

Nuevas estrategias en la evaluación de alimentos funcionales

Daniel Ramón, Patricia Martorell y Salvador Genovés

Biopolis SL

En los países desarrollados la alimentación ya no se entiende como una mera forma de saciar el apetito. Más que nunca se percibe como una forma natural de mejorar la salud y la calidad de vida y fomentar el bienestar de la mayoría de los consumidores. En el marco de esta nueva forma de entender la nutrición surgen los llamados alimentos funcionales que, aparte de satisfacer nuestra ingesta calórica, contienen ingredientes que ayudan a mejorar la salud o prevenir el desarrollo de algunas patologías. Es muy importante aclarar que no son medicamentos, tan sólo deben ser el complemento adecuado a una alimentación sana y un estilo de vida saludable que prevengan el desarrollo de patologías. No es una función baladí. En

un nicho potente de crecimiento, tanto para las industrias alimentarias que quieran producir desarrollos con mayor margen, como para la industria farmacéutica que desea ver ampliado su abanico de productos pensando en algo más que la población enferma. Como ejemplo del primer caso baste recordar que Nestlé ha adquirido en los últimos cinco años compañías como AC Immune o Accera especializadas en Alzheimer, Pfizer Infantil Nutrition o Seres Terapéutica que desarrolla un consorcio bacteriano para la infección por *Clostridium difficile*. También Danone ha coinvertido con la farmacéutica Shire Pharmaceuticals en la empresa de microbiota francesa Enterome. En el terreno de las empresas farmacéuticas, GlaxoSmithKline ha comprado MaxiNutrition, Pfizer Emergen-C y Reckitt Benckiser ha adquirido Schiff Nutrition. Hay todo un caldo de cultivo activo.

LA INDUSTRIA ALIMENTARIA maneja datos para ciertas partes del planeta (UE, EE.UU.) que cifran en un 27% la cuota de mercado de estos alimentos. Esta cuota crece del 6 al 25% según la zona del planeta en estudio y los analistas esperan que en el 2017 este mercado suponga unas ventas de 54.000 millones de dólares.

un planeta en el que la obesidad se ha convertido en una epidemia y hay un incremento de la esperanza de vida que ha llevado a una inversión de la pirámide poblacional, cualquier alternativa preventiva es vital para paliar los gastos sanitarios ligados a estos dos hechos.

Para hacernos una idea de la fuerza de este nuevo subsector de la alimentación funcional, baste recordar que la industria alimentaria maneja datos para ciertas partes del planeta (UE, EE.UU.) que cifran en un 27% la cuota de mercado de estos alimentos. Esta cuota crece a tasas del 6 al 25% dependiendo de la zona del planeta en estudio, de forma que los analistas esperan que en el 2017 este mercado suponga unas ventas de 54.000 millones de dólares. Por lo tanto, es

Todas estas perspectivas fracasarán si las empresas implicadas no logran demostrar que estos productos sirven para aquello que se alega en sus etiquetas. La realidad es que durante muchos años ha habido un exceso de productos funcionales con mucho marketing y poca ciencia. Esto, junto con los cambios constantes en las directrices y recomendaciones nutricionales por parte de las autoridades, provoca en muchas ocasiones confusiones en el consumidor a la hora de elegir alimentos saludables. Por ello en la UE se ha legislado que la comercialización de estos productos debe basarse en estudios de seguridad y eficacia y que la autorización para reclamar beneficios se conceda tras un análisis exhaustivo por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Hace falta definir qué dianas metabólicas afecta el , y demostrar su eficacia en ensayos preclínicos con modelos animales y en experimentación clínica. Todo un cambio de paradigma, sobre todo para la industria alimentaria poco acostumbrada a desarrollos largos y de coste elevado. Ahora, aquellas compañías que quieren vender funcionales deben cambiar su dinámica de trabajo, y optar por esquemas de desarrollo de productos similares



Figura 1

Esquema para la evaluación de un alimento o ingrediente funcional. A diferencia de la comercialización de un alimento convencional, este tipo de alimentos requiere de ensayos preclínicos para ver rutas afectadas y definir biomarcadores, ensayos de seguridad alimentaria y finalmente ensayos clínicos que demuestren su efecto en voluntarios humanos sanos.

a los planteados en la *Figura 1*. Esta figura muestra todos los pasos a dar hasta lograr comercializar un tipo determinado de ingrediente funcional como son los probióticos. En este esquema de trabajo cobra especial relevancia el uso de modelos animales en los ensayos preclínicos. Mediante su uso se logra determinar qué rutas están afectadas y se definen biomarcadores para el ensayo clínico posterior. En este eslabón es donde hay que reducir costes y tiempos de ejecución sin perder rigurosidad científica, lo cual solo es abordable mediante el empleo de nuevos modelos animales.

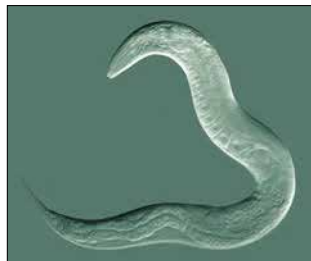
Clásicamente, para evaluar los ingredientes y alimentos funcionales se han utilizado los cultivos celulares y modelos murinos. Los cultivos de células tienen la ventaja de que se trabaja con células humanas, por lo que los resultados se dan en el mismo organismo que será receptor del producto final. Ahora bien, hay que trabajar con células inmortalizadas, por lo que su comportamiento, el ciclo celular y la respuesta a los estímulos no son los normales. Los modelos murinos son lentos y caros y además, de forma similar a su empleo en cosmética, plantean problemas de ética en la investigación. Por eso se han buscado modelos alternativos, destacando entre todos ellos el pez cebra (*Danio rerio*), la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el gusano *Caenorhabditis elegans*. El uso del pez cebra como modelo ha cobrado fuerza en la última década. Al ser un vertebrado tiene un aparato circulatorio completo y su sistema inmunológico está muy bien conservado con respecto al humano. Sin embargo, tiene grandes desventajas, como su larga esperanza de vida o una disponibilidad limitada de modelos que mimeticen enfermedades humanas o condiciones de salud. Por su parte, *Drosophila* también es un modelo popular, pero por

sus características plantea dificultades técnicas de manejo rutinario en el laboratorio, lo que hace que sea un sistema de bajo rendimiento y difícil de escalar.

Frente a todas estas problemáticas, *C. elegans* presenta múltiples ventajas. Es un animal pequeño y no patógeno, lo que implica que no se precisan grandes instalaciones ni medidas de contención biológica para trabajar con él. Fue el primer animal cuyo genoma fue totalmente secuenciado y anotado detectándose que, dependiendo de la herramienta bioinformática utilizada, entre el 60 y el 80% de los genes humanos tienen homólogos en el genoma del gusano. Es posible generar mutantes de pérdida de función mediante RNAi, de hecho en la Universidad de Minnesota hay una magnífica colección de mutantes de acceso público (<http://cbs.umn.edu/cgc/home>). Por si todo esto fuera poco, anatómicamente es un organismo muy simple, pero tiene un tracto digestivo completo y un sistema nervioso bien definidos y un mapa neuronal disponible. También tiene una cutícula rica en colágeno al igual que la piel humana. Finalmente tiene una esperanza de vida corta de poco más de tres semanas, lo que le convierte en un modelo idóneo de envejecimiento.

Todas estas propiedades son de enorme interés para el desarrollo de alimentos funcionales. Pero hay otra tan importante como éstas. La legislación europea prohíbe el uso de animales en la investigación cosmética. Además, hay muchas empresas alimentarias que han firmado acuerdos con organizaciones en contra del maltrato animal por los que se comprometen a no probar las bondades de sus productos en modelos animales. Pues bien, según la normativa legal >>>

Agregación amiloide
Daño oxidativo al DNA
Diabetes
Efecto energizante
Envejecimiento
Estrés oxidativo
Fotoenvejecimiento
Infecciones bacterianas
Infecciones virales
Inflamación
Obesidad
Regeneración de piel



- Moléculas aisladas
- Fracciones cromatográficas
- Extractos celulares
- Probióticos
- Aceites
- Alimentos sólidos pulverizados
- Bebidas carbonatadas
- Café
- Cerveza
- Productos lácteos (yogurt)
- Zumos de frutas

Figura 2

A la izquierda se muestran todos los ensayos preclínicos desarrollados en *C. elegans* que son de utilidad en la evaluación de alimentos e ingredientes funcionales. En la parte superior derecha se muestran todos los posibles sustratos a ensayar. La parte inferior derecha muestra matrices alimentarias funcionales que han sido evaluadas en los distintos modelos de *C. elegans*.

>>> vigente en la UE y en EE.UU, *C. elegans* al carecer de cerebro no se considera un animal. Esta circunstancia permite investigar con él sin entrar en conflictos éticos.

En base a todo ello, hace once años comenzamos en nuestra compañía el desarrollo del modelo de evaluación de alimentos e ingredientes funcionales usando *C. elegans*. A lo largo de estos años hemos desarrollado todos los modelos que aparecen reflejados en la *Figura 2*. Como se observa en la misma disponemos de modelos para el análisis del estrés oxidativo, la inflamación, el metabolismo de las grasas y su deposición, el acúmulo de la placa amiloide, la proliferación de distintos patógenos bacterianos o virales,

el envejecimiento y la longevidad e incluso para la regeneración de la piel. Incluso sería posible disponer de paneles para la memoria o la adicción a diferentes sustancias. Es un modelo muy flexible, donde es posible ensayar ingredientes funcionales como ácidos grasos, péptidos activos, polifenoles o proteínas, extractos naturales, probióticos, o incluso alimentos y bebidas. Una vez seleccionado el compuesto de interés basta con realizar experimentos de transcriptómica y/o metabolómica comparativa entre cultivos control con placebo y cultivos con la muestra de interés para definir que rutas metabólicas están afectadas. Posteriormente es posible confirmar dichas rutas y llegar a un mayor nivel de definición utilizando mutantes (*Figura 3*).



Figura 3

El modelo de evaluación en *C. elegans* permite detectar las rutas afectadas por el alimento o ingrediente funcional mediante ensayos de transcriptómica y/o metabolómica. La gran ventaja de este nematodo es poder confirmar estos resultados en ensayos in vivo usando la amplia colección de mutantes existentes. El resultado es la definición de biomarcadores clave que poder seguir en ensayos clínicos con voluntarios humanos sanos.

Antes de narrar algunos casos de éxito, hay que aclarar que el uso de *C. elegans* también tiene limitaciones. La más importante de todas es que carece de sistema circulatorio y que tan sólo tiene una forma primitiva de sistema inmune innato, pero carece sistema inmune adaptativo. Además, su distancia evolutiva con los primates hace que cualquier cuestión que tenga que ver con la toxicología de los productos ingeridos sea difícilmente comparable con la situación en humanos. Hechas estas excepciones que son importantes hay que refrendar que todo lo demás que afecta a fenotipos de interés en alimentación funcional si está conservado. Veamos a continuación algunos casos.

Comencemos con el ácido linoleico conjugado (CLA), un ingrediente funcional conocido por ser eficaz frente a la obesidad en diferentes mamíferos incluido el ser humano. Hace varios años estudiamos qué sucedía cuando se alimenta *C. elegans* con CLA. Observamos una reducción muy significativa de la acumulación de grasa. Al estudiar el transcriptoma de *C. elegans* inducido por esta ingesta detectamos una regulación positiva de la energía y el metabolismo de las proteínas, consistente

***C. elegans* es un modelo de evaluación para el futuro. Es tiempo para pensar en estrategias de automatización que permitan ir a escrutinios masivos que nos permitan dirigirnos al mundo farmacéutico, como también lo es para desarrollar nuevos modelos que permitan estudiar comportamiento o apetencias nutricionales.**

con las observaciones descritas para este ingrediente en los mamíferos. También en colaboración con el grupo de Gianfranco Grompone en Danone Research desarrollamos un protocolo de escrutinio para la búsqueda en *C. elegans* de probióticos con efecto antiinflamatorio. Seleccionamos una cepa del género *Lactobacillus* con un fuerte efecto antiinflamatorio. Usando mutantes de pérdida de función de *C. elegans* delimitamos que el efecto antiinflamatorio del probiótico estaba mediado a través de la vía similar a la insulina del nematodo, una ruta muy conservada con respecto a la presente en seres humanos. En concreto afecta al factor transcripcional DAF-16, el ortólogo en el nematodo al factor transcripcional FOXO de humanos. De hecho, posteriormente en un modelo murino de colitis pudimos comprobar que esta cepa tenía un perfil de eficacia similar a la prednisolona. (Lee, Hench, y Ruvkun, 2001). Muy recientemente,

hemos utilizado el mismo modelo de para comprobar la capacidad antiinflamatoria de una cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* obtenida desde kéfir. Finalmente destacar que usando distintos cepas transgénicas y/o cepas mutantes pero con aproximaciones de trabajo similares, hemos encontrado péptidos activos del cacao que inhiben la agregación del péptido amiloide y un probiótico del género *Bifidobacterium* con efecto en síndrome metabólico.

Sin duda *C. elegans* es un modelo de evaluación para el futuro. Es tiempo para pensar en estrategias de automatización que permitan ir a escrutinios masivos que nos permitan dirigirnos al mundo farmacéutico, como también lo es para desarrollar nuevos modelos que permitan estudiar comportamiento o apetencias nutricionales. La gran ventaja de *C. elegans* es el buen conocimiento de su biología que deja todo en manos de la imaginación del investigador. ■

PARA LEER MÁS

Martorell P, Forment JV, de Llanos R, Montón F, Llopis S, González N, Genovés S, Cienfuegos E, Monzó H, Ramón D. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols as an antioxidant food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011): 2077-85.

Martorell P, Llopis S, González N, Montón F, Ortiz P, Genovés S, Ramón D. *Caenorhabditis elegans* as a model to study the effectiveness and metabolic targets of dietary supplements used for obesity treatment: the specific case of Tonalin®. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012): 11071-79.

Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, Fernández-Calero T, Tiscornia I, Bollati-Fogolin M, Chambaud I, Foligné B, Montserrat A, Ramón D. Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 7 (2012): e52493.

Martorell P, Bataller E, Llopis S, González N, Álvarez B, Montón F, Ortiz P, Ramón D, Genovés S. A cocoa peptide protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress and neurodegeneration. *PLOS ONE* 8 (2013): e63283.

Martorell P, Llopis S, González N, Chenoll E, López Carreras N, Aleixandre A, Chen Y, Karoly ED, Ramón D, Genovés S. Probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145 reduces fat content and modulates lipid metabolism and antioxidant response in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (2016): 3462-72.