratrol redueix l'activitat total de la COX dels tumors i també a teixit normal *in vivo* mitjançant la inhibició selectiva de COX-1 i la reducció de COX-2 a nivell de l'ARNm (Subbaramaiah *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002; Khanduja *et al.*, 2004). *In vitro*, no inhibeix directament l'activitat de l'OD però *in vivo* redueix la seva expressió i evita la seva

inducció mediada per carcinògens (Afaq *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004). Aquesta OD s'ha associat amb diferents nivells de risc de càncer de còlon (Martinez *et al.*, 2003).

b) Inhibició de l'angiogènesi

L'angiogènesi és necessària per ajudar al creixement de tumors de més de 3 mm de diàmetre. Quan es dona una dosi sistèmica compresa entre 2,5 i 100 mg per kg de pes corporal de *trans*-resveratrol, aquest té un efecte inhibidor de la neovascularització induïda pel tumor (Kimura i Okuda, 2001; Tseng *et al.*, 2004). El *trans*-resveratrol és capaç d'inhibir l'angiogènesi mitjançant la supressió de l'acció del factor de creixement endotelial vascular (VEGF) en cèl·lules endotelials (Athar *et al.*, 2009). A més a més, la COX i l'OD promociónen l'angiogènesi i, per tant, la seva supressió a causa del resveratrol podria ser la raó dels efectes inhibitoris en la vascularització i el creixement del tumoral.

c) Efectes en el metabolisme de fàrmacs i xenobiòtics

El *trans*-resveratrol modula l'expressió i l'activitat de molts enzims implicats en el metabolisme de fàrmacs. *In vitro* inhibeix l'activitat enzimàtica de diversos citocroms P450 (CYP) (Yu *et al.*, 2003) i bloqueja la seva transcripció mitjançant la seva acció antagònica al receptor d'hidrocarbur d'aril (AhR) (Ciolino *et al.*; 1998; Casper *et al.*, 1999). Això suggereix que aquest polifenol pot reduir l'exposició de les cèl·lules als agents carcinògens. Però aquest efecte sobre els CYP podria donar problemes terapèutics ja que la inhibició d'aquests enzims podria alterar a la vegada la farmacocinètica d'altres fàrmacs.

També s'ha demostrat que el *trans*-resveratrol indueix l'expressió d'enzims de fase II (Cao i Li, 2004). I s'ha confirmat que en fetges de rates tractades amb *trans*-resveratrol hi ha una regulació per decrement dels gens que codifiquen els enzims de fase I i una regulació per increment dels de fase II (Hebbar *et al.*, 2005). Per tant, el *trans*-resveratrol podria prevenir l'activació de carcinògens a la vegada que augmentaria la capacitat de l'organisme per eliminar molècules perjudicials.

d) Alteracions en el cicle cel·lular i apoptosi

Un altre mecanisme pel qual el *trans*-resveratrol podria combatre la formació del tumor és aturant el cicle cel·lular i induint l'apoptosi. *In vitro* s'ha demostrat els efectes antiproliferatius i proapoptòtics d'aquest polifenol en línies cel·lulars tumorals (Aggarwal *et al.*, 2004; Juan *et al.*, 2008) i aquests han estat recolzats per la regulació per decrement de proteïnes del cicle cel·lular (Yu *et al.*, 2003; Reagan-Shaw *et al.*, 2004) i l'augment de l'apoptosi en models tumorals *in vivo* (Zhou *et al.*, 2005; Garvin *et al.*, 2006).

El mecanisme pel qual el *trans*-resveratrol és capaç d'induir l'apoptosi encara no està ben clar però s'ha vist que pot sensibilitzar diferents línies tumorals, però no fibroblasts humans normals, enfront l'apoptosi induïda pel TRAIL o lligand inductor d'apoptosi associat amb el factor de necrosi tumoral (Fulda i Debatin, 2004).

e) Efectes antioxidants

S'ha indicat que les espècies reactives de l'oxigen (ROS) tenen un paper important en la iniciació i la progressió del càncer a l'induir un dany directe de l'ADN i altres macromolècules (Kensler *et al.*, 1995; Gromadzińska i Wasowicz, 2000). Però les proves clíniques amb molècules antioxidants han donat resultats decebedors, això indica que els productes fitoquímics podrien tenir altres propietats més rellevants en la prevenció del càncer (Collins, 2005).

3. DIHIDRORESVERATROL

3.1. Característiques físiques i químiques

El dihidroresveratrol (5-[2-(4-hidroxifenil)etil]benzene-1,3-diol; 3,4',5-trihidroxibenzil) és un bibenzil d'estructura química pràcticament idèntica a la del *trans*-resveratrol però sense el doble enllaç alifàtic (Figura II.6.A). La diferència en l'estructura química dels dos compostos fa que el dihidroresveratrol presenti unes propietats d'absorció a l'UV diferents al *trans*-resveratrol i, per tant, el seu màxim d'absorbància és 276 nm, enlloc dels 306 nm característics per al *trans*-resveratrol. Els espectres d'absorbància d'ambdós compostos també són diferents (Figura II.6.B).

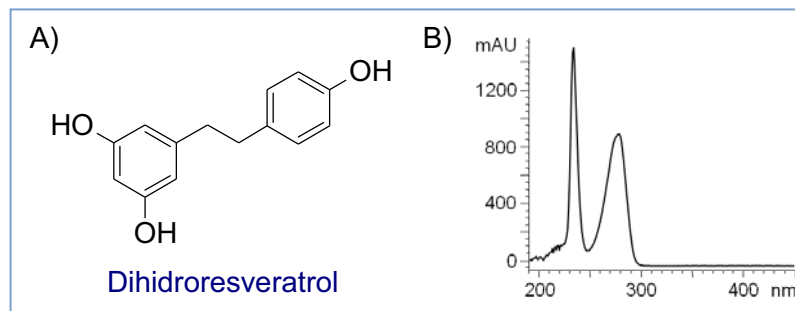


Figura II.6. Estructura del dihidroresveratrol (A) i espectre d'absorbància amb màxim als 276 nm (B).

3.2. Fonts

3.2.1. Plantes

A 1983, el dihidroresveratrol es va considerar una fitoalexina, present a la família *Orchidaceae* Juss. (Fritzemeier i Kindl, 1983), a *Cannabis sativa* L. (El-Feraly, 1984) i a la *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax (Adesanya *et al.*, 1989). Aquesta fitoalexina és induïda a les plantes en infeccions per fongs i ferides i la seva síntesi es produeix per la via dels

fenilpropanoides, igual que el *trans*-resveratrol, mitjançant l'enzim BBS, de la mateixa família que l'STS. Aquest enzim té com a principal substrat el dihidro-*m*-cumaril-CoA que, juntament amb 3 molècules de malonil-CoA, forma el 3,3',5-trihidroxibenzil, molècula pràcticament igual al dihidroresveratrol (Chong *et al.*, 2009).

Però en certes plantes, com ara *Cannabis sativa* L., el dihidro-*p*-cumaril-CoA també pot ser substrat d'aquest enzim donant com a producte el dihidroresveratrol (Figura II.7.) (Flores-Sánchez i Verpoorte, 2008). El dihidroresveratrol, a part de ser una fitoalexina, també és utilitzat a les plantes com a intermediari en la síntesi d'altres bibenzils o els 9,10-dihidrofenantrens.

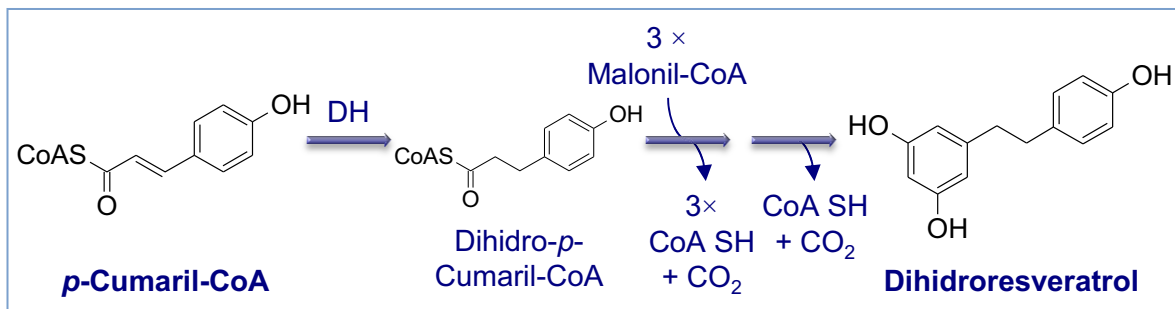


Figura II.7. Síntesi del dihidroresveratrol per la via del fenilpropanoide a partir del *p*-cumaril-CoA mitjançant l'enzim bibenzil sintasa. El pas de *p*-cumaril-CoA a dihidro-*p*-cumaril-CoA es dona mitjançant una deshidrogenasa (DH) no identificada fins ara.

3.2.2. Metabolisme del *trans*-resveratrol per la microbiota humana

El dihidroresveratrol va ser descrit per primer cop com a metabòlit del *trans*-resveratrol pel grup de Walle (2004). En aquest estudi es van administrar 25 mg de *trans*-resveratrol a voluntaris sans i es va trobar glucurònid i sulfat de dihidroresveratrol en orina, a més de glucurònid i sulfat de *trans*-resveratrol (Wang *et al.*, 2005). Es va descriure el dihidroresveratrol com a metabòlit format per la reducció del doble enllaç alifàtic de la molècula de *trans*-resveratrol, mitjançant un procés d'hidrogenació (Walle *et al.*, 2004). L'origen del dihidroresveratrol s'explica en base a que la microbiota intestinal catalitza la reducció del doble enllaç alifàtic de la molècula de *trans*-resveratrol. De fet, a 2009, es va estudiar el metabolisme que patia el *trans*-resveratrol per part de diferents bacteris associats tant als animals com als humans. *Eggerthella lenta* i *Bacteroides uniformis* produeixen, com a metabòlit principal del *trans*-resveratrol, el dihidroresveratrol (Jung *et al.*, 2009).

3.3. Propietats biològiques

El dihidroresveratrol no és una molècula àmpliament estudiada així com el *trans*-resveratrol. No obstant, la similitud estructural d'ambdós compostos fa que aquest bibenzil hagi estat objecte de recerca en els últims anys.

3.3.1. Antiinflamatori

Atès que la producció d'NO està implicada en diversos processos fisiològics i patològics com ara la inflamació aguda o crònica, s'ha estudiat l'activitat del dihidroresveratrol sobre aquesta producció. Així doncs, el dihidroresveratrol és capaç d'inhibir la producció d'òxid nítric en macròfags activats amb lipopolisacàrid (LPS) mostrant una activitat molt semblant a la del *trans*-resveratrol sota les mateixes condicions experimentals, i indicant que el doble enllaç no és necessari per a dur a terme la seva activitat (Kageura *et al.*, 2001).

3.3.2. Efecte sobre el potencial d'acció a les neurones

La inhibició de canals de potassi dependents de voltatge adquireix importància en neurones i cardiomiòcits, augmentant l'excitabilitat d'aquestes cèl·lules, així com de cèl·lules carcinògenes, inhibint la proliferació i suprimint l'activació cel·lular (Wulff *et al.*, 2009). Wanke i col·laboradors van observar que alguns estilbens incrementaven de manera selectiva i reversible la duració del potencial d'acció de les neurones promovent la despolarització i retardant la repolarització mitjançant la modulació d'aquests canals de potassi. Entre diversos estilbens, van observar que el dihidroresveratrol era capaç d'inhibir aquests canals de potassi dependents de voltatge, fins i tot, mostrant un efecte més elevat que el *trans*-resveratrol a la mateixa dosi (Orsini *et al.*, 2004).

3.3.3. Activitat antiespasmòdica

També s'ha demostrat que el dihidroresveratrol és un potent inhibidor de les contraccions espontànies de l'ili de cobai, fins i tot més potent que la papaverina, alcaloide de l'opi de coneguda activitat antiespasmòdica. Aquest efecte es creu que pot ser produït per una inhibició de la calmodulina, proteïna relacionada amb l'obtenció d'energia necessària per al procés de la contracció muscular (Hernández-Romero *et al.*, 2004).

3.3.4. Efecte tòxic

La toxicitat del dihidroresveratrol es va estudiar *in vitro* tant en un cultiu vegetal de *Lemna pausicostata* Hegelm. com en 4 línies cel·lulars diferents, dues línies de cèl·lules diferenciades de ronyó i fetge i dues de no diferenciades, normals i tumorals. Es va observar que aquest bibenzil no és tòxic (Hernández-Romero *et al.*, 2005).

3.3.5. Efecte anticancerigen

L'efecte anticancerigen del dihidroresveratrol també s'ha estudiat *in vitro*. Aquest bibenzil posseeix un efecte antiproliferatiu en cèl·lules canceroses de pròstata (Cardile *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2009) sent no citotòxic en cèl·lules no tumorals (Cardile *et al.*, 2005).

3.3.6. Activitat estrògena

Recentment, s'ha demostrat que el dihidroresveratrol té activitat estrògena. En la línia cel·lular MCF-7, cèl·lules de càncer de mama que es caracteritzen per tenir receptors d'estrógen, el dihidroresveratrol té un efecte proliferatiu a concentracions molt baixes (de 10^{-11} a 10^{-4} μM) (Gakh *et al.*, 2010). Aquest efecte es reverteix quan les cèl·lules es tracten amb tamoxifè, conegut antagonista estrógen. A més a més, no s'observa proliferació en cèl·lules que no expressen aquests receptors (Gakh *et al.*, 2010). No obstant, a dosis més elevades (de 10^{-2} a 1 μM) aquest compost té efecte citotòxic tant a les cèl·lules dependents d'hormones com les resistents (Gakh *et al.*, 2010).

4. FARMACOCINÈTICA

L'absorció es defineix com el pas d'una molècula des del lloc d'administració fins al lloc de mesura dintre de l'organisme. El paràmetre farmacocinètic més útil que caracteritza aquest procés d'absorció és la biodisponibilitat (Benedetti *et al.*, 2009).

L'intestí prim és la part del tracte gastrointestinal a on té lloc majoritàriament el procés d'absorció dels nutrients i dels fàrmacs administrats per via oral. Per tant, l'intestí prim és objecte d'estratègies fàrmaco-terapèutiques per al control de l'absorció i del perfil plasmàtic de la concentració al llarg del temps, així com de l'exposició sistèmica de diferents compostos (Nakamura *et al.*, 2008).

Els compostos per arribar a la circulació sistèmica s'enfronten a dos obstacles: (i) una barrera bioquímica a causa de la degradació enzimàtica i, (ii) una barrera física originada a la bicapa lipídica (Banarjee *et al.*, 2004). Així doncs, l'absorció intestinal de molècules es pot fer principalment a través de dues vies: la paracel·lular i la transcel·lular. La ruta paracel·lular (Figura II.8.A) és una via aquosa a través de l'espai intercel·lular que hi ha entre les cèl·lules adjacents a l'epiteli intestinal. Aquest espai està restringit mitjançant les unions estretes que es troben a la part més apical de les cèl·lules (Cano-Cebrián *et al.*, 2005). El fet que aquesta via ocupi només el 0,1% de la superfície de l'epiteli intestinal i que la presència d'aquestes unions estretes limiten el pas de les substàncies, fa que la contribució d'aquesta ruta en l'absorció intestinal sigui molt petita en condicions fisiològiques (Cano-Cebrián *et al.*, 2005).

La via transcel·lular, en canvi, implica el pas d'una substància a l'interior de l'enteròcit a través de la membrana apical i, posteriorment, passa a sang a través de la membrana basolateral (Figura II.8.B-H). Aquest pas es pot donar per difusió passiva a través de la bicapa lipídica a favor de gradient o bé mitjançant canals específics o transportadors (transport mediat específic). Aquest transport mediat quan requereix energia (trifosfat d'adenosina o ATP) directe o indirecte s'anomena transport actiu primari o secundari,

respectivament. En cas de no necessitar energia, es defineix com a transport facilitat i depèn del gradient de concentració així com d'una proteïna transportadora. L'absorció d'un compost es pot veure limitada per transportadors de membrana, que retornen, en part, el compost a la llum intestinal una altra vegada, o bé pel metabolisme intestinal. Posteriorment, els metabòlits poden passar a sang o retornar a la llum intestinal mitjançant transportadors. També la transcitosi, que engloba l'endocitosi i l'exocitosi, juga el seu paper en l'absorció de compostos. Finalment, pot donar-s'hi la via contrària, és a dir, el pas d'una molècula des del torrent sanguini cap a la llum intestinal (Figura II.8.I).

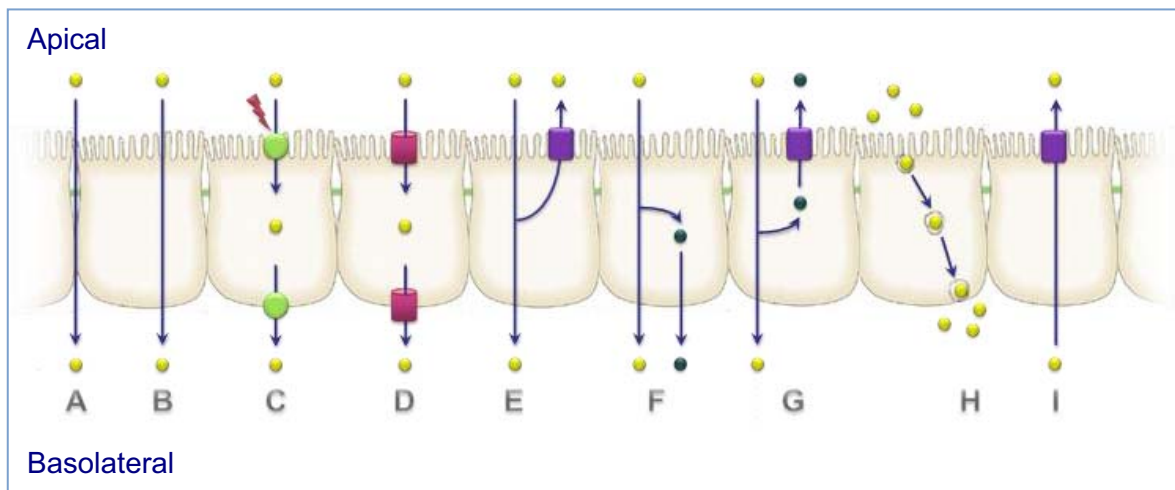


Figura II.8. Absorció de compostos a través de l'epiteli intestinal (modificat de Chan *et al.*, 2004 i Balimane *et al.*, 2006). A) Ruta paracel·lular. Via transcel·lular: B) difusió passiva; C) transport mediat; D) transport facilitat; E) retorn a la llum intestinal de compostos mitjançant transportadors de membrana; F) metabolisme a l'enteròcit i absorció de metabòlits; G) retorn a la llum intestinal de metabòlits mitjançant transportadors de membrana; i, H) transcitosi. I) Pas d'una molècula des del torrent sanguini a la llum intestinal.

4.1. Metabolisme i eliminació intestinal

La funció de l'intestí proporciona a l'organisme un marc a on el metabolisme constitueix una barrera important en el pas de diferents substàncies. Adquireix encara més importància quan es parla de xenobiòtics, és a dir compostos aliens a l'organisme, d'entre els quals es troben, per exemple, els fàrmacs o molècules naturals com el *trans*-resveratrol i el dihidroresveratrol. Tot i que el fetge és generalment l'òrgan amb una activitat metabòlica major, els enteròcits de l'epiteli intestinal són potencialment importants i es poden considerar d'una gran influència en el metabolisme, activitat i efecte dels xenobiòtics (Thelen i Dressman, 2009).

L'eliminació dels xenobiòtics a l'intestí es fa mitjançant un conjunt de reaccions, globalment denominades de biotransformació, en les quals es modifica de forma més o menys complexa l'estructura química dels xenobiòtics per augmentar la seva hidrosolubilitat i així facilitar la seva expulsió. El procés de biotransformació es divideix en tres etapes o fases a on intervenen diferents enzims metabòlics que donen lloc a

reaccions de fase I i II, i els transportadors de membrana que porten a la sortida de xenobiòtics o els seus metabòlits dels enteròcits i s'engloben dins la fase III. No obstant, aquest últim procés d'eliminació no requereix l'ús de totes les reaccions de biotransformació, ja que a vegades només són necessàries les de fase I o les de fase II.

Aquests enzims metabòlics així com els transportadors intestinals tenen molta importància en l'absorció intestinal, el metabolisme, l'eliminació de l'organisme i de l'efecte tòxic dels xenobiòtics (Muntané, 2009). A l'intestí, els transportadors de la membrana basolateral regulen l'acumulació intracel·lular de compostos i els enzims i els transportadors de la membrana apical modulen la concentració cel·lular mitjançant el metabolisme i l'excreció, respectivament. Habitualment, l'excreció és irreversible però l'intestí és capaç de reabsorbir aquests compostos així com els seus metabòlits (Pang *et al.*, 2009). En general, aquests processos modulen la quantitat total dels compostos i dels seus possibles metabòlits que tenen accés a la circulació portal i, en conseqüència, poden afectar les seves cinètiques i, finalment, els seus efectes (Sergent *et al.*, 2008).

4.1.1. Reaccions de fase I

Les reaccions de fase I són catalitzades per un grup d'enzims que es troben tant al citosol com al reticle endoplasmàtic de les cèl·lules. Sota la denominació de fase I s'engloben processos químics de diferent naturalesa, principalment reaccions d'oxidació, hidròlisi i, menys freqüentment, reducció (Levsen *et al.*, 2005).

Els sistemes d'enzims implicats en la fase I tenen la funció d'introduir en el substrat un àtom d'oxigen provinent de l'oxigen molecular (oxigenases de funció mixta). Aquest metabolisme oxidatiu pot donar lloc a una activació o inactivació farmacològica, una eliminació facilitada o a l'addició de grups reactius per a la seva conjugació a la fase II (Hines i McCarver, 2002). Hi ha diferents famílies d'enzims que s'encarreguen de dur a terme aquestes reaccions de fase I com les amino-oxigenases, els CYP i les deshidrogenases (DH).

4.1.2. Reaccions de fase II

Mitjançant les reaccions de fase II, les substàncies polars (habitualment producte de les reaccions de fase I) pateixen una conversió a substàncies hidròfiles per a ser més fàcilment eliminades pels transportadors. Els compostos o els seus productes metabòlics produïts per les reaccions de fase I són combinats amb compostos endògens molt hidrosolubles anomenats agents conjugants. Aquestes reaccions són catalitzades per transferases o conjugases, com ara les uridindifosfatglucuronidotransferases (UGT), sulfotransferases (ST), glutatió S-transferases, metiltransferases i N-acetiltransferases (Sergent *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2009).

4.1.3. Reaccions de fase III

Els transportadors de membrana juguen un paper molt important en l'eliminació dels xenobiòtics. Tot i que s'engloben dins del que es coneix com a reaccions de fase III, en aquest procés de l'eliminació no s'altera la forma química de la molècula a transportar. A l'intestí, la majoria dels transportadors de membrana pertanyen a les famílies de les proteïnes les SLC (acrònim anglès de *Solute Carrier*) (Nakamura *et al.*, 2008) i les ABC (acrònim anglès d'*ATP binding cassette*).

4.1.3.1. Proteïnes transportadores ABC

Els transportadors de membrana dependents d'ATP o transportadors ABC constitueixen una superfamília de proteïnes que actuen com a transportadors actius primaris. Es troben pràcticament a tots els éssers vius amb una estructura bastant conservada indicant que tenen un paper important en la funció cel·lular. Aquestes proteïnes són capaces de transportar diferents compostos com ions metàl·lics, pèptids, aminoàcids, sucres i un gran nombre de molècules hidrofòbiques i metabòlits a través de la membrana plasmàtica així com a través de les membranes intracel·lulars (Huls *et al.*, 2008). A més a més, s'encarreguen de limitar l'exposició sistèmica i penetració a teixits de certs substrats mitjançant l'excreció de compostos a fetge, intestí i ronyó; reduint l'absorció intestinal de xenobiòtics; i disminuint la penetració de compostos des de la sang a diferents teixits a través de barreres importants com la barrera hematoencefàlica o la placenta.

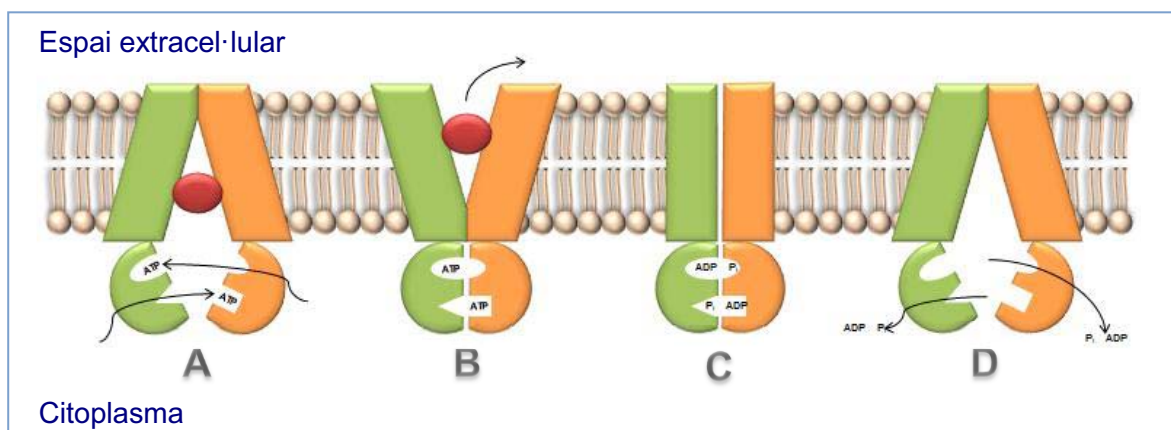


Figura II.9. Representació esquemàtica de la unió d'una molècula (el·lipse vermella) amb un transportador ABC. Els polígons representen els dominis transmembrana (TMD) i els semicercles són els dominis d'unió a nucleòtids (NBD). La unió de la molècula al transportador i posteriorment la unió de 2 ATP als NBD (A) comporta un canvi de conformació que permet l'obertura de la cavitat a l'exterior de la cèl·lula, expulsant la molècula (B). La hidròlisi del trifosfat d'adenosina (ATP) als NBD porta a un nou canvi de conformació (C) i a la subseqüent alliberació del difosfat d'adenosina (ADP) fins arribar a la conformació de repòs del transportador (D) (Procko *et al.*, 2009).

L'estructura dels transportadors ABC es basa en dos dominis transmembrana (TMD) que s'encarreguen del transport del substrat i, al citoplasma, dos dominis d'unió a nucleòtids (NBD) que permeten la hidròlisi de l'ATP (Locher, 2009) (Figura II.9.). Aquesta estructura

es pot trobar en una sola proteïna formant el que es coneix com un transportador complet o en dos proteïnes per separat, conegut com mig transportador. En aquest últim, el transportador té un TMD i un NBD i requereix la formació d'un homodímer o heterodímer per a poder realitzar la seva funció (Dawson i Locher, 2006).

Majoritàriament, allò que es coneix de la funció dels transportadors ABC és degut a les malalties genètiques de tipus mendelià associades a aquestes proteïnes. Aquestes alteracions genètiques donen lloc a processos patològics com, per exemple, la fibrosi quística (causada per una mutació al gen del transportador ABCC7, un canal d'ió clorur) o l'adrenoleucodistrofia (causada per una mutació al gen del transportador ABCD1) (Dean, 2009). Cal destacar que les cèl·lules cancerígenes poden ser resistents als citotòxics a través de diferents mecanismes entre els quals s'hi troba la secreció de fàrmacs anticancerosos mitjançant transportadors ABC (Hall *et al.*, 2009).

Existeixen 48 gens ABC al genoma humà i estan repartits en diferents cromosomes. Els transportadors es poden agrupar en subfamílies en funció de la conservació de la seqüència d'aminoàcids del domini NBD. Per tant, els eucariotes tenen 8 subfamílies (de la A a la H) i 7 d'aquestes es troben al genoma humà (de la A a la G) (Robey *et al.*, 2009). Les subfamílies són les següents (Dean i Annilo, 2005):

- Subfamília ABCA: és el grup que ha patit un major índex de duplicació i pèrdua genètica durant l'evolució.
- Subfamília ABCB: els gens d'aquests transportadors són idèntics a tots els mamífers, excepte el gen de la glicoproteïna P (P-gp; *ABCB1*) que es troba duplicat al genoma dels rosegadors. Això suggereix que aquests transportadors són molt importants i conserven funcions similars a tots els mamífers. A nivell intestinal, trobem expressada la P-gp a la membrana apical dels enteròcits.
- Subfamília ABCC: són transportadors complets i tenen diverses funcions. Són transportadors d'ions i receptors cel·lulars i també s'encarreguen de la secreció de toxines. El grup més ampli d'ABCC són les MRP (acrònim anglès de *Multidrug Resistance Proteins*), d'entre les quals a l'enteròcit trobem la MRP2 a la membrana apical i la MRP1 i la MRP3 a la membrana basolateral.
- Subfamílies ABCD, ABCE i ABCF: el gens que codifiquen aquestes proteïnes es troben conservats a tots els peixos i mamífers examinats. Els ABCD es troben involucrats en el metabolisme d'àcids grassos de cadena llarga i els ABCE i ABCF en la síntesi de proteïnes.
- Subfamília ABCG: comprèn 5 mitjos transportadors. El ABCG2 o BCRP (acrònim anglès de *Breast Cancer Resistance Protein*) va ser identificat degut a la seva sobreexpressió en cultius cel·lulars resistents a fàrmacs. Per tant, té un paper molt

important en el transport de diferents compostos fora de les cèl·lules i regula el transport de fàrmacs i toxines als teixits. També s'encarrega de l'efluxió de compostos a nivell intestinal ja que està situada a la membrana apical dels enteròcits. La resta de transportadors d'aquesta família estan relacionats amb el transport de colesterol i altres esterols.

- Subfamília ABCH: es troba en insectes però no en mamífers, plantes, cucs o llevats i no se sap la seva funció.

4.2. METABOLISME HEPÀTIC

Aquella quantitat de xenobiòtic que evita el metabolisme intestinal i arriba a sang passa pel fetge a on continua metabolitzant-se. Aquesta pèrdua que es dona a l'intestí i al fetge es coneix com a efecte de primer pas (Benedetti *et al.*, 2009). En el metabolisme hepàtic de xenobiòtics s'inclouen totes les fases de biotransformació prèviament comentades (reaccions d'oxidació, hidròlisi i reducció així com reaccions de conjugació i acció dels transportadors de membrana). Ara bé, la proporció de dosi que es metabolitza i la via per la qual té lloc aquest procés pot canviar amb la quantitat administrada (Roberts i Buckley, 2007).

Els metabòlits formats al fetge i aquells que arriben del metabolisme intestinal són habitualment massa polars per a moure's per difusió passiva així que requereixen transport mediat per a la seva excreció a través de la membrana apical (membrana canalicular hepàtica) cap a la bilis o a través de la membrana basolateral cap a la sang sinusoïdal (Zamek-Gliszczyinsky *et al.*, 2006)

4.3. DISTRIBUCIÓ

La distribució és un procés en el qual els compostos es mouen des de la sang cap als teixits i òrgans i a l'inrevés. Aquest procés es dona concomitantment amb l'absorció i l'eliminació (Roberts i Buckley, 2007). El paràmetre farmacocinètic primari que relaciona la concentració plasmàtica d'un compost amb la quantitat d'aquest compost a l'organisme és el volum de distribució. Aquest paràmetre pot donar una idea del tipus de distribució del compost (Benedetti *et al.*, 2009). En farmacocinètica, la distribució s'explica millor si es parla de compartiments. El compartiment central correspon a la sang i els teixits a on es distribueix el compost són compartiments perifèrics. A mesura que el nombre de compartiments perifèrics augmenta el número de fases durant l'eliminació també incrementa. Aquesta distribució també es veurà afectada per la presència de transportadors presents en els diferents teixits (Roberts i Buckley, 2007).

4.4. ELIMINACIÓ DE L'ORGANISME

Un cop un compost ha arribat a la circulació sistèmica i ha estat distribuït a l'organisme, els diferents mecanismes d'eliminació prenen importància. Els ronyons i el fetge són generalment considerats els òrgans excretors més importants, mentre que l'excreció per altres rutes (aire expirat, saliva, llàgrimes, suor, etc.) és petita. El paràmetre farmacocinètic que reflecteix i quantifica la capacitat de l'organisme per eliminar els compostos quan han arribat a la circulació sistèmica es diu aclariment. L'aclariment es defineix com el volum de sang o plasma completament depurat d'un compost per unitat de temps (Benedetti *et al.*, 2009).

4.4.1. Excreció renal

El ronyó té un paper molt important en l'eliminació de nombrosos xenobiòtics hidrofílics, així com metabòlits. L'excreció renal d'un compost està principalment controlada per tres processos a la nefrona, la unitat funcional del ronyó. Primer es produeix la filtració glomerular a la càpsula de Bowman, després la secreció tubular i, finalment, la reabsorció tubular (Benedetti *et al.*, 2009).

4.4.2. Excreció biliar

El fetge té la capacitat d'eliminar compostos endògens i exògens a causa de la presència d'un gran nombre de sistemes enzimàtics i un sistema excretor que porta a la formació de la bilis. Per tant, l'aclariment hepàtic engloba tant l'activitat metabòlica com l'excreció biliar (Benedetti *et al.*, 2009). A més a més, la bilis formada al fetge i que és excretada a l'intestí pot donar lloc a la recirculació enterohepàtica.

La recirculació enterohepàtica es refereix al procés pel qual un compost o els seus metabòlits són excretats per via biliar i després reabsorbits a nivell intestinal. Aquest fet pot allargar i variar l'eliminació d'un compost reduint el seu aclariment aparent (Roberts i Buckley, 2007).

4.4.3. Flora bacteriana

S'ha suggerit que la microbiota intestinal té la capacitat d'actuar com un òrgan amb un potencial metabòlic igual o superior al del fetge. De fet, els tres possibles efectes farmacològics a conseqüència de l'actuació bacteriana sobre els xenobiòtics són la inactivació, l'activació o la toxicitat dels metabòlits resultants (McConnell *et al.*, 2008).

La microbiota intestinal pot hidrolitzar glicòsids, glucurònids, sulfats, amides i èsters. També duu a terme reaccions de reducció, trencament d'anells, desmetilacions i deshidroxilacions. La hidròlisi de glicòsids o glucurònids porta habitualment a metabòlits

que són més actius que els compostos pare, i amb la degradació i la transformació d'aglicones es pot arribar a compostos més o menys actius (Lampe i Chang, 2007).