



# 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](http://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](http://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](http://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.

## **IV. DISCUSSIÓ GENERAL**

---

Dins del concepte actual de nutrició els aliments a més d'aportar els nutrients suficients per assolir els requeriments metabòlics, han d'aportar un increment del benestar, tant físic com mental i una reducció del risc de malalties com ara el càncer, l'obesitat, l'osteoporosis, la hipertensió i les malalties cardiovasculars, entre d'altres (Diplock *et al.*, 1999). Aquest nou concepte de nutrició ha estimulat la recerca sobre els efectes fisiològics i els beneficis per a la salut dels components, tant nutritius com no nutritius dels aliments (Roberfroid, 2002). Aquesta recerca també s'ha vist reforçada per estudis epidemiològics a diferents països que han demostrat que la ingesta moderada de vi pot conferir efectes beneficiosos no només sobre la mortalitat produïda per malalties cardiovasculars i certs càncers, sinó també sobre altres causes (Renaud i Lorgeril, 1992, Renaud *et al.*, 1999, Gronbaek *et al.*, 2000). L'anomenada Paradoxa Francesa s'ha relacionat amb els polifenols que es troben presents en quantitats elevades al vi negre, entre els que s'hi troba el *trans*-resveratrol (Soleas *et al.*, 1997).

Amb la identificació en el vi negre del *trans*-resveratrol a l'any 1992 i coincidint amb la Paradoxa Francesa les primeres investigacions realitzades amb aquest estilbè es van circumscriure a l'àmbit de la malaltia cardiovascular. A l'any 1997, es va descriure l'efecte anticancerígen del *trans*-resveratrol en ratolins, al demostrar que era capaç d'inhibir els processos cel·lulars associats a la iniciació, la promoció i la progressió tumoral (Jang *et al.*, 1997). A partir d'aquí les publicacions relacionades amb el *trans*-resveratrol han anat incrementant, fet que ha permès conèixer les seves potencials aplicacions clíniques (Vang *et al.*, 2011). Així, estudis realitzats en animals d'experimentació indiquen que aquest polifenol presenta activitat anticancerígena, cardioprotectora, moduladora de la inflamació, neuroprotectora i protectora front l'obesitat i la diabetis tipus 2 (Vang *et al.*, 2011). En conseqüència, el *trans*-resveratrol és un compost nutracèutic d'interès i que modificant el seu contingut en la dieta i/o el seu consum com a suplement pot ajudar a prevenir determinades alteracions.

Conèixer en detall la biodisponibilitat de les substàncies bioactives és important atès que el seu consum pot comportar interaccions que es poden establir amb qualsevol de les vies de metabolització tant dels propis aliments com dels medicaments. Per exemple, la ingesta simultània d'un compost nutracèutic amb un fàrmac que es metabolitza per la mateixa via pot induir un increment o una disminució de les concentracions plasmàtiques del fàrmac modificant la seva activitat i, per tant, el seu efecte terapèutic (Ohnishi i Yokohama, 2004). El grup de Fisiologia i Fisiopatologia Nutricional ha estat treballant durant els darrers anys per tal d'estudiar la biodisponibilitat i els efectes beneficiosos sobre la salut de compostos nutracèutics, com ara el *trans*-resveratrol. Així, s'han estudiat els processos implicats en l'absorció intestinal. A jejú i ili de rata el *trans*-resveratrol entra a

l'enteròcit per difusió passiva, a on és ràpida i àmpliament conjugat en glucurònid i sulfat mitjançant les UGT i les sulfotransferases. Part d'aquests conjugats són absorbits arribant al torrent sanguini i una altra part són retornats a la llum intestinal a través de les proteïnes transportadores BCRP i MRP2 (Juan *et al.*, 2010a). Aquest estudi mostra el paper limitant que presenta l'intestí prim en l'absorció del *trans*-resveratrol explicant, en part, la baixa biodisponibilitat observada quan és administrat per via oral (Juan *et al.*, 2002a). Ara bé, l'ampli metabolisme observat pel *trans*-resveratrol, no només a nivell d'enteròcit, sinó també a nivell sistèmic, també contribueix a disminuir les concentracions plasmàtiques d'aquest estilbè. Així, s'ha observat que un minut després de l'administració intravenosa de 15 mg/kg ja es va detectar a plasma el conjugat glucurònid que estava present en un 33%, i del sulfat en un 8%, sent el *trans*-resveratrol el 59% (Juan *et al.*, 2010b). Aquests estudis constitueixen el punt de partida de la present tesi, ja que malgrat el coneixement de que es disposa sobre la biodisponibilitat del *trans*-resveratrol encara queden preguntes sense resposta pel que fa a la completa identificació i quantificació dels metabòlits, el paper que tenen les proteïnes ABC, així com la modelització farmacocinètica tenint en compte no només el *trans*-resveratrol sino també els seus conjugats.

Pel que fa als metabòlits del *trans*-resveratrol, actualment se sap que aquest polifenol també es convertit a dihidroresveratrol, atès que s'ha detectat el glucurònid i sulfat de dihidroresveratrol en orina en humans (Walle *et al.*, 2004) i el dihidroresveratrol i el sulfat en orina a rata (Wang *et al.*, 2005). Donat que la reducció del doble enllaç del *trans*-resveratrol sembla que es produeix per la microbiota intestinal, ha de ser absorbit a l'epiteli del còlon per arribar a sang i ser finalment excretat en orina, però no hi havia dades d'aquest bibenzil a plasma. De fet, el dihidroresveratrol és un metabòlit del *trans*-resveratrol poc conegut, i es pot atribuir, en part, a l'absència d'estàndard pur comercialment disponible. Això dificulta el desenvolupament de mètodes sensibles per mesurar-lo en plasma i en fluids corporals. En conseqüència, el primer objectiu de la tesi va ser validar un mètode per la detecció del dihidroresveratrol a plasma. Es va partir d'una tècnica d'extracció emprada per la determinació a plasma del *trans*-resveratrol i dels seus conjugats (Juan *et al.*, 2010a). La principal diferència entre els dos mètodes va radicar en la detecció dels compostos per l'HPLC ja que el màxim d'absorbància del dihidroresveratrol és de 276 nm mentre que el del *trans*-resveratrol és a 306 nm. Els resultats obtinguts a la validació indiquen que el mètode és fiable, reproduïble i fàcil d'aplicar a mostres biològiques. L'extracció en fase sòlida del dihidroresveratrol de plasma amb un cartutx C18 és apropiat per a la seva mesura, ja que evita la pèrdua de l'analit i té una màxima sensibilitat amb la mínima manipulació. Les extraccions en fase

sòlida amb diferents solvents també han estat utilitzades en mostres d'orina a on s'ha detectat dihidroresveratrol (Walle *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). No obstant, els autors d'aquests estudis no van validar el mètode ni van quantificar el dihidroresveratrol o els seus conjugats.

Recentment, Ortuño *et al.*, (2010) han validat una tècnica que permet la determinació simultània del *trans*- i *cis*-resveratrol i també del dihidroresveratrol a plasma i a orina humana, mitjançant una extracció líquid-líquid seguida de l'anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses que els va permetre obtenir una sensibilitat més elevada. No obstant, van obtenir una recuperació del 63% mentre que amb el mètode desenvolupat les recuperacions van ser superiors al 95%. No indiquen resultats a plasma perquè van validar el mètode per al dihidroresveratrol un cop ja havien analitzat les mostres. En canvi, sí que detecten la presència del dihidroresveratrol a orina de 24 hores, després de la ingesta de 250 mL de vi.

Un cop validat el mètode es va aplicar a la mesura del dihidroresveratrol en plasma de rates Sprague-Dawley que van ser administrades amb una dosi única de 60 mg/kg. Aquest compost es va detectar a plasma, indicant per una banda que la idoneïtat de la metodologia i per un altre que aquest bibenzil és absorbit a nivell intestinal. També es va observar que sofreix metabolisme de fase II, al detectar els seus conjugats glucurònid i sulfat, els quals s'han identificat per HPLC-MS. Als 30 minuts després de l'administració oral les concentracions de glucurònid i sulfat de dihidroresveratrol són 38 i 6 vegades més grans, respectivament, que las del compost pare.

Tot i que hi ha força informació respecte a les concentracions plasmàtiques dels conjugats del *trans*-resveratrol (Cottart *et al.*, 2010), se sap poc del dihidroresveratrol després de l'administració oral del *trans*-resveratrol. Això pot ser degut, en part, al fet que la pèrdua del doble enllaç alifàtic del *trans*-resveratrol porta a un metabòlit amb diferents propietats d'absorció UV que les del compost pare. Per una banda, aquest compost presenta una menor absorbància a l'UV que el *trans*-resveratrol i, per tant, la seva presència podria passar inadvertida a baixes concentracions. A més a més, el màxim d'absorció UV ha canviat dels 306 nm del *trans*-resveratrol als 276 nm del dihidroresveratrol. Així doncs, quan les mostres per a la detecció de *trans*-resveratrol es monitoritzen a 306 nm és possible que el dihidroresveratrol no es detecti. Boocock *et al.*, (2007) va indicar precisament la incapacitat per a detectar el dihidroresveratrol en les seves mostres ja que no s'havien optimitzat ni les condicions de l'HPLC ni del sistema LC-MS/MS per a la seva detecció. Per últim, indicar també que la diferència en els espectres a l'UV obtinguts amb diode-array del *trans*-resveratrol i del dihidroresveratrol podrien haver dificultat la detecció d'aquest últim.

En resum, el mètode d'HPLC descrit té la sensibilitat, l'exactitud i la reproductibilitat apropiada per a l'anàlisi del dihidroresveratrol en investigacions preclíniques. A més a més, l'anàlisi per HPLC és capaç de separar els metabòlits del dihidroresveratrol i quan s'acobla a l'espectrometria de masses proporciona una eina molt útil en estudis de metabolisme.

Els resultats obtinguts prèviament al grup de Fisiologia i Fisiopatologia Nutricional després de perfusions intestinals durant 30 minuts de 25 µM de *trans*-resveratrol van indicar que el 28% d'aquest compost roman a la llum intestinal, i desapareix del lumen en un 72% (Juan *et al.*, 2010a). D'aquest percentatge que ha passat la membrana apical de l'enteròcit, hi ha un 42% que retorna a la llum intestinal en forma de glucurònid i un 12% en forma de sulfat. Aquests valors suggereixen que la part de l'organisme que s'exposa a concentracions més elevades de *trans*-resveratrol és l'intestí, afavorint així l'activitat quimiopreventiva descrita *in vitro* per al càncer de còlon (Juan *et al.*, 2008). En conseqüència, l'objectiu que es va establir en el segon capítol de la tesi va ser estudiar l'activitat anticancerígena del *trans*-resveratrol front de lesions preneoplàstiques induïdes per DMH en còlon de rata. El càncer colorectal és una de les principals causes de mort en homes i dones als països occidentals, i és habitualment letal quan es diagnostica en fases avançades de progressió (Ferlay *et al.*, 2010). Es creu que aspectes mediambientals estan involucrats en la carcinogènesi de còlon, incloent la dieta. Fins a un 80% dels càncers colorectals esporàdics, per tant, es podrien prevenir (Cummings i Bingham, 1998). La dieta i l'estil de vida estan relacionats amb l'etiologia del càncer de còlon a través d'un excés de consum d'energia, juntament amb una ingesta inadequada de substàncies protectores com els micronutrients, la fibra i els compostos fitoquímics (Watson, 2006).

L'efecte quimiopreventiu del *trans*-resveratrol es va avaluar en un model animal en el qual s'indueïen lesions preneoplàstiques a còlon. Per estudiar el càncer colorectal s'utilitzen models animals que, tot i no ser perfectes, aporten molta informació (Reddy, 2004). El càncer de còlon induït en animals, al igual que en humans, progressa en etapes, freqüentment caracteritzat per lesions intermèdies, amb mutacions i delecions en gens reguladors claus, que poden acabar evolucionant fins a un tumor (Reddy, 2004). En aquest procés de carcinogènesi s'ha identificat una sèrie de lesions preneoplàstiques que poden ajudar a la detecció dels carcinomes en estadis inicials. De les lesions preneoplàstiques trobades, en primer terme es van identificar els FCA (Bird, 1987). Posteriorment, es van descobrir els FDM en el còlon de rates tractades amb AOM, metabòlit carcinogen de la DMH (Caderni *et al.*, 2003).

En primer lloc, es va establir el model animal més adient per a l'estudi de l'eficàcia com a preventiu de càncer de còlon del *trans*-resveratrol. Alhora d'optimitzar les condicions experimentals d'inducció de lesions preneoplàstiques es van tenir en compte el número d'FCA que es produeixen quan s'augmenta el nombre de dosis de carcinogen. Es va observar com tres dosis de DMH provocava l'aparició de més del triple de FCA que si s'administraven dues dosis. Però el valor del recompte a mateixes dosis i igual temps d'espera variava en funció dels investigadors (Verghese *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2007). Quan s'administren dues injeccions de 16 mg/kg d'AOM i s'esperen 8 setmanes després de l'última injecció, el número d'FCA al còlon pot variar entre 150 i 300 (Verghese *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2007). Durant la posta a punt del model animal, el nombre d'FCA observat va ser similar als estudis precedents. Per aquesta raó es va considerar que l'administració de tres dosis de 20 mg/kg i un temps d'espera de 4 setmanes era adequat per a l'estudi de l'efecte preventiu de compostos nutracèutics.

Un cop establertes les condicions per induir el model animal, es va aplicar a l'estudi de l'activitat quimiopreventiva del *trans*-resveratrol. Per aquesta raó es van establir 3 grups de rates, el grup control (no carcinogen, solvent), el grup DMH (carcinogen, solvent) i el grup resveratrol (carcinogen, resveratrol). L'administració del *trans*-resveratrol va començar una setmana abans de la primera injecció amb DMH, de manera que s'ha avaluat així l'efecte preventiu en el càncer de còlon. Els resultats obtinguts indiquen que l'administració repetida de 60 mg/kg durant 49 dies disminueix la formació d'FCA. En el grup tractat amb el polifenol s'observa una reducció de la formació de lesions al còlon en aproximadament un 50% respecte al grup que va rebre DMH i ciclodextrina. Aquest efecte del resveratrol ja havia estat investigat per altres grups però les condicions experimentals no van ser les mateixes que les utilitzades en la present memòria ja que els temps d'espera i el nombre d'injeccions va ser superior (Tessitore *et al.*, 2000; Sengottuvelan *et al.*, 2006). El grup de Sengottuvelan *et al.* (2006) va administrar 15 injeccions de 20 mg/kg de DMH i una dosi de 8 mg/kg de resveratrol a rates Wistar i un temps d'espera de 15 setmanes. Aquests investigadors van observar una reducció entre el 50 i 70% de FCA a còlon. Els resultats obtinguts són comparables als del nostre estudi però en aquest cas només s'han administrat tres injeccions de carcinogen, el temps d'espera ha estat de 4 setmanes i la dosi de *trans*-resveratrol de 60 mg/kg.

En la present memòria també s'ha avaluat si es podia relacionar la reducció d'FCA induïda pel *trans*-resveratrol amb un segment en concret del còlon. Però s'observa que aquesta disminució es dona tant al segment medial com al distal. Per tant, es manté la regionalització de les lesions a on el segment distal és el que té més FCA seguit del medial. En el segment proximal no s'observen FCA. Quan s'avalua la multiplicitat dels

FCA, no s'observen diferències entre grups ja sigui a còlon sencer com si s'observa per segments, obtenint una multiplicitat d'aproximadament 1,9. Aquests resultats no concorden amb la literatura prèvia a on s'han observat reduccions del 50% en la multiplicitat dels FCA (Tessitore *et al.*, 2000; Sengottuvelan *et al.*, 2006). Però cal dir que el temps d'espera després de l'última injecció en el present estudi és molt inferior al d'altres estudis i, per tant, és normal que la multiplicitat que s'observa sigui inferior. En aquest cas el temps és de 4 setmanes i el d'altres estudis és superior a les 10 setmanes afavorint una major evolució i creixement dels FCA i, per tant, és més fàcil observar un efecte en la multiplicitat de les lesions (Tessitore *et al.*, 2000; Sengottuvelan *et al.*, 2006).

S'ha realitzat també el recompte d'FDM que són lesions preneoplàstiques amb caràcter més displàstic que els FCA i, per tant, aporten una informació més acurada de l'efecte anticancerígen de diferents compostos (Caderni *et al.*, 2003), en aquest cas del *trans*-resveratrol. Els resultats obtinguts indiquen que el nombre total d'FDM es veu reduït aproximadament en un 50%, un valor semblant a l'observat en el recompte d'FCA. Quan s'analitza la multiplicitat dels FDM a còlon tampoc s'observen diferències entre els grups, tal com també succeïa en la multiplicitat dels FCA. Però en aquest cas, sí que s'ha observat una disminució de la multiplicitat al segment distal del grup resveratrol respecte al grup DMH. Aquesta disminució de la multiplicitat es dona al segment que té una major freqüència d'aparició de tumors a rates quan s'indueixen amb DMH (Rodrigues *et al.*, 2002) indicant que el resveratrol pot tenir la capacitat de ralentir aquesta aparició de tumors. Això concorda amb un estudi realitzat en rates a on l'administració diària de 8 mg/kg de *trans*-resveratrol disminueix l'aparició de tumors al còlon (Sengottuvelan *et al.*, 2006).

Els resultats obtinguts indiquen que el *trans*-resveratrol disminueix l'aparició de lesions preneoplàstiques sense efectes adversos. Donat que per obtenir els efectes quimiopreventius, cal una ingesta diària a llarg termini i, per això, la manca de toxicitat és una consideració important. S'ha observat que la dosi de 60 mg/kg de polifenol durant 49 dies no afecta a l'evolució del pes corporal de les rates al llarg de l'experiment. Aquests resultats concorden amb un estudi de toxicitat realitzat en rates durant 28 dies a les quals es va administrar diàriament 300 mg/kg de *trans*-resveratrol, i en el qual no es van observar canvis en el pes corporal respecte al control (Crowell *et al.*, 2004). Tampoc s'han observat diferències en les magnituds hematològiques i bioquímiques estudiades, entre cap dels grups estudiats. Aquests resultats concorden amb altres estudis realitzats amb *trans*-resveratrol a on l'administració diària de 20 mg/kg del polifenol durant 28 dies en rates no produïa modificacions en les magnituds hematològiques (Juan *et al.*, 2002b).



En un altre estudi en el que es va administrar la mateixa dosi durant 90 dies tampoc es van observar alteracions (González-Pons, 2005).

Per poder relacionar la presència del *trans*-resveratrol a còlon amb el seu efecte quimiopreventiu, es va posar a punt un mètode d'extracció líquid-líquid per detectar aquest compost. Els resultats mostren que el mètode és adequat per a l'extracció, la identificació i la quantificació del *trans*-resveratrol i els seus metabòlits, atès que es va obtenir una recuperació del 98%, bona precisió i sensibilitat adequada. Un cop el mètode va ser establert, es va aplicar a les mostres de contingut intestinal obtingut 24 hores després de l'última administració oral de 60 mg/kg de *trans*-resveratrol durant 49 dies. Els resultats mostren que aquest compost va arribar a còlon juntament amb els seus metabòlits. El dihidroresveratrol va ser el component majoritari, amb concentracions 446 vegades superior a les del *trans*-resveratrol, tot i que també es va trobar glucurònid i sulfat del *trans*-resveratrol. Això indica que probablement la microbiota intestinal estigui també implicada en el metabolisme del *trans*-resveratrol i, més concretament, en la formació del bibenzil en administracions de llarga durada. Els conjugats venien de l'enteròcit després de la seva extrusió cap a la llum intestinal (Sabolovic *et al.*, 2006; Juan *et al.*, 2010a). A més a més, la circulació enterohepàtica pot afectar la concentració d'aquests compostos al còlon (Marier *et al.*, 2002). Tot i que aquests conjugats es creu que són farmacològicament inactius i excretats a orina i bilis, la deconjugació s'ha descrit a l'intestí, alliberant el compost pare (Sakamoto *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2009). En conseqüència, el glucurònid i el sulfat podrien actuar com a pro-fàrmacs al còlon, tal i com s'ha demostrat pels conjugats sulfat de metilprednisolona i prednisolona. L'últim s'ha desenvolupat per alliberar el corresponent glucocorticoide al cec per al tractament de la MII (Kon *et al.*, 2009).

La concentració del *trans*-resveratrol a còlon s'ha mesurat en mostres tant de teixit cancerós com normal procedent d'un assaig clínic en el que s'ha administrat diàriament 0,5 i 1 g de *trans*-resveratrol durant 8 dies a 20 pacients amb càncer colorectal (Patel *et al.*, 2010). En aquest estudi, es va trobar *trans*-resveratrol i 5 conjugats, resveratrol-3-O-glucuronid, resveratrol-4'-O-glucuronid, resveratrol-3-O-sulfat, resveratrol-4'-O-sulfat, resveratrol sulfat glucurònid i resveratrol disulfat. Aquests autors no han mesurat el dihidroresveratrol. Les concentracions més elevades que van obtenir per el *trans*-resveratrol a teixit sa van ser de 18,6 i 674 nmol/g per les dosis de 0,5 i 1,0 g, respectivament. En canvi van observar valors més baixos en les zones pròximes als tumors (8,33 i 94,1 nmol/g, per les dosis de 0,5 i 1,0 g, respectivament).

El fet que a contingut de còlon es trobés tant el *trans*-resveratrol glucurònid com el sulfat confirmen els resultats obtinguts a l'estudiar l'absorció intestinal del *trans*-resveratrol en

els que es va observar l'extrusió dels conjugats del *trans*-resveratrol a través de les proteïnes MRP2 i BCRP (Juan *et al.*, 2010a). Per això, seguidament es va estudiar el paper de les proteïnes ABC emprant ratolins knockout per la proteïna BCRP per comprovar la contribució d'aquest transportador en la biodisponibilitat i distribució en teixits del *trans*-resveratrol i els seus conjugats.. L'ús de ratolins modificats genèticament que no expressen el transportador BCRP1 és una eina útil per a l'estudi de la funció *in vivo* d'aquesta proteïna (Vlaming *et al.*, 2009). Així es van avaluar, les concentracions de *trans*-resveratrol i els seus metabòlits 10 i 30 minuts després de l'administració oral de 60 mg/kg en el contingut intestinal, l'intestí prim, el plasma, el fetge, el ronyó, el pulmó, el cor i el cervell en ratolins modificats i no modificats genèticament.

El metabolisme que pateix el *trans*-resveratrol als enteròcits es veu clarament als 10 minuts després de l'administració oral de 60 mg/kg, ja que el glucurònid i el sulfat són trobats al teixit intestinal així com a la llum intestinal a ambdós grups. S'observa una reducció significativa de l'efluxió cap al contingut intestinal en els ratolins *Bcrp1<sup>-/-</sup>* als quals la secreció de glucurònid està inhibida en un 70% i la del sulfat en un 95% més que en els ratolins control. Els resultats demostren que la BCRP1 és majoritàriament responsable de l'excreció intestinal del conjugat sulfat i, en menor mesura, del glucurònid. Aquests resultats concorden amb estudis previs en aquests ratolins modificats a on l'excreció dels conjugats glucurònid i sulfat de la 4-metilumbeliferona (Adachi *et al.*, 2005) i del sulfat del minoxidil (Enokizono *et al.*, 2007) es veia reduïda quan mancava l'expressió de la proteïna BCRP1. En els nostres experiments, l'efluxió d'ambdós metabòlits no va ser totalment eliminada en els ratolins *Bcrp1<sup>-/-</sup>* atès que també són substrat d'altres transportadors com la MRP2, tal i com s'ha vist prèviament en rates (Maier-Salamon *et al.*, 2008; Juan *et al.*, 2010a). Les concentracions decreixents de glucurònid i sulfat en el contingut intestinal de ratolins *Bcrp1<sup>-/-</sup>* no es poden atribuir a una disminució de les sulfotransferases i UDP-glucuronosiltransferases intestinals a causa de l'absència del transportador en els ratolins *Bcrp1<sup>-/-</sup>* ja que prèviament s'ha demostrat que no hi ha canvis en els enzims intestinals (Enokizono *et al.*, 2007).

També es van avaluar els nivells plasmàtics de *trans*-resveratrol després de l'administració oral de 60 mg/kg. L'àrea sota la corba (AUC) dels conjugats del polifenol era superior en els ratolins knockout respecte els control, fet que corrobora que aquests conjugats són transportats per la BCRP1. El mateix patró ja s'ha descrit per altres substrats transportats per aquesta proteïna (Van Herwaarden *et al.*, 2003; Enokizono *et al.*, 2007). El major increment d'AUC en els ratolins *Bcrp1<sup>-/-</sup>* correspon al sulfat, això implica una major afinitat de la BCRP1 per aquest conjugat, tal i com han destacat altres autors (Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006; Enokizono *et al.*, 2007). El fet que l'AUC del

*trans*-resveratrol en els ratolins *Bcrp1*<sup>-/-</sup> no augmenta indica que no és transportat per la BCRP1 confirmant resultats previs obtinguts en el nostre grup (Juan *et al.*, 2010a).

Al fetge, la BCRP1 s'ha descrit com un mediador de l'excreció biliar de diferents compostos i els seus metabòlits. No obstant, no s'observen diferències entre grups per al *trans*-resveratrol i el glucurònid en aquest òrgan. El fet que el conjugat glucurònid no s'acumuli al fetge es pot atribuir a la implicació de la MRP2 en l'efluxió, tal i com s'ha vist en rates prèviament (Maier-Salamon *et al.*, 2008). En canvi, en els ratolins *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, la concentració de sulfat és més gran a 10 minuts que als ratolins control, probablement a causa de la major afinitat de la BCRP1 pels sulfats que pels glucurònids (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006). A més a més, aquesta major concentració de sulfat als animals *Bcrp1*<sup>-/-</sup> es veu reflectida a plasma a on s'observa un pic també als 10 minuts.

El ronyó és l'òrgan amb més concentració tant de *trans*-resveratrol com de conjugats als ratolins *Bcrp1*<sup>-/-</sup>. Aquest òrgan és precisament a on l'expressió de ARNm de la BCRP1 és més elevada (Tanaka *et al.*, 2005). L'absència de BCRP1 a la membrana apical de les cèl·lules tubulars porta a l'acumulació dels conjugats al ronyó. Els nostres resultats són consistents amb els mostrats pel grup del Dr. Borst els quals observaren una disminució en l'excreció dels conjugats de *trans*-resveratrol en orina en aquells ratolins que no expressaven el transportador BCRP1 (van de Wetering *et al.*, 2009).

La presència del *trans*-resveratrol i els seus conjugats a pulmó ja s'ha demostrat en ratolins i rates (Vitrac *et al.*, 2003; Sale *et al.*, 2004; Juan *et al.*, 2010b). És important mencionar que el sulfat no s'ha detectat en els ratolins control, mentre que sí es troba present en els animals *Bcrp1*<sup>-/-</sup>, confirmant l'elevada afinitat d'aquest transportador per aquest conjugat. Les concentracions de *trans*-resveratrol a cor també s'han determinat prèviament en rates (Abd El-Mohsen *et al.*, 2006) i ratolins (Vitrac *et al.*, 2003) però en aquests estudis no es van tindre en compte els conjugats. El glucurònid és l'únic conjugat que es pot detectar en aquest òrgan, trobat en concentracions més elevades que el compost pare.

La distribució en teixits del *trans*-resveratrol ens va portar a analitzar el cervell ja que la BCRP1 està present a la barrera hemato-encefàlica restringint el pas de diferents compostos (Vlaming *et al.*, 2009). Els nostres resultats mostren que aquest polifenol és capaç de travessar la barrera hemato-encefàlica, tot i que la seva concentració és menor que la trobada en altres teixits. Aquests resultats corroboren les observacions prèvies en ratolins i rates (Vitrac *et al.*, 2003; Sale *et al.*, 2004; Juan *et al.*, 2010b). Així doncs, la contribució de la BCRP1 és petita ja que hi ha concentracions similars de glucurònid i sulfat en els ratolins control i els *Bcrp1*<sup>-/-</sup>.

En resum, la biodisponibilitat i la distribució tissular del *trans*-resveratrol és el resultat d'una interacció complexa entre transportadors i enzims a diferents teixits. D'aquests transportadors, s'ha pogut demostrar que la P-gp no intervé en la disponibilitat oral del *trans*-resveratrol. En canvi, la BCRP no només limita l'absorció encarregant-se de l'extrusió dels conjugats glucurònid i sulfat a l'enteròcit sinó que també afecta la seva distribució en teixits.

Finalment, es va plantejar com a darrer objectiu de la tesi l'anàlisi farmacocinètic de les concentracions plasmàtiques no només del compost pare, sino també dels conjugats glucurònid i sulfat. Aquestes dades han estat modelitzades mitjançant una aproximació poblacional. La farmacocinètica clàssica només permet analitzar les concentracions plasmàtiques respecte del temps i totes les dades s'han d'extreure del mateix animal. En canvi, la modelització poblacional, que es realitza mitjançant la utilització del programa d'efectes mixtes NONMEM, descriu el comportament farmacocinètic mitjà d'un fàrmac a partir d'un grup d'individus que representen una població. Per tant, a diferència de la clàssica, l'aproximació poblacional és capaç de determinar els paràmetres típics farmacocinètics a partir de mostres obtingudes en diferents individus, així com estimar millor la variabilitat interindividual i la residual, que comprèn la intraindividual i la mesura de l'error, i identificar el seu origen. Una de les principals característiques de la farmacocinètica poblacional és que permet analitzar dades escasses, tret freqüent en estudis amb animals. A més a més, permet incloure covariables en l'anàlisi farmacocinètic com el pes corporal o la dosi, de manera que es poden fer subgrups dins de la població que poden exhibir diferents propietats farmacocinètiques respecte de la mitjana de la població. Amb tot això, la farmacocinètica poblacional proporciona una visió global del comportament farmacocinètic del fàrmac i, a la vegada, permet individualitzar la dosi per obtenir el màxim de benefici i/o la mínima toxicitat.

Aquest tipus de modelització es realitza de manera seqüencial fins a trobar el model més complet que permeti descriure les concentracions plasmàtiques. D'entrada, s'exploren les dades de les quals es disposen fins aconseguir un model estructural bàsic. En una segona etapa, es tornen a explorar per tal d'incloure aquelles covariables que puguin donar un millor ajust del model bàsic per obtenir el final. Per acabar, s'avalua la robustesa del model final mitjançant simulacions i d'altres anàlisis per tal d'esclarir si és coherent amb els valors plasmàtics mesurats. Finalment, el model es valida aplicant-lo a dades reals alienes a les utilitzades en la modelització o mitjançant més simulacions.

Pel que fa al *trans*-resveratrol, malgrat que s'han realitzat estudis de farmacocinètics amb anterioritat (Juan *et al.*, 2002a; Baur i Sinclair, 2006), aquest s'han dut a terme mitjançant una aproximació clàssica, i no han inclòs els conjugats. Per aquests motius es va

modelitzar les concentracions plasmàtiques del *trans*-resveratrol, del glucurònid i dels sulfat seguint l'aproximació poblacional. Primerament, es van analitzar les dades obtingudes després de les administracions intravenoses per tal d'aconseguir un model base. El millor model farmacocinètic va ser el format per tres models bicompartimentals, un per cada compost, però units entre ells. Posteriorment, es van incloure els resultats experimentals després de les administracions orals. D'aquesta manera, es van poder establir tots aquells paràmetres farmacocinètics excepte els relacionats amb el procés d'absorció. Així doncs, es va establir que l'eliminació del *trans*-resveratrol es produeix seguint un procés cinètic de primer ordre convertint-se en glucurònid i sulfat. La formació d'aquests conjugats va ser pràcticament igual, un 54% del *trans*-resveratrol es va transformar en glucurònid, la resta en sulfat. Aquests conjugats s'eliminen de l'organisme seguint una combinació de processos de primer ordre i cinètica de Michaelis-Menten. Aquests dos processos estan implicats en l'excreció tan biliar com renal i els resultats mostren concordança amb els mecanismes d'eliminació dels conjugats de *trans*-resveratrol descrits prèviament tant en el present treball (Alfaras *et al.*, 2010) com en la literatura (van de Wetering *et al.*, 2009). A més a més, tal i com s'havia observat en l'estudi amb els ratolins que no expressen BCRP1 (Alfaras *et al.*, 2010), amb aquest model es va demostrar l'elevada distribució en teixits que presenta el *trans*-resveratrol ja que el volum de distribució descrit al model és molt més elevat que el volum d'aigua total a la rata.

Pel que fa a les concentracions plasmàtiques del *trans*-resveratrol mostren una baixa biodisponibilitat pel *trans*-resveratrol, que concorden amb altres valors indicats a la literatura (Walle, 2011). Quan les dades obtingudes després de les administracions intravenosa i oral es van analitzar seguint una anàlisi no compartimental, es va detectar que l'àrea sota la corba de les dades no era proporcional a la dosi administrada, observant una reducció en la del *trans*-resveratrol a major dosi sobretot quan l'administració era oral. Aquest fet ja s'havia observat en estudis anteriors (Boocock *et al.*, 2007). Així mateix, es van trobar unes cinètiques d'absorció i metabolisme elevades tant pel *trans*-resveratrol com pel glucurònid. De fet, Maier-Salamon *et al.* (2011) han demostrat recentment que la glucuronidació hepàtica en rata i ratolí pateix autoinducció, és a dir, segueix una cinètica de Hill a diferència de la de Michaelis-Menten com es dona al gos o, fins i tot, la d'inhibició que succeeix en microsomes hepàtics humans. En concordança amb els resultats obtinguts, en el model desenvolupat es va demostrar que el pas limitant era probablement l'absorció, ja que es va poder incloure la dosi com a covariable al model. Es va observar que a major dosi administrada la biodisponibilitat del *trans*-resveratrol es veia reduïda, de 0,420 a la dosi de 2 mg/kg fins a 0,060 a la dosi de

20 mg/kg per a una rata de 0,25 kg de pes corporal. En conseqüència, es formava una major quantitat de glucurònid, corroborant el comportament no lineal que s'havia observat en l'anàlisi no compartimental de les dades. No obstant, el sulfat no es va poder incloure en el procés d'absorció a causa de les baixes concentracions determinades a sang. Això es podria atribuir a una menor sulfatació en el metabolisme de la rata en comparació amb la glucuronidació (Walle, 2011).

Amb referència a la via d'administració, cal remarcar que les concentracions observades pel *trans*-resveratrol així com pels seus conjugats glucurònid i sulfat després de l'administració oral del polifenol eren més reduïdes que les observades després de l'administració intravenosa. Això és atribuïble a l'elevat metabolisme que es produeix als enteròcits, així com a l'acció de les proteïnes ABC que es troben a la membrana apical i que s'ha demostrat que redueixen la biodisponibilitat del *trans*-resveratrol (van de Wetering *et al.*, 2009; Alfaras *et al.*, 2010; Juan *et al.*, 2010b).

Finalment, es van realitzar les anàlisis de validació del model i la seva capacitat predictiva demostrant que el model és robust. La representació de les dades individuals respecte les predites pel model van indicar que aquest descrivia adequadament els resultats experimentals obtinguts. L'anàlisi del model realitzat posteriorment mitjançant la comprovació visual predictiva corregida per les prediccions típiques també va demostrar que el model era capaç de predir d'una manera adient els percentils 2,5%, 50% i 97,5% de les dades observades. Un cop demostrada l'estabilitat del model mitjançant les validacions internes, es va avaluar la capacitat predictiva del model amb una validació externa que va consistir en una administració intravenosa de 15 mg/kg de *trans*-resveratrol en rata. Els resultats observats van concordar amb els predits pel model confirmant la robustesa del model. Així doncs, es va desenvolupar un model de farmacocinètica poblacional capaç de descriure i predir les dades del *trans*-resveratrol i els seus metabòlits glucurònid i sulfat a rata. Per tant, aquest model pot ser el punt de partida per a futurs estudis farmacocinètics i farmacodinàmics.

## **V. CONCLUSIONS**

---

## CAPÍTOL 1. Posta a punt d'un mètode per a la determinació de dihidroresveratrol en plasma de rata

- S'ha validat un mètode mitjançant una extracció en fase sòlida seguit de l'anàlisi per cromatografia líquida d'alta eficàcia. El mètode validat és selectiu, sensible (límit de detecció i de quantificació de 275 i 578 nM, respectivament), precís i reproduïble (CV entre 1,30 i 6,66%).
- En rates Sprague-Dawley administrades oralment amb 60 mg/kg de dihidroresveratrol, s'ha demostrat la presència de dihidroresveratrol i els seus conjugats glucurònid i sulfat en plasma, aportant evidència de la seva absorció i el seu metabolisme.

## CAPÍTOL 2. Estudi de l'efecte anticancerigen del *trans*-resveratrol en un model d'inducció per DMH de càncer de còlon en rata

- S'ha validat un mètode per a la determinació de *trans*-resveratrol i els seus metabòlits en contingut intestinal. El mètode és sensible (límit de detecció i de quantificació de 16,5 i 20,6 pmol/g de contingut intestinal, respectivament) i precís (CV de 13,5%) permetent una elevada recuperació (98,3%).
- S'ha posat a punt un mètode d'inducció de càncer de còlon amb el carcinogen 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en rates mascle Sprague-Dawley. L'administració intraperitoneal setmanal durant 3 setmanes de 20 mg/kg de DMH i un temps d'observació superior a 2 setmanes són condicions idònies per a l'estudi de l'efecte del *trans*-resveratrol sobre les lesions preneoplàstiques induïdes.
- L'administració oral de 60 mg/kg de *trans*-resveratrol a rates Sprague-Dawley administrades intraperitonealment amb 20 mg/kg de DMH durant 3 setmanes (una injecció per setmana) durant 49 dies començant una setmana abans del tractament amb carcinogen té un efecte quimiopreventiu ja que redueix en un 52% els focus de criptes aberrants i en un 50% els focus amb depleció de mucines a còlon.
- L'anàlisi del contingut intestinal a còlon 24 hores després de l'última administració va permetre detectar i quantificar el *trans*-resveratrol i els conjugats glucurònid i sulfat així com el dihidroresveratrol. Aquest últim va ser el metabòlit trobat en major quantitat, superant 446 vegades la concentració del compost pare.



### **CAPÍTOL 3.** Estudi de l'efecte del *trans*-resveratrol en un model de colitis espontània en ratolí

- Els ratolins que no expressen la glicoproteïna P (P-gp) o MDR1A presenten a les 13 setmanes de vida símptomes de colitis, com ara femtes toves i moc en femtes i menor pes corporal que els ratolins no modificats genèticament.
- L'administració oral de 60 mg/kg de *trans*-resveratrol durant 21 dies no disminueix la inflamació de la mucosa colònica en els ratolins que presenten colitis, tal i com indica l'elevat pes del còlon i la seva mucosa en comparació amb els ratolins no modificats genèticament. Les mucoses de l'intestí prim no es troben afectades per la colitis ni pel tractament amb *trans*-resveratrol.
- L'estudi histopatològic de la mucosa de còlon dels ratolins *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mostra alteracions significatives en comparació amb els ratolins FVB. L'administració de 60 mg/kg de *trans*-resveratrol durant 21 dies no redueix l'aparició de les lesions produïdes pel desenvolupament espontani de la colitis en els ratolins que no expressen el transportador MDR1A.
- El tractament amb 60 mg/kg de *trans*-resveratrol durant 21 dies no millora la colitis espontània una cop establerta en els ratolins que no expressen el transportador Mdr1a.

### **CAPÍTOL 4.** Avaluació de la participació i de les proteïnes ABC involucrades en la resistència a fàrmacs en l'absorció i distribució del *trans*-resveratrol

#### Estudi dels nivells plasmàtics i tissulars del *trans*-resveratrol i els seus conjugats en ratolins que no expressen el transportador BCRP1 i ratolins no modificats genèticament

- La BCRP1 juga un paper molt important en la distribució del *trans*-resveratrol i els seus conjugats. Els òrgans més afectats són l'intestí prim, el ronyó i els pulmons a on s'observen concentracions més elevades d'aquests compostos quan hi ha una manca de transportador.
- La proteïna BCRP1 és responsable de l'excreció dels conjugats glucurònid i sulfat des de l'interior dels enteròcits a la llum intestinal que dona lloc a elevades concentracions d'aquests compostos al llarg de tot l'intestí.
- En conseqüència, la manca de proteïna BCRP1 també afecta als nivells plasmàtics, a on s'observa un increment de l'àrea sota la corba del glucurònid del 34% i del sulfat del 392% i una disminució de la presència de *trans*-resveratrol en els ratolins amb manca de transportador.

Estudi de la biodisponibilitat del *trans*-resveratrol i els seus conjugats en ratolins que no expressen el transportador MDR1A i ratolins no modificats genèticament

- La manca del gen *Mdr1a*, el qual codifica per a la P-gp, en ratolins modificats genèticament no altera les concentracions plasmàtiques de *trans*-resveratrol i els seus conjugats glucurònid i sulfat i, per tant, es pot concloure que la P-gp no està implicada en l'absorció de *trans*-resveratrol ni en el transport dels seus conjugats.

**CAPÍTOL 5.** Desenvolupament d'un model farmacocinètic del *trans*-resveratrol seguint una aproximació poblacional

- S'ha desenvolupat per primera vegada un model farmacocinètic per al *trans*-resveratrol així com dels seus metabòlits, glucurònid i sulfat, seguint una aproximació poblacional. Aquest model descriu un comportament bicompartimental tant del *trans*-resveratrol com dels seus conjugats a l'organisme.
- Amb el model s'ha pogut demostrar l'efecte de primer pas que pateix el *trans*-resveratrol a intestí i a fetge, dos factors claus en la seva baixa biodisponibilitat. Aquest metabolisme del *trans*-resveratrol és un procés enzimàtic autoinduïble, augmentant la formació de metabòlits, tant a intestí com a l'organisme, quan s'administra més dosi de *trans*-resveratrol. A més a més, el model estableix com a vies d'eliminació del *trans*-resveratrol la formació de glucurònid i sulfat.
- El model desenvolupat pot servir com a punt de partida per a futurs estudis de farmacocinètica-farmacodinàmica i així poder establir la contribució dels conjugats glucurònid i sulfat en els efectes farmacodinàmics del *trans*-resveratrol.