

INVESTIGACIÓN

2009

ESTIGMAS

EL RESVERATROL, UN NUTRACÉUTICO
FUNDAMENTAL DE LA DIETA
MEDITERRÁNEA, FRENTE AL SÍNDROME
METABÓLICO Y SUS COMPLICACIONES

FUNDACIÓN **MAPFRE**

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

Raquel Abalo Delgado

Dra. en Ciencias Biológicas
Profesora Dpto. Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos. Madrid

Índice

| | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 4 |
| 2. ESTUDIOS REALIZADOS | 4 |
| 3. RESULTADOS | 4 |
| 3.1. Objetivo 1: efecto de resveratrol en los parámetros metabólicos | 4 |
| 3.1.1. Evolución del peso | 4 |
| 3.1.2. Evolución de la ingesta | 4 |
| 3.1.3. Evolución de la glucemia | 5 |
| 3.1.4. Evolución del perfil lipídico | 5 |
| 3.1.5. Peroxidación lipídica | 5 |
| 3.1.6. Distribución de la grasa corporal | 6 |
| 3.2. Objetivo 2: efecto de resveratrol en las complicaciones de la diabetes tipo 2 | 8 |
| 3.2.1. Neuropatía sensorial | 8 |
| 3.2.2. Complicaciones cardiovasculares | 9 |
| 3.2.3. Complicaciones gastrointestinales | 12 |
| 4. CONCLUSIONES | 12 |

1. RESUMEN

Este proyecto tiene como objetivos evaluar, en un modelo experimental de síndrome metabólico/diabetes mellitus tipo 2 (Zucker Diabetic Fatty rat, rata ZDF) el efecto de la administración de resveratrol en:

- el peso, la ingesta, los parámetros metabólicos (niveles plasmáticos de glucosa, producción de insulina y perfil lipídico) y la distribución de grasa corporal;
- las complicaciones cardiovasculares, gastrointestinales y neuropatía sensoriomotora.

2. ESTUDIOS REALIZADOS

Mediante el presente proyecto, se han evaluado los siguientes grupos de animales:

- 2 grupos de ratas diabéticas (ZDF) tratadas con resveratrol, para:
 - estudio de distribución de grasa corporal y de complicaciones gastrointestinales (1 grupo)
 - estudio de complicaciones cardiovasculares y neuropatía sensoriomotora (1 grupo)
- 1 grupo de ratas ZDF tratadas con vehículo de resveratrol, para el estudio de la distribución de grasa corporal y las complicaciones gastrointestinales.

Además, mediante financiación complementaria, se ha realizado la evaluación de los siguientes grupos de animales:

- 1 grupo de ratas no diabéticas (ratas lean) sin tratamiento
- 1 grupo de ratas ZDF sin tratamiento
- 1 grupo de ratas ZDF tratadas con vehículo de resveratrol, para el estudio de complicaciones cardiovasculares y neuropatía sensoriomotora.

El tratamiento con resveratrol (2.5 mg/kg/día) o su vehículo (Cremophor al 2% en agua destilada) comenzó en la semana 8 de vida y finalizó el día anterior a realizar el último experimento (semana 20-21, según corresponda).

En todos los animales se ha realizado un registro regular de peso e ingesta. Las valoraciones de distribución de grasa, motilidad gastrointestinal, glucemia y perfil lipídico se realizaron en la semana 7 y en la semana 17-19 de vida. Las valoraciones de neuropatía sensoriomotora se realizaron en las semanas 7, 13 y 17-19. Las valoraciones de función cardiovascular se realizaron en la semana 19-23 (no invasivas, por imagen) o en la semana 20-21 de vida (invasivas).

3. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados (media \pm error estándar de la media) obtenidos en cada objetivo. Salvo que se especifique otra cosa, para simplificar, sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una o dos vías, seguido de test post-hoc de

Bonferroni, según corresponda) de carácter relevante, utilizando los siguientes símbolos:

- *, **, *** : diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) de ZDF control (ZDF) vs. Lean
- \$, \$\$, \$\$\$: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) de ZDF tratados con vehículo (veh.) vs. ZDF control (ZDF)
- #, ##, ###: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) de ZDF tratados con resveratrol (resv) vs. ZDF tratados con vehículo (veh).

N=5-7 animales por grupo experimental.

3.1. Objetivo 1: efecto de resveratrol en los parámetros metabólicos

3.1.1. Evolución del peso

En la siguiente gráfica se muestra la evolución del peso (desde antes de comenzar el tratamiento, hasta semana 19) para los animales diabéticos (ZDF, círculo negro) y sus controles (Lean, círculo blanco) en ausencia de tratamiento, y los animales ZDF tratados con resveratrol (resv, círculo azul) o su vehículo (veh, círculo rojo).

El peso de las ratas lean aumentó progresivamente durante todo el estudio, llegando a ser el doble desde la semana 7 a la 19. Frente a las ratas Lean, las ratas ZDF mostraron mayor peso antes de comenzar el tratamiento, y este peso aumentó hasta las semanas 10-11, en que se alcanzó una meseta. El tratamiento crónico con vehículo o resveratrol no modificó significativamente los valores obtenidos en los animales ZDF (Figura 1).

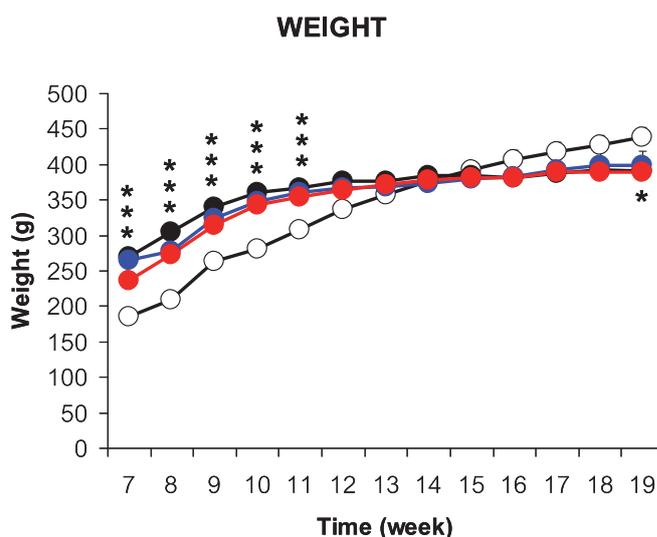


Figura 1. Variación del peso.

3.1.2. Evolución de la ingesta

Los animales ZDF (círculo negro) presentaron desde el principio del estudio unos valores de ingesta muy superiores a los de los animales lean (círculo blanco), llegando a ser más del doble aproximadamente desde la semana 12.

El tratamiento con resveratrol (círculo rojo) o su vehículo (círculo azul) no produjo modificaciones significativas frente a los animales ZDF sin tratamiento (Figura 2).

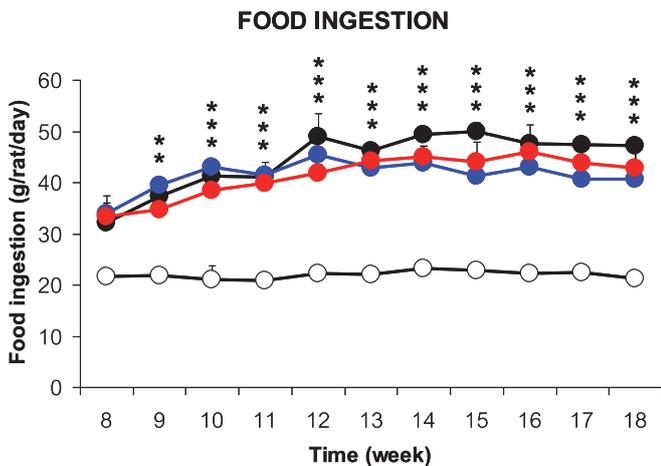


Figura 2. Valores de ingesta.

3.1.3. Evolución de la glucemia

En la siguiente gráfica se muestran los valores de glucemia (en ayunas) obtenidos en la semana 7 (antes del tratamiento) y 19 de vida (tras 12 semanas de tratamiento) en los diferentes grupos de animales. Los animales ZDF (barra negra) mostraron hiperglucemia (vs. Lean: barra blanca), que no se modificó significativamente por el tratamiento con vehículo (barra azul) o con resveratrol (barra roja) (Figura 3).

GLUCEMIA

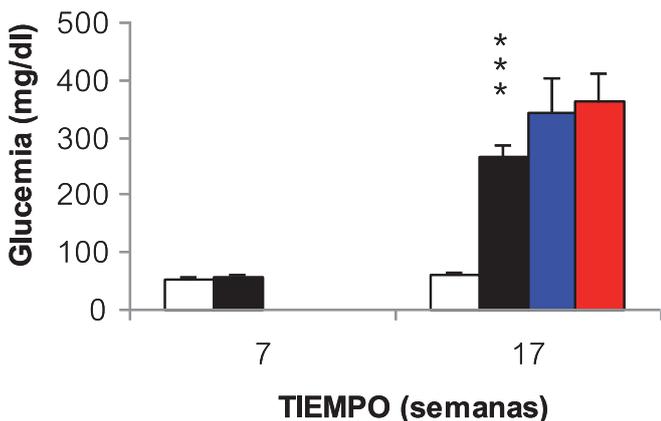


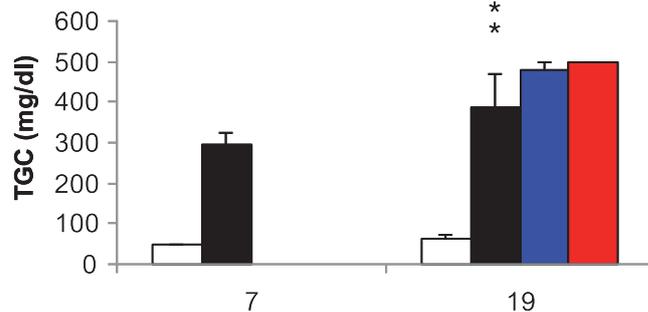
Figura 3. Glucemia en ayunas.

3.1.4. Evolución del perfil lipídico

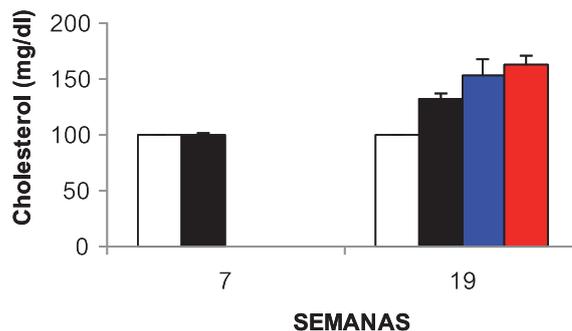
En cuanto al perfil lipídico, se han valorado los niveles en ayunas de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL. Como se observa en las gráficas siguientes, en los animales diabéticos (barra negra) se desarrolla hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (vs. Lean, barra blanca). Así, en la semana 7, antes de comenzar los tratamientos, ya se

observa hipertrigliceridemia, aunque los niveles de colesterol total son normales. En cambio, en la semana 19, ambas alteraciones son claramente manifiestas. En cuanto a los valores de HDL, estos son superiores a los encontrados en los animales lean tanto en la semana 7 como en la semana 19. El tratamiento con resveratrol o su vehículo no modificó significativamente ninguno de los parámetros con respecto a los animales diabéticos control (ZDF) (Figura 4).

TRIGLYCERIDES



COLESTEROL



HDL

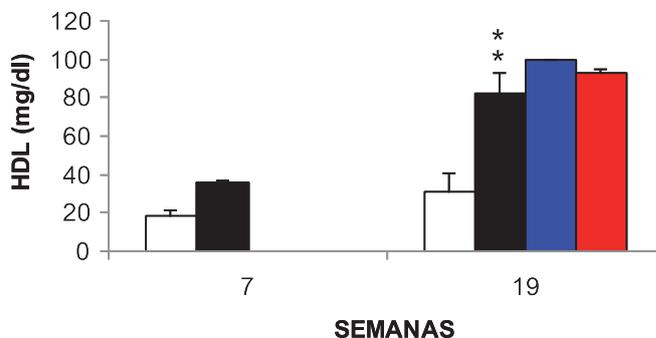


Figura 4. Triglicéridos, colesterol y HDL.

3.1.5. Peroxidación lipídica

Se valoraron los niveles plasmáticos de malonildialdehído (MDA) en los diferentes grupos de animales. Como se muestra a continuación, los valores de MDA aumentaron

en los animales ZDF en comparación con sus controles (Lean), pero el tratamiento con resveratrol no los normalizó (Figura 5).

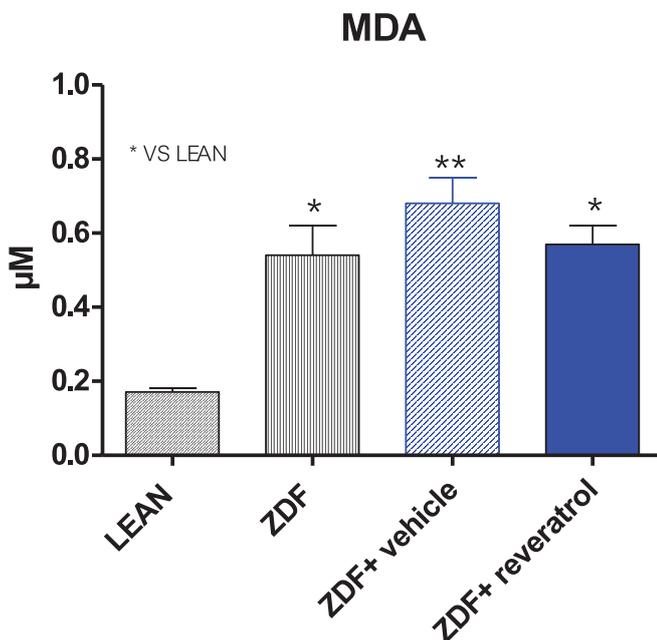


Figura 5. Niveles plasmáticos de malonildialdehído.

3.1.6. Distribución de la grasa corporal

La distribución de la grasa corporal se realizó mediante un estudio de resonancia magnética. En primer lugar, para cada rata se adquirieron dos imágenes, cuyo contraste permite distinguir la grasa del tejido muscular. En una de ellas, se aplica un pulso de saturación específico para grasa en la secuencia de adquisición. La adquisición de la imagen con y sin saturación de la grasa (la secuencia permite eliminar la señal procedente de la grasa) permite obtener la imagen diferencia para mostrar el contenido de grasas. Las siguientes figuras muestran un ejemplo de cómo se han realizado estos estudios. La primera corresponde a semana 7 en una rata ZDF (Figura 6).

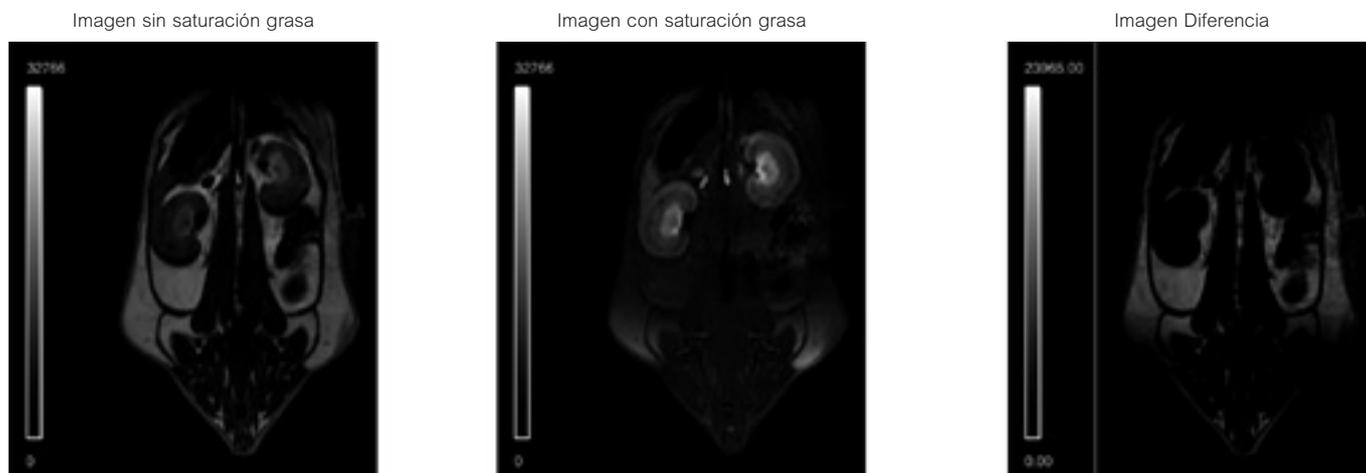


Figura 6. Distribución de la grasa corporal.

La segunda corresponde a la semana 19-20, y muestra la comparación entre los distintos grupos de tratamiento (Figura 7).

Aunque resulta difícil llevar a cabo una medición cuantitativa del contenido de grasa en el cuerpo, en las imágenes de la figura anterior se puede apreciar un incremento en el contenido graso de las ratas ZDF con respecto a las ratas lean, incremento que no parece verse modificado por el tratamiento con resveratrol o su vehículo.

En segundo lugar, se valoró la relación lípidos totales/agua, tanto en semana 7 (ratas ZDF, antes de recibir tratamiento con vehículo o resveratrol), como en semana 20 (todos los grupos de tratamiento). En la etapa basal (semana 7), los animales que posteriormente recibirían tratamiento con vehículo o resveratrol no mostraron diferencias significativas entre sí, por lo que se consideró que se partía de las mismas condiciones en cuanto a este parámetro. Como se muestra en la siguiente figura, en ambos grupos, la relación lípidos totales/agua aumentó significativamente en semana 20 (Figura 8).

En la semana 19-20, se compararon también los lípidos totales, así como los lípidos en hígado en los diferentes grupos de animales (lean, ZDF, veh y resv).

Como se puede observar en las siguientes figuras, en ambos casos, se apreció una tendencia al aumento de los lípidos totales en animales ZDF (con o sin tratamiento); este aumento fue significativo en el caso de los lípidos del hígado en animales ZDF frente a animales control (lean) (Figuras 9a y 9b).

Finalmente, tanto en la semana 7 como en la semana 20, se estudió el grado de saturación lipídica, haciendo distinción entre los ácidos grasos saturados y los poliinsaturados. Al igual que en el caso anterior, en la semana 7, previamente a comenzar el tratamiento, ambos grupos de animales ZDF presentaron el mismo grado de saturación (FAs), $39.49\% \pm 0.07$ (ZDF VEH) y $41.69\% \pm 0.03$ (ZDF RESV), y de doble poliinsaturación (FAd), $70.71\% \pm 0.03$ (ZDF VEH) y $71.98\% \pm 0.08$ (ZDF RESV).

Como se puede observar en la siguiente figura, en comparación con la semana 7, el grado de saturación de

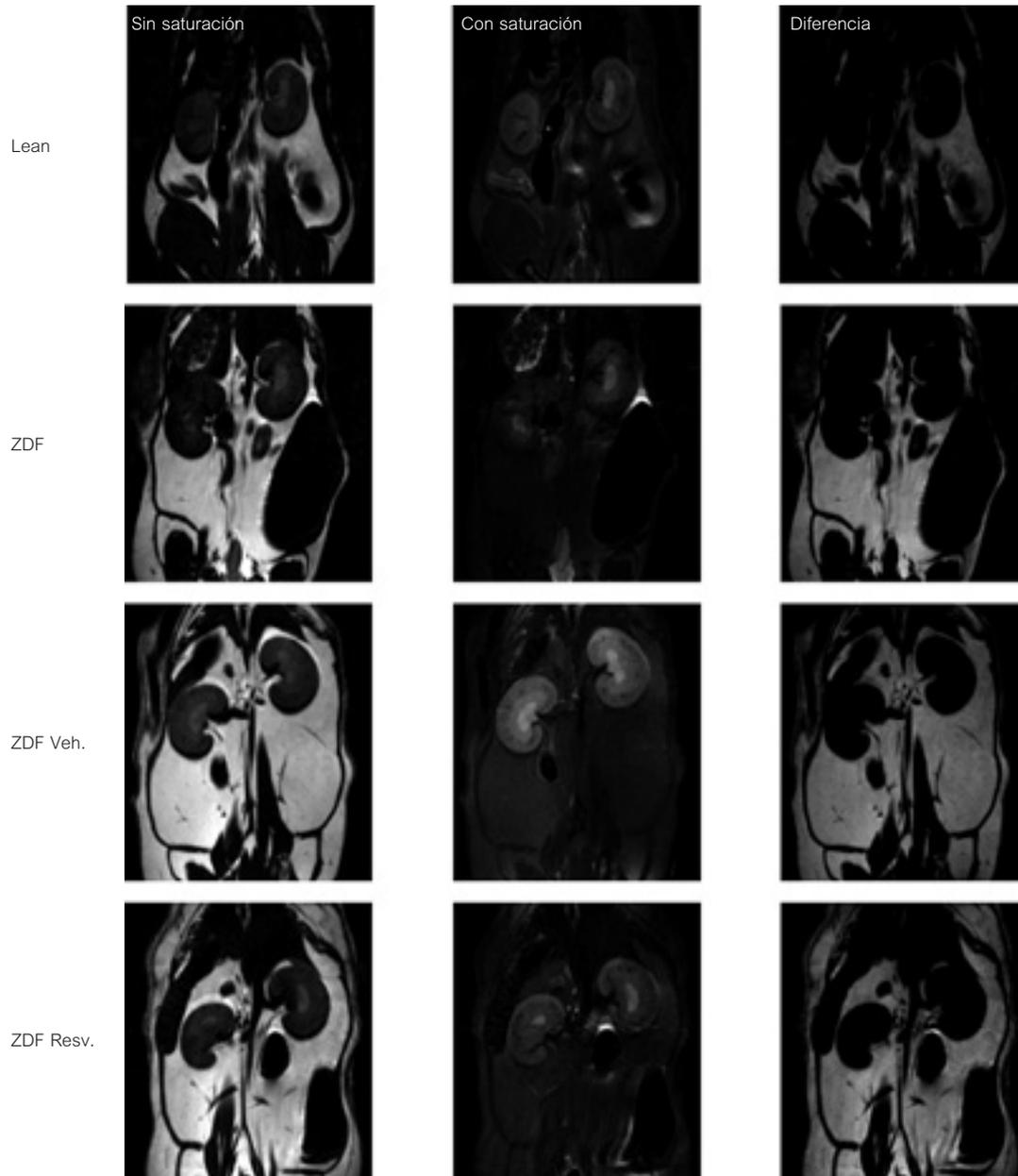


Figura 7. Distribución de grasa corporal.

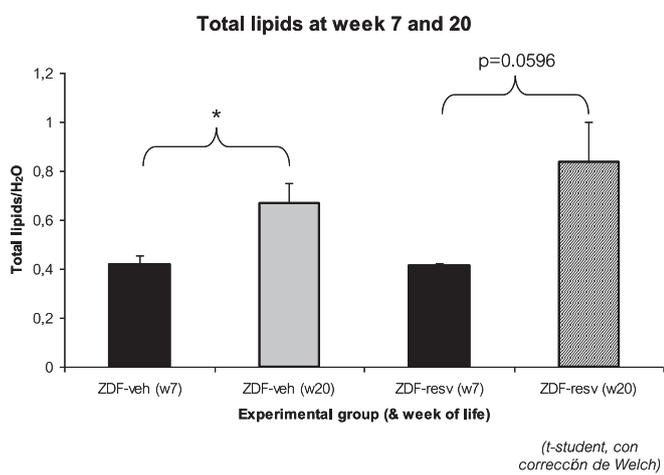


Figura 8. Relación lípidos totales/grasa.

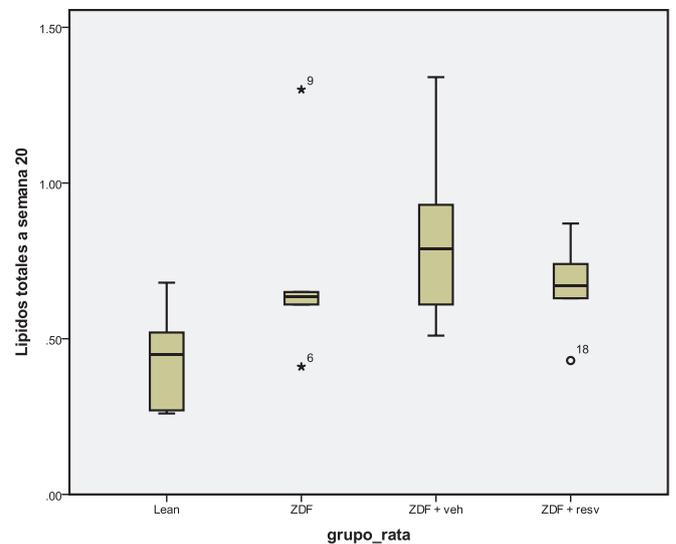


Figura 9a. Lípidos totales.

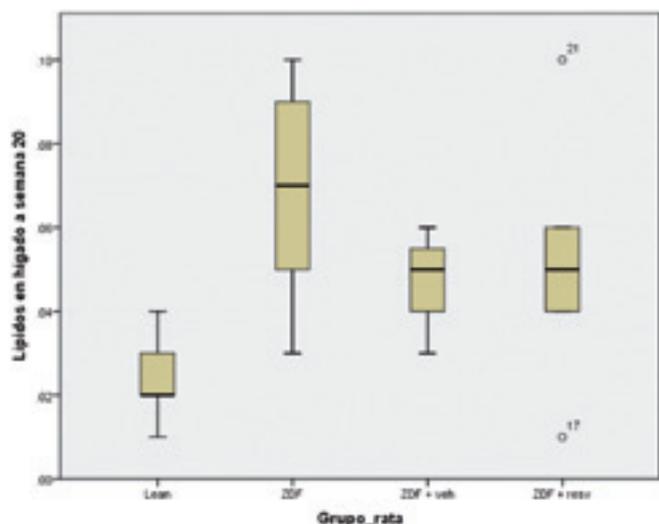


Figura 9b. Lípidos en hígado.

la grasa encontrado en la semana 20 disminuyó en todos los animales ZDF (veh y resv), alcanzándose diferencias estadísticamente significativas en el caso de los animales tratados con resveratrol (Figura 10).

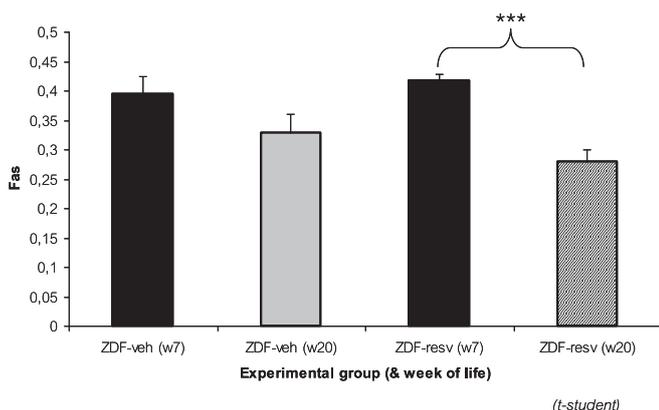


Figura 10. Fas.

En cambio, el grado de doble instauración no se modificó de manera significativa entre la semana 7 y la semana 20 en ninguno de los grupos de animales (Figura 11).

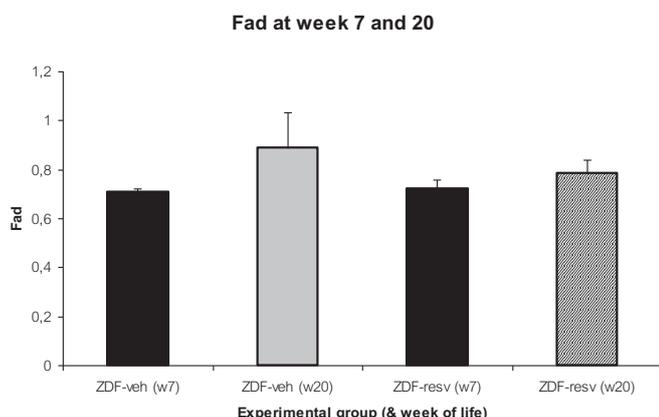
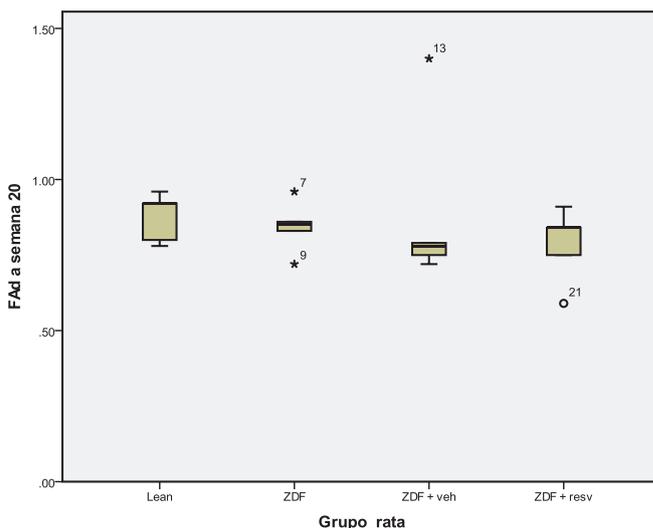
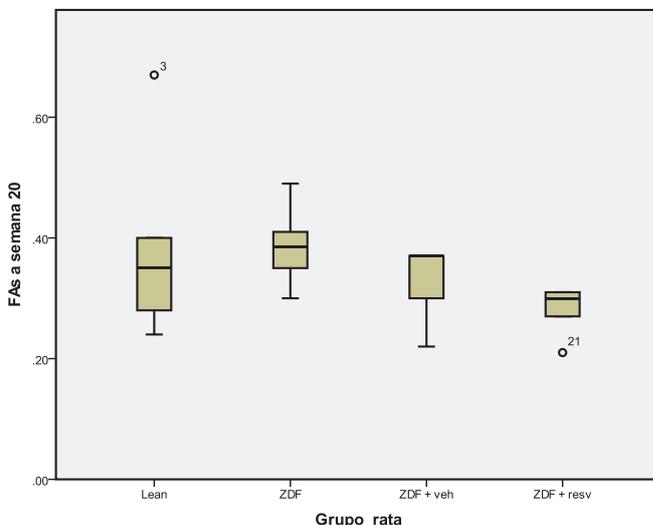


Figura 11. Fad.

Por último, en las siguientes gráficas se puede observar que en la semana 20 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de animales en cuanto al grado de saturación y de doble instauración (Figuras 12a y 12b).



Figuras 12a y 12b. Fas y Fad en semana 20.

3.2. Objetivo 2: efecto de resveratrol en las complicaciones de la diabetes tipo 2

3.2.1. Neuropatía sensorial

Como se observa en la gráfica siguiente, frente a sus controles (Lean, barra blanca), los animales diabéticos (ZDF, barra negra) desarrollaron neuropatía diabética, caracterizada por la presencia de alodinia mecánica. En comparación con los animales diabéticos tratados con vehículo (barra azul), en los tratados con resveratrol (barra roja), se apreció una reversión parcial de los umbrales para la alodinia mecánica hacia los valores encontrados en los animales no diabéticos (Lean) (Figura 13).

Se ha valorado también la actividad locomotora espontánea en un actímetro. Los animales diabéticos (ZDF)

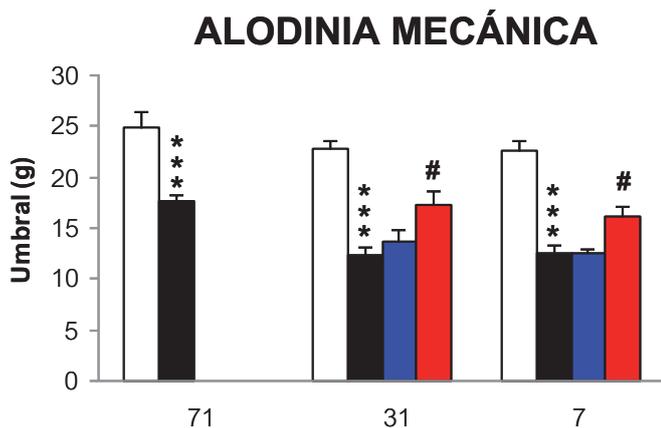


Figura 13. Alodinia mecánica.

presentaron una menor actividad locomotora espontánea ya desde la semana 7. El tratamiento con resveratrol no modificó significativamente este parámetro (no lo mejoró, pero tampoco lo empeoró) (Figura 14).

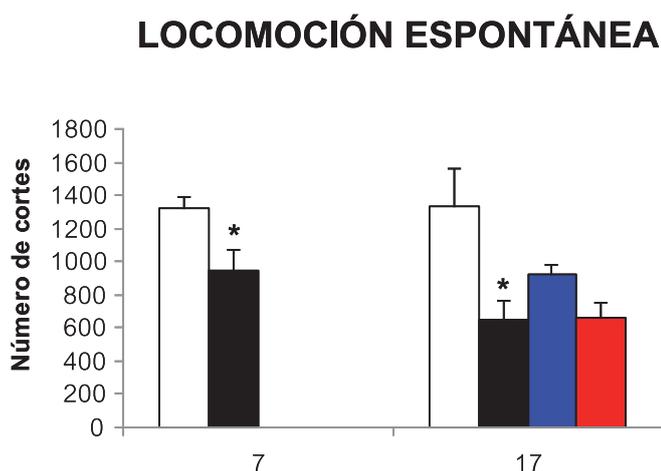


Figura 14. Locomoción espontánea.

3.2.2. Complicaciones cardiovasculares

Se han realizado dos tipos de estudio:

- invasivo: medida directa de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en animal anestesiado; valoración in vitro de funcionalidad vascular de aorta, lecho mesentérico y corazón
- no invasivo: estudios por imagen (resonancia magnética, PET, SPECT)

a) Estudio invasivo

El estudio invasivo se realizó en la semana 19-20, al día siguiente de la última administración de resveratrol (tras 12-14 semanas de tratamiento).

Como se observa en la siguiente figura, los animales diabéticos presentan cifras de presión arterial y frecuencia cardíaca más bajas que sus controles lean. El tratamiento con resveratrol no modificó dichos parámetros en ratas diabéticas (Figura 15).

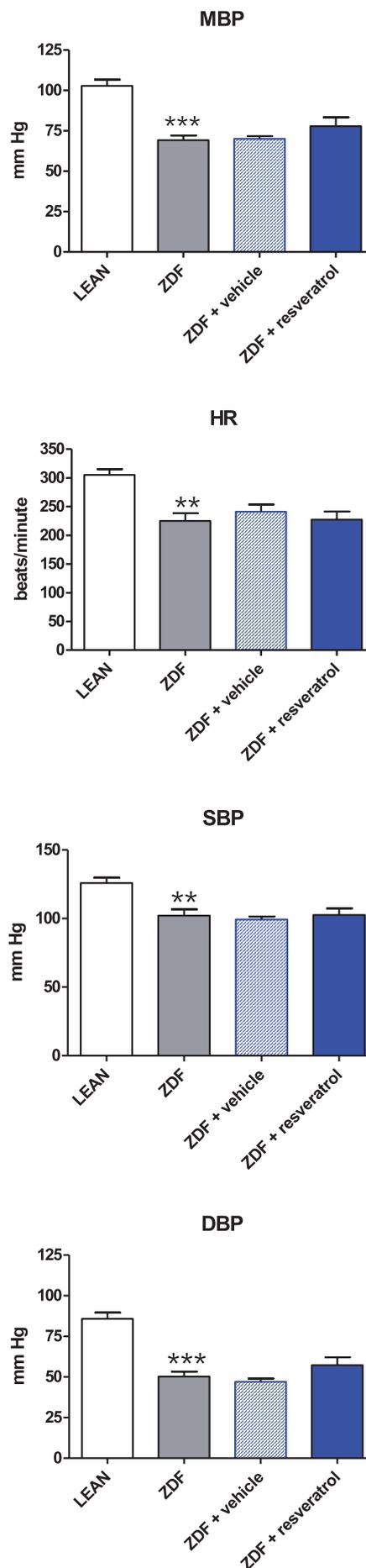


Figura 15. Complicaciones cardiovasculares.

En cuanto a la funcionalidad vascular de la aorta, como se observa a continuación, las ratas ZDF presentan una disminución en la respuesta contráctil a fenilefrina, mientras que la respuesta relajante a carbachol está aumentada, sin existir modificación de la respuesta relajante a nitroprusiato sódico (NPS). El tratamiento con resveratrol no modificó ninguna de estas respuestas (Figura 16).

En cuanto a la funcionalidad vascular del lecho mesentérico, como se muestra a continuación, no se observaron diferencias entre los animales Lean y ZDF en la respuesta contráctil a fenilefrina o la relajante a carbachol o a nitroprusiato, y tampoco el tratamiento con resveratrol o su vehículo modificó significativamente estos parámetros (Figura 17).

En corazón aislado se confirmó la disminución de la frecuencia cardíaca asociada al desarrollo de diabetes, que además se acompaña de un aumento en la Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (LVDP) en comparación con los no diabéticos (Lean). El tratamiento con resveratrol o su vehículo no modificó significativamente ninguno de estos parámetros (Figura 18).

b) Estudio no invasivo

En cuanto al estudio por imagen, en el proyecto se contemplaba la posibilidad de realizar estudios de resonancia magnética (RM) para valorar las complicaciones cardiovasculares.

Los datos obtenidos mediante RM en relación con la fracción de eyección (FE) en la etapa basal (semana 7) no mostraron diferencias entre los animales diabéticos que posteriormente recibirían vehículo (ZDF VEH) y tratamiento (ZDF RESV), siendo 49.77 ± 13.17 y 54.03 ± 15.06 , respectivamente. Sin embargo, los valores de desviación estándar eran bastante elevados debido a que la FE obtenida en algunos animales resultaba anómala. Por ello, decidimos realizar un estudio de "gating" cardíaco mediante la técnica de PET con un trazador análogo a la glucosa (FDG). Con esta técnica, los valores de volumen diastólico, volumen sistólico y FE en los animales que serían tratados con vehículo fueron de 0.28 ± 0.03 , 0.06 ± 0.01 y 80.35 ± 3.95 respectivamente. En el caso de los animales que recibirían resveratrol fueron de 0.27 ± 0.07 , 0.05 ± 0.02 y 81.24 ± 5.50 respectivamente. Puesto que en ninguno de los dos

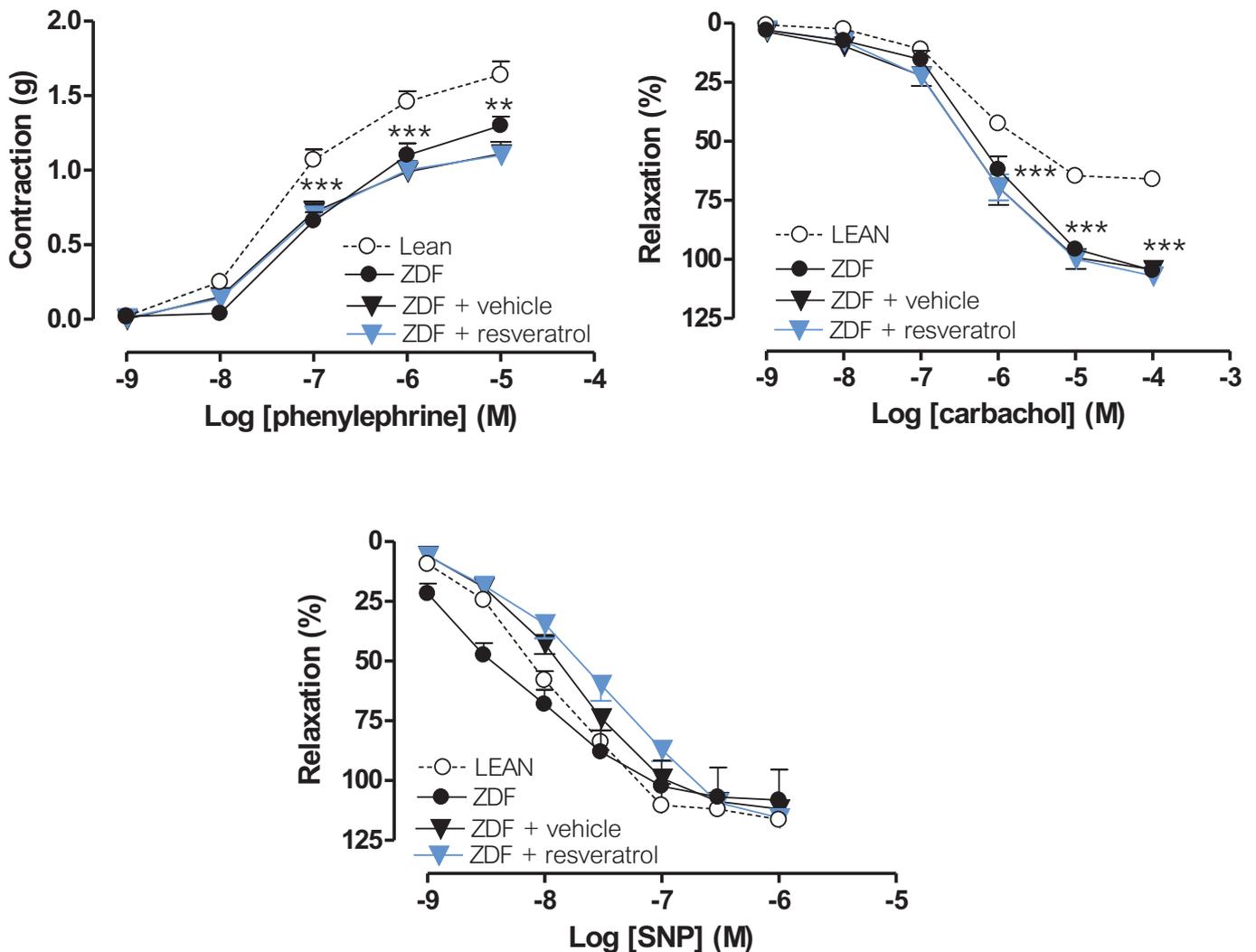


Figura 16. Funcionalidad vascular de la aorta.

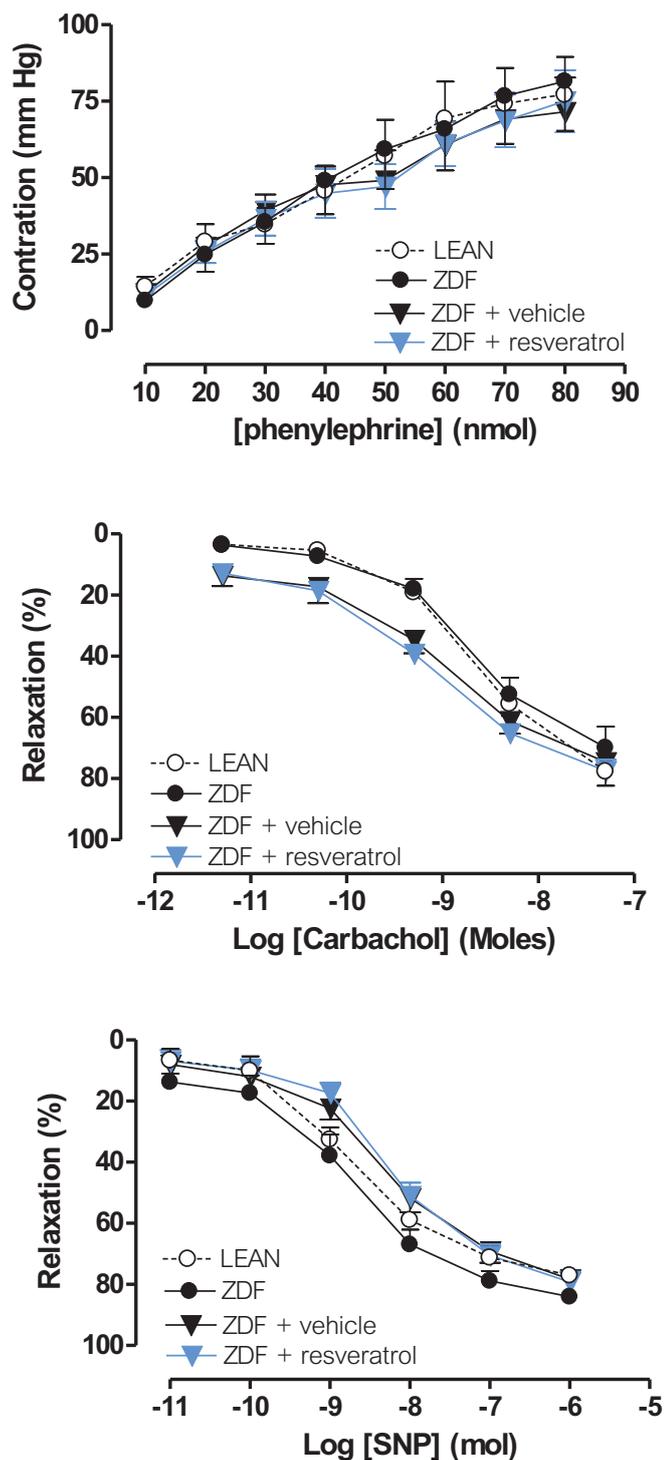


Figura 17. Funcionalidad vascular del lecho mesentérico.

estudios se encontraron diferencias significativas, se concluyó que los animales se encontraban en el mismo punto de partida y con valores de FE normales.

Durante la realización de los PET sincronizados con ECG a semana 19 se observó que, debido al nivel de glucosa en sangre que presentaban los animales ZDF, el miocardio no era capaz de captar el análogo de glucosa (FDG), este problema se solventa habitualmente con la administración de insulina (8 mU/g de peso corporal) y glucosa (1 mg/g de peso corporal). En nuestro caso este

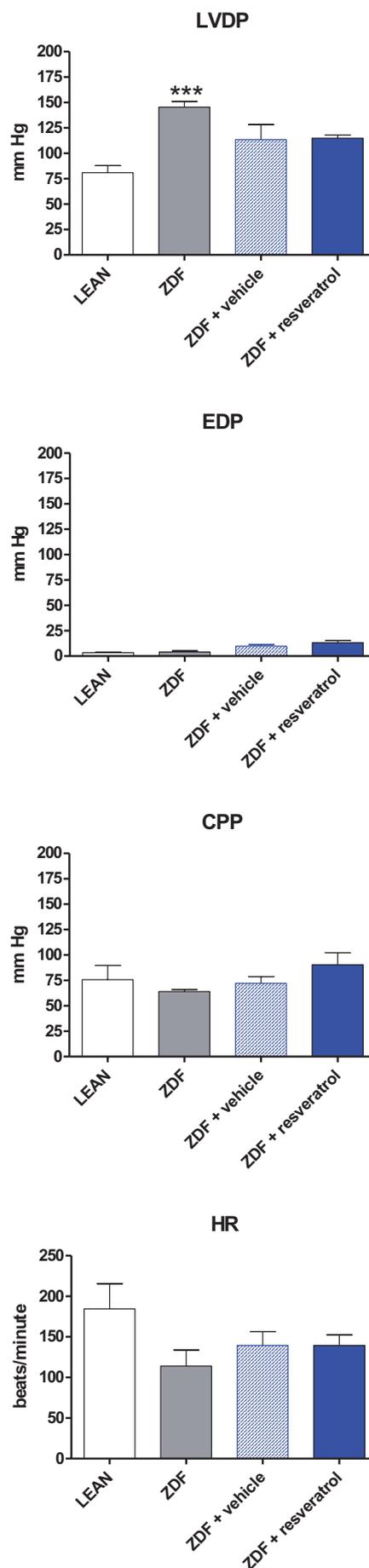


Figura 18. Disminución de frecuencia cardíaca asociada al desarrollo de la diabetes.

abordaje no era posible, puesto que queríamos valorar el consumo de glucosa en otros tejidos. Por este motivo se optó por la realización, a semana 19, de estudios de SPECT sincronizados con ECG. El protocolo de adquisición se resume en la figura 19.

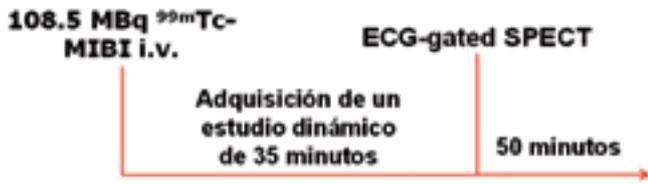


Figura 19. ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE ADQUISICIÓN. Primero se realizó un estudio dinámico de unos 35 minutos tras lo cual se adquirió un estudio de SPECT sincronizado con ECG.

Las imágenes fueron reconstruidas con los parámetros siguientes: tamaño de vóxel 0.375 mm^3 , tipo de reconstrucción 3D-OSEM con una iteración y post filtrado FWHM de 0.5.

Los datos obtenidos en relación a la fracción de eyección (FE) no mostraron diferencias entre los cuatro grupos de animales (LEAN, ZDF, ZDF-V y ZDF-R) en la última etapa del tratamiento: 70.98 ± 3.56 , 72.55 ± 3.346 , 71.29 ± 3.57 y 67.56 ± 5.49 , respectivamente. El estudio estadístico mostró que estos valores no eran significativamente diferentes. Por tanto, se puede concluir que la función ventricular de los animales ZDF no se ve alterada espontáneamente por el hecho de padecer diabetes y que el tratamiento con resveratrol o su vehículo no modifica este parámetro.

Puesto que las ratas ZDF presentan una importante bradicardia, el hecho de que la fracción de eyección (volumen minuto) no esté alterada, podría explicarse por un aumento en la fuerza de contracción, que, de hecho, es lo que se encontró en el estudio invasivo cuyos resultados se han mostrado anteriormente (LVDP más grande pero igual EDP).

3.2.3. Complicaciones gastrointestinales

La motilidad gastrointestinal se estudió mediante técnicas radiográficas tras la administración de un contraste de bario. Cuando se realizó este estudio en los animales ZDF ($n=12$) en la semana 7, antes de comenzar los tratamientos, no se encontraron diferencias entre los animales a los que posteriormente se daría el tratamiento con vehículo y aquellos que recibirían resveratrol, por lo que en la gráfica siguiente se muestran las curvas de motilidad obtenidas para el conjunto de los animales, en las diferentes regiones gastrointestinales: estómago, intestino delgado, ciego y región colorrectal. Estos resultados coincidían en gran medida con nuestros datos previos obtenidos en animales no diabéticos. En las imágenes se muestra un ejemplo representativo de la distribución del contraste de bario a lo largo del tracto gastrointestinal, a las 0, 2, 4 y 8 horas tras su administración intragástrica (E=estómago; ID=intestino delgado; C=ciego; BF=bolos fecales) (Figura 20).

MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

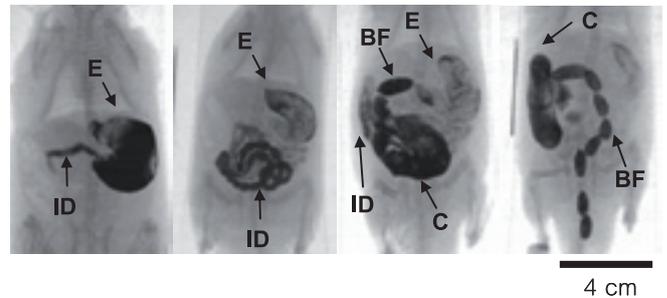
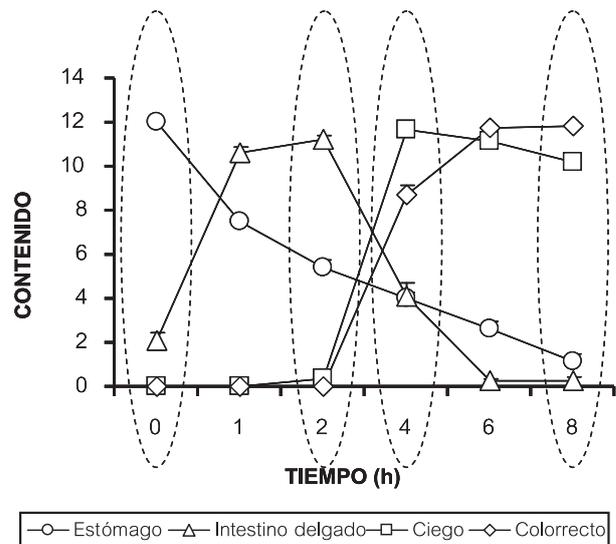


Figura 20. Complicaciones gastrointestinales.

En las gráficas siguientes se muestran las curvas de motilidad obtenidas para el estómago, intestino delgado, ciego y región colorrectal en los diferentes grupos de animales, en semana 21, tras finalizar los distintos tratamientos. Como se puede observar, frente a animales no diabéticos, (lean, círculos blancos), en las ratas ZDF (círculos negros) no se observaron diferencias significativas en las curvas de motilidad para el estómago, pero las obtenidas para el intestino delgado, el ciego y, sobre todo, para la región colorrectal, estaban retrasadas. El tratamiento con resveratrol (círculos rojos) o su vehículo (círculos azules) no produjo modificaciones de importancia en comparación con las ratas ZDF que no recibieron tratamiento (Figura 21).

4. CONCLUSIONES

El presente estudio se planteó para evaluar la posibilidad de que el tratamiento crónico con resveratrol fuera útil para prevenir el desarrollo de diabetes tipo 2 y sus complicaciones en un modelo experimental, genético, de esta patología, la rata Zucker Diabetic Fatty (ZDF).

De todos los parámetros evaluados, el resveratrol sólo consiguió bloquear parcialmente uno de ellos, el desarrollo de alodinia mecánica, que es un signo de neuropatía

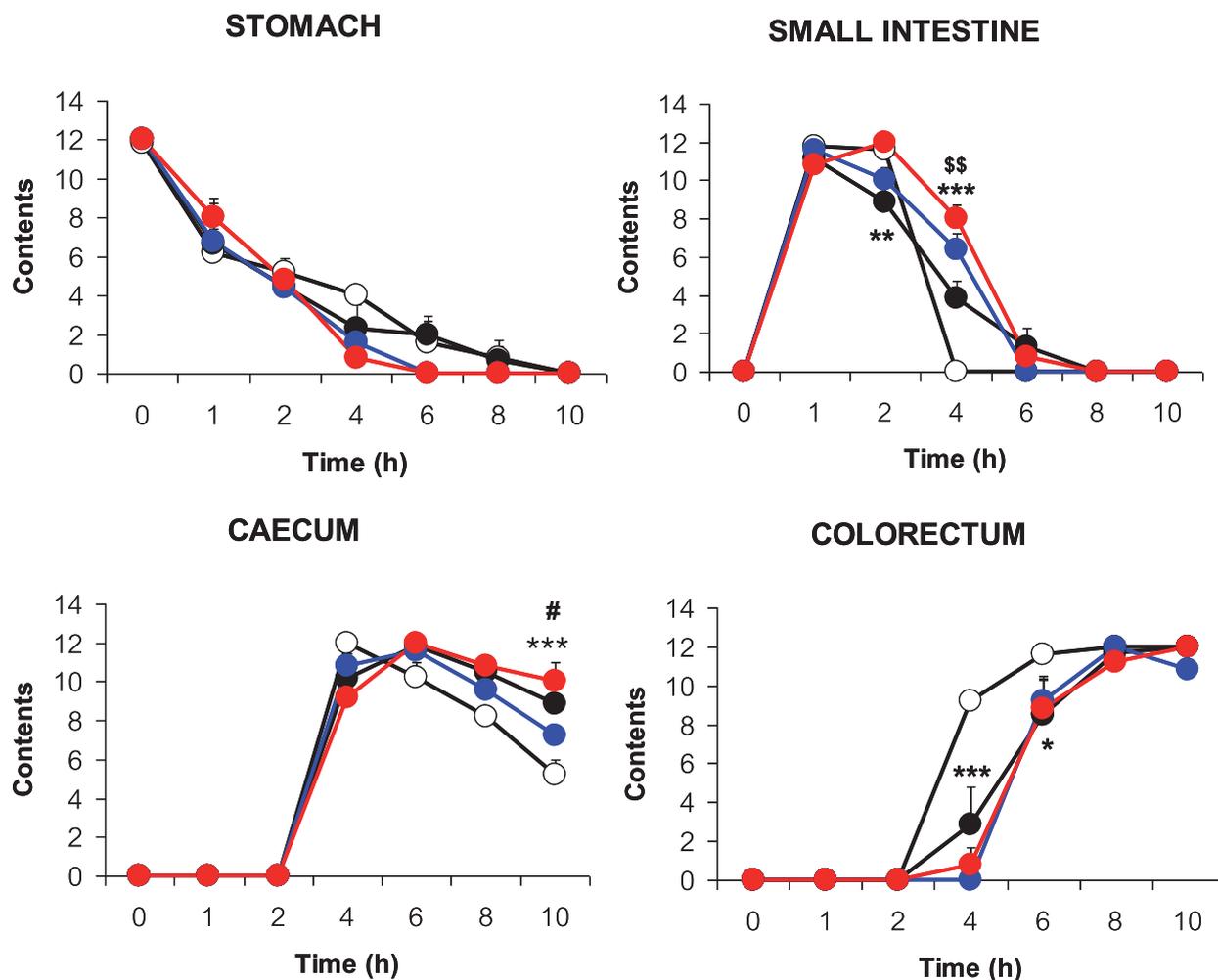


Figura 21. Curvas de motilidad para el estómago.

periférica sensorial. Por tanto, en principio, el resveratrol administrado de manera crónica podría no ser un tratamiento eficaz para prevenir el desarrollo de la diabetes tipo 2 y sus complicaciones. De todos modos, el efecto de prevención de la neuropatía, aunque discreto, no está exento de interés, puesto que los dolores neuropáticos son difíciles de tratar, y su prevención es siempre deseable. Se requerirían más estudios para conocer el mecanismo de acción implicado.

Un segundo objetivo, no explícitamente planteado en el proyecto, pero igualmente interesante, era caracterizar mejor el modelo de rata ZDF, particularmente en lo referido a la distribución y composición de la grasa corporal mediante técnicas de imagen. Estas técnicas, no invasivas, nos han permitido observar modificaciones entre la situación basal (semana 7), antes del desarrollo de hiperglucemia y de la mayoría de las otras alteraciones características de este modelo y en un momento temporal posterior (semana 19-21), en que todas estas características estaban plenamente desarrolladas. Nuestros resultados son los primeros en este campo, por lo que esperamos tengan una buena acogida en la comunidad científica.

Finalmente, todos los demás parámetros evaluados en las ratas ZDF y lean presentaron valores semejantes a los

encontrados en la literatura o en estudios previos de nuestro laboratorio, lo que demuestra que se pueden hacer estudios exhaustivos multidisciplinares utilizando este modelo de ratas diabéticas.

Hasta la fecha, los resultados obtenidos durante la realización del presente proyecto han dado lugar a la preparación de 4 comunicaciones que han sido aceptadas para su presentación en el próximo Congreso Internacional sobre Prediabetes y Síndrome Metabólico, que se celebrará en Madrid del 6 al 9 de abril de 2011.

Estas comunicaciones son:

Resveratrol fails to modify the development of type 2 diabetes but modestly improves peripheral neuropathy in the genetic Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat model. R. Abalo, V. López-Miranda, M. L. Soto, G. Vera, E. Herradón, M. Benito, P. A. Cabezas, C. González, A. E. López, M. Desco, M. I. Martín-Fontelles

A radiographic and electromyographic study of gastrointestinal motor function in a genetic model of type 2 diabetes, the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. G. Vera, P. A. Cabezas, A. E. López, R. Gil, M. Martínez-Villaluenga, M. L. Soto, V. López-Miranda, M. Desco, M. I. Martín-Fontelles, R. Abalo.

Effect of chronic resveratrol administration on vascular autonomic dysfunction in Zucker Diabetic Fatty rats. E. Herradón, C. González, G. Vera, P.A. Cabezos, M. Soto-Montenegro, R. Abalo, V. López-Miranda, M.I.Martín.

Cardiac disturbances in Zucker Diabetic Fatty rats: effect of a chronic resveratrol treatment. V. López-Mi-

randa, L. Cussó, C. González, ML Soto-Montenegro, E. Herradón, G.Vera, P.A. Cabezos, M. Benito, C. Chavarrias, M. Desco, R. Abalo, M.I.Martín.

Además, se están elaborando los correspondientes manuscritos.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.