



Valorización de Recursos Marinos: Nutracéuticos y Moléculas con Actividad Terapéutica



CETMAR
CENTRO TECNOLÓGICO DEL MAR

Coordinadores:

Noelia Estévez Calvar

Uxía Vázquez Ferreiro

Pilar Sieiro Piñeiro

Julio Maroto Leal

Valorización de Recursos Marinos: Nutracéuticos y Moléculas con Actividad Terapéutica

COORDINADORES:

Noelia Estévez Calvar

Uxía Vázquez Ferreiro

Pilar Sieiro Piñeiro

Julio Maroto Leal

Edita:

© Centro Tecnológico del Mar - Fundación CETMAR

Coordinación del libro:

Noelia Estévez Calvar, Uxía Vázquez Ferreiro, Pilar Sieiro Piñeiro, Julio Maroto Leal

Depósito Legal:

VG 132-2014

ISBN:

978-84-695-9556-5

Diseño e impresión:

Tórculo Artes Gráficas, S.A.

Prólogo

Todos los ecosistemas conocidos, marinos y terrestres, basan su existencia y continuidad, y por tanto su éxito, en un denominador común relacionado con sus mecanismos internos de funcionamiento: por un lado, no se desaprovecha nada de lo que se produce, sea bajo la forma de energía que fuere, y por otro, los organismos superiores situados en la cúspide de la pirámide trófica nunca utilizan más alimento (energía) que la que la base del ecosistema (producción primaria) es capaz de generar. Estas dos pautas inamovibles, claves en la perpetuidad de la vida y la rentabilidad de los ecosistemas, soportan y otorgan “sostenibilidad” a los mismos.

La economía actual se ha desarrollado de espaldas a esas dos directrices. Cualquier sector industrial, incluido el pesquero, ha crecido al amparo de dos supuestos sin duda erróneos y opuestos a los anteriores: considerando que los recursos disponibles (producción primaria) eran inagotables y, por tanto, haciendo un uso de ellos por encima de su umbral natural de producción y, en segundo término, fomentando un crecimiento exponencial para el cuál no se pensaba existirían límites. Hoy día sabemos que la única economía estructuralmente estable, y con posibilidades de prevalecer en el tiempo, es la “sostenible”, es decir, aquella cuya filosofía aboga por la renovación y cuidado de las materias primas y los recursos en que se fundamenta cualquier actividad industrial.

La actividad pesquera no es ajena a esta dinámica, y está sobradamente contrastado el hecho de que genera una gran cantidad de subproductos que sólo son aprovechados parcialmente. Igualmente, es conocido el enorme potencial que dichos subproductos tienen y, la necesidad de hacer un uso completo y sostenible de las materias primas se abre paso cada día como uno de los baluartes de la economía. Es por tanto necesario sacar valor en mayor medida a estas materias primas e introducir las en canales comerciales que desemboquen en empresas especializadas en la valorización.

De la misma manera, multitud de organismos marinos, especialmente invertebrados y algas, representan un reservorio inmenso, aún por investigar, que atesora un sin fin de principios bioactivos y moléculas con actividad terapéutica de sumo provecho en el campo de la farmacología. A todos los efectos, podría catalogarse a este variado y diverso,

filogenéticamente hablando, conjunto de organismos como infrautilizado y con un enorme potencial de valorización, si bien por motivos distintos a los subproductos anteriormente mencionados.

El término valorización, muy utilizado en los últimos años, encuentra cada vez más posibilidades y adeptos. Cuando se habla de valorización, de inmediato pensamos en productos derivados tradicionales; sin embargo, sus posibilidades son cada vez más amplias y, en algunos casos, el destino final que pudiera darse a estos recursos es un tanto inesperado. Este es precisamente el terreno que nos ocupa y que dará contenido al presente volumen. Resulta cuando menos chocante, que puedan desarrollarse aplicaciones biomédicas (de hecho muchas de ellas ya presentes en los mercados) a partir de lo que hasta hace unos años se catalogaban como residuos o desechos. Ciertamente es así, y la finalidad que subyace en esta iniciativa es la de hacer un monográfico dedicado a este campo de la investigación y de la industria.

Tras un análisis pormenorizado, se podría afirmar que las aplicaciones existentes en este campo giran en torno a tres ejes fundamentales: nutraceuticos (productos derivados funcionales); moléculas con actividad terapéutica y biomateriales (ingeniería de tejidos y medicina regenerativa). Todos los capítulos que conforman el presente volumen van a centrarse en los dos primeros aspectos señalados, reservándonos el tercero, de igual importancia que estos, para otra posterior oportunidad.

En los últimos años, se han abierto paso irreversiblemente en el mercado los denominados Productos Derivados Funcionales, también llamados alimentos funcionales o nutraceuticos, de los cuáles, una amplia gama se fundamenta en principios extraídos de subproductos marinos tales como los aceites poliinsaturados PUFAS, concentrados de colágeno, etc. El avance irrefrenable de esta amplia variedad de productos, cuyo mejor indicador es su creciente cuota de mercado, se asienta en las nuevas tendencias nutricionales que fomentan la ingesta de alimentos que, además de nutrirnos, mejoren nuestro bienestar y salud, pues es un hecho científicamente constatado que ambos factores están íntimamente ligados. Se requieren por tanto alimentos que nos proporcionen un plus de salud, mejoren nuestras funciones, nuestro bienestar y nos ayuden a prevenir las enfermedades.

Durante millones de años, las innumerables formas de vida marina han desarrollado estrategias para la adaptación, la defensa, el ataque o la comunicación entre organismos, generando un ingente arsenal de productos que pueden ser utilizados para mejorar

la salud humana. Los océanos siguen proporcionando nuevas oportunidades para el descubrimiento de medicamentos, los cuáles abarcan una amplia variedad de estructuras químicas y funcionalidades que les otorgan gran eficacia biomédica.

El proyecto de acrónimo MARMED y título *Development of innovating biomedical products from marine resources valorisation*, al amparo del cual tiene lugar la edición de este libro, centra sus esfuerzos y cometidos, entre otros, en las dos líneas de investigación descritas. En Noviembre del año 2012, y como una de las actividades afines al proyecto, tuvo lugar un Seminario dedicado íntegramente a la problemática de los Productos Nutraceuticos y Alimentos Funcionales de Origen Marino.

El seminario tuvo un notable eco y acogida, y durante su desarrollo, los asistentes dejaron entrever un gran interés. Nació así la idea de publicar este libro en donde quedara recogida toda la información vertida durante aquella Jornada, y que representara un compendio de los diferentes aspectos que, a día de hoy, concurren en esta problemática. Adicionalmente, se optó por completar su alcance añadiendo otros capítulos complementarios relativos a Moléculas con Actividad Terapéutica de origen marino, de manera que se cubrieran así dos de los ejes identificados como vías de valorización biomédica. Manifiestamente, es intención y vocación de este texto servir de guía y orientación a todos aquellos que quieran ahondar en estas líneas de trabajo y descubrir sus posibilidades.

Este libro no hubiera llegado a ser una realidad de no haber contado con la desinteresada colaboración de un amplio número de profesionales; nuestro empeño no hubiera llegado a buen puerto de no mediar su generosa aportación. Estamos en débito con todos los científicos y representantes de empresa que han dado forma y contenido al texto, al igual que al ya mencionado seminario. A todos ellos, desde estas páginas, agradecemos su altruista esfuerzo y compromiso, y dejamos constancia de nuestra gratitud y reconocimiento.

Centro Tecnológico del Mar
Fundación CETMAR

Índice Libro

1. Los retos de los alimentos funcionales y nutraceuticos en Europa. Estado del arte y perspectivas	
Andreu Palou, Josep Mercader, Andreu Palou-March, Francisca Serra	9-31
2. Nutrigenómica: nuevas herramientas al servicio de la salud a través de la personalización de la nutrición y el diseño de nutraceuticos	
David de Lorenzo	33-43
3. Perfil metabolómico y lipidómico como herramienta para la determinación de ingesta y función de ácidos grasos omega 3	
José CE Serrano, Mariona Jové, Ana Belen Granado-Serrano, Anna Casañé, Manuel Portero-Otín	45-73
4. Compuestos de origen marino y su aplicación en alimentación funcional y cosmética	
Juristo Fonollá Joya y Teresa del Moral	75-87
5. Biotecnología marina: utilización de productos de origen marino para reducir la incidencia de enfermedades crónicas	
Ignacio Etcheverría Rey	89-117
6. Desarrollo de compuestos con actividad farmacológica a partir de productos naturales de origen marino	
Valter Lombardi	119-155
7. Neuro-protección y organismos marinos.	
Iván M. Carrera	157-169
8. Productos marinos, enfermedades y fármacos: hacia una mejor integración entre ciencias marinas, nutrición y farmacología humana	
Juan Carlos Carril	171-193
9. Aproximación al estudio de las empresas europeas vinculadas a la actividad	
Noelia Estévez, Uxía Vázquez, Pilar Sieiro, Julio Maroto	195-236

Los retos de los alimentos funcionales y nutracéuticos en Europa.

Estado del arte y perspectivas

Andreu Palou¹, Josep Mercader², Andreu Palou-March^{1,2} y Francisca Serra^{1,2}

1. Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (LBNB) de la Universitat de les Illes Balears (UIB) y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III).

Edifici Mateu Orfila. Carretera de Valldemossa km 7,5. 07122 Palma de Mallorca

2. Alimentómica S.L, Empresa de Base tecnológica (001) de la UIB.

e-mail: andreu.palou@uib.es

Resumen

Los referentes en alimentación están cambiando de forma muy acelerada y se impone la noción de que nuestro bienestar y salud dependen, en buena parte, de cuidar mucho más nuestra comida, bastante más allá de las necesidades nutricionales consideradas clásicamente (Palou, 2006; Palou et al., 2004). Se requieren alimentos que nos proporcionen un plus de salud, mejoren nuestras funciones, nuestro bienestar y nos ayuden a prevenir las enfermedades. Hasta hace poco la legislación existente en los países europeos, fruto del equilibrio de intereses sociales y sectoriales, no permitía a los alimentos referirse a estas propiedades y eso ocurría mientras la ciencia iba aportando pruebas contundentes en sentido contrario y surgían ejemplos específicos, como el de los esteroides vegetales o ciertas fibras dietéticas, capaces de reducir substancialmente los niveles sanguíneos de colesterol, un reconocido factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (cardiopatía coronaria). Al mismo tiempo la publicidad en el campo de los alimentos-salud, encontraba un campo abonado para la ambigüedad e incluso el engaño, con espacio para promocionar muchos otros alimentos que no han demostrado efectos beneficiosos específicos; enmarañando a unos consumidores, conocedores de la existencia de avances científicos en campos análogos pero incapaces de poder contrastar la evidencia disponible para el alimento en cuestión, invadidos por una publicidad cuando menos engañosa. Había que poner orden en este caos y, sobretodo, a la anarquía existente en los mercados causada por una actuación dispar en los diferentes estados miembros, con controles, regulaciones e interpretaciones por parte de la administración muy diferentes en unos países y en otros, dificultando el funcionamiento del mercado único en la UE. El Reglamento (CE) Nº 1924/2006, relativo a las declaraciones de salud (nutricionales y de propiedades saludables) en los alimentos (EU, 2007), ha venido a poner ese orden, al armonizar las normas que rigen en todos los estados miembros de la UE, estableciendo criterios claros, aunque mejorables, para que el consumidor pueda confiar

mas en los mensajes sobre las propiedades saludables (*health claims*) de los alimentos y sus componentes. Esencialmente, esta legislación establece que las declaraciones de salud en los alimentos “deben estar substanciadas científicamente”, demostradas mediante pruebas científicas reconocidas; y fija un organismo independiente, la EFSA, como evaluador garante de que las declaraciones presentes en el mercado, cuenten con este aval científico. Actualmente, se ha avanzado en este objetivo y sólo unos 250 *health claims* o declaraciones de propiedades saludables están vigentes, han sobrevivido de entre más de dos millares que han sido evaluadas por la EFSA y que antes estaban en el mercado, sin justificación científica suficiente. Para demostrar efectos beneficiosos, en los pocos casos (11%) en que así ha sido, los estudios se han basado en medir el efecto de alimentos o componentes alimentarios sobre biomarcadores o factores de riesgo, representativos de un beneficio para la salud; por ejemplo, el efecto de reducción de los niveles de colesterol sanguíneo, antes referida. Sin embargo, para muchos efectos, incluidos muchos posibles efectos beneficiosos no se ha podido obtener demostración al no disponer aun de buenos biomarcadores y en estos casos los *health claims* no se han admitido.

En el futuro cercano, la disponibilidad de nuevos biomarcadores y la aplicación de las nuevas tecnologías ómicas permitirán poder hacer un seguimiento de numerosos otros efectos beneficiosos para la salud y el bienestar de las personas: nuevos beneficios, nuevos *health claims*. Además, actualmente el efecto se reconoce como probado sólo si efectivamente se ha demostrado así en poblaciones humanas, representativas de la población general o de una subpoblación o tipo de personas (por ejemplo, la población adulta, la infantil, la se uno u otro sexo, etc.) a la que va destinado el alimento y el *health claim* asociado. Pero no todos los individuos de una población o subpoblación respondemos igual a los alimentos y a sus componentes; en el futuro los *health claims* se podrán incluso personalizar, incluso para cada individuo y ajustados a lo largo de su vida, teniendo en cuenta no sólo sus características genéticas, sino también los cambios epigenéticos, sucesos, experiencias y adaptaciones que van determinando nuestra alimentación, estilo de vida y cualesquiera características de nuestro entorno que nos afectan y perfilan nuestra individualidad a lo largo de nuestra vida.

Introducción

Queremos alimentos que nos den más salud, bienestar y felicidad, más allá de cubrir las necesidades consideradas clásicamente (Palou, 2006; Palou et al., 2004). Durante el siglo pasado las principales preocupaciones se sucedieron, primero en asegurar la disponibilidad de alimentos básicos, y posteriormente en asegurar su inocuidad y, en Nutrición, evitar las enfermedades carenciales de vitaminas y otros nutrientes. Hoy las personas en nuestra sociedad

demandan “un plus de salud” a los alimentos (*alimentos funcionales*), sean en formato tradicional, como complementos alimentarios o en forma de los denominados *nutracéuticos* (se refieren a los alimentos o, más generalmente, a los complementos alimenticios que se ofrecen en forma de pastillas, píldoras, sobres o similares) y los objetivos se concentran, por un lado en afrontar y reducir el riesgo de las denominadas enfermedades crónicas de nuestro tiempo (enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, diversos tipos de cáncer, osteoporosis, enfermedades autoinmunes, depresión y desórdenes cognitivos, etc.) y, por otro lado, la mejora de cualesquiera funciones de nuestro organismo, que nos aporte salud, satisfacción o, en general, mayores cotas de bienestar.

Satisfacer estas nuevas demandas constituye el primer gran reto en el desarrollo de *nutraceuticos* y alimentos funcionales (Palou, 2006; Polledo et al., 2011). El segundo gran reto, es la nutrición y alimentación personalizadas (Palou, 2007), cada vez más a nuestro alcance gracias a las nuevas tecnologías ómicas. La adopción de medidas sociales y legislativas debería permitir una definitiva penetración de los alimentos en el campo de la salud y el bienestar.

Aquí consideraremos ambos retos, el primero de ellos ya enmarcado y potenciado por los desarrollos legislativos europeos (básicamente el Reglamento CE 1924/2006 sobre declaraciones de propiedades saludables o *health claims* en alimentos) (EU, 2007); el segundo, aun en ciernes, fundamenta del desarrollo de grandes proyectos colaborativos en Europa tales como (BIOCLAIMS, 2010), y se asentará en las bases de datos que permitirán la nutrición individualizada; y es esencial tenerlos en cuenta en cualquier proyecto competitivo a medio y largo plazo.

1. El nuevo marco regulatorio europeo de declaraciones de salud (de propiedades saludables y nutricionales) en los alimentos y el planteamiento de los perfiles nutricionales

En Europa, el Reglamento (CE) no 1924/2006, relativo a las declaraciones de salud nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (EU, 2007), armoniza las normas que rigen en todos los estados miembros. Se ha avanzado mucho y en este momento existe ya un registro comunitario de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables (<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>) aceptadas, que son las únicas que se pueden utilizar (alrededor del 10% de las evaluadas y que se venían manejando en la publicidad). Junto al redactado específico de cada declaración se establecen unas condiciones de uso (dosis, forma de ingesta, etc.) para las cuales se ha demostrado el efecto beneficioso. Lo esencial es que

sólo deben permitirse las declaraciones de salud o *health claims* que han sido demostradas científicamente, y se establece un organismo, la EFSA (*European Food Safety Authority*; Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria) a quien le corresponde dictaminar si un *health claim* ha sido o no demostrado.

Aunque aún no se haya concretado en la práctica, la legislación prevé prohibiciones de declaraciones nutricionales o de salud para aquellos alimentos que no respondan a un “perfil nutricional” mínimamente saludable (alimentos ricos en grasa saturada, sal, azúcares sencillos, etc.). Definir este perfil está siendo, sin embargo, muy controvertido; estaba previsto para 2009 pero ha sido imposible hasta ahora y puede que la inconcreción se prolongue bastante. La idea subyacente era que, dado que las declaraciones de salud pueden estimular el consumo de aquellos alimentos que las lleven, no parece razonable que tales alegaciones beneficien el consumo de alimentos con un perfil nutricional inadecuado. Con todo, aun sin concretarse, innovar en alimentación teniendo en cuenta los criterios generales que se deducen de lo discutido hasta el momento ya está en los ejes de cualquier directriz innovadora en el campo de los alimentos-salud (figura 1). Puede ser que, de momento, sea políticamente más correcto seguir diciendo que no hay alimentos buenos o malos (pues es cierto que los efectos dependen de las dosis); pero el conocimiento científico está aportando cada día más evidencia de que hay diferencias muy marcadas entre los efectos de los distintos alimentos y componentes de los mismos, y a la larga, no deben ser ignoradas.

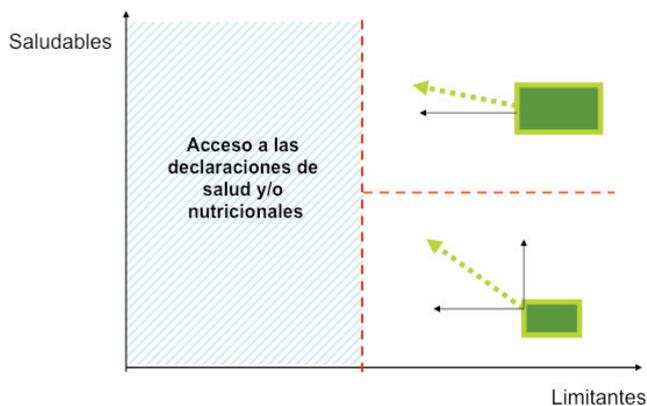


Figura 1. Directrices para la innovación basadas en el perfilado nutricional. en un ejemplo, para un producto alimenticio se suman las cantidades (expresadas como porcentajes de la ingesta máxima recomendable) de los diferentes componentes considerados como menos saludables o *limitantes* (por ejemplo: sal, grasa saturada, etc.); la suma de estas cantidades nos dan un valor en el eje de abscisas. Análogamente, se suman las cantidades de los componentes considerados -entre ciertos límites- como más *favorables* (por ejemplo: fibra, ácidos grasos poliinsaturados, esteroides vegetales, etc.), y el valor obtenido se sitúa en el eje de ordenadas. Alimentos, que estén situados como en la figura tenderán a modificarse en el sentido indicado por las flechas.

En el futuro (ya emergente) la idea de favorable o desfavorable puede ser diferente para cada sector de población caracterizado por determinadas tendencias genéticas o adquiridas (por ejemplo, de riesgo cardiovascular). En todo caso, estas coordenadas nos dan la posición del alimento en el espacio bidimensional (en la figura se representan dos posibles productos, en forma de rectángulos). De esta posición podemos deducir la dirección de las modificaciones que conviene introducir para obtener un producto con un mejor perfil nutricional. En un futuro a medio/largo plazo, (en el modelo teórico propuesto, no ajustado a la situación actual) la zona del cuadrante superior izquierdo podría dar acceso a las declaraciones de salud y en esa dirección deberían dirigirse las innovaciones orientadas a perfiles más saludables.

Todo ello transcurre en paralelo a la perspectiva de una mejor y más fácil formación e información alimentaria del consumidor y los cambios irán dando paso desde una posición paternalista de la administración (con recomendaciones generales de comer saludable y variado en general), hasta una situación que propicia más la elección fundamentada del consumidor de aquellos alimentos e ingredientes de la dieta que más le convengan a su salud y bienestar, cada vez más de forma personalizada.

El nuevo Reglamento (CE) 1924/2006 contiene los siguientes 3 aspectos fundamentales (EU, 2007):

1. El mandato de que las declaraciones de salud deben estar substanciadas científicamente, y que tal acreditación depende de una opinión independiente, la EFSA (European Food Safety Authority). Esto se ha implementado ya y se continua avanzando.
2. Sólo los alimentos con perfiles nutricionales apropiados podrán llevar declaraciones de salud. El concepto de perfil nutricional (véase más adelante) es, sin embargo, controvertido y no se han cumplido las previsiones: no se han establecido dichos perfiles.
3. La protección de la propiedad intelectual (por 5 años) de los resultados o datos –en la práctica el derecho exclusivo a utilizar un *health claim*– de estudios e investigaciones que la EFSA haya considerado determinantes para informar favorablemente la acreditación de una declaración de propiedad saludable. Ello supone un enorme estímulo a la I+D en el sector alimentario, aunque inciden limitaciones importantes.

1.1. Tipos generales de declaraciones de salud en los alimentos y subtipos

Las declaraciones de salud, siendo todas de tipo voluntario, pueden ser: a) **nutricionales**, las que se refieren al *contenido* o composición que se desea declarar en un alimento; y b) de **propiedades saludables** (comúnmente llamadas *health claims*), las que se refieren a los *efectos* que los alimentos (o componentes de los mismos) ejercen sobre nuestra salud.

En su formulación jurídica, se entiende por «**declaración nutricional**» cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales

benéficas específicas con motivo del aporte energético (valor calórico) que proporciona, que proporciona en un grado reducido o incrementado, o que no proporciona; y/o de los nutrientes u otras sustancias que contiene, que contiene en proporciones reducidas o incrementadas, o bien que no contiene. Por su parte, se entenderá por «**declaración de propiedades saludables**» (*health claims*) cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud. Además, se entenderá por «**declaración de reducción del riesgo de enfermedad**» cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un *factor de riesgo* de aparición de una enfermedad humana.

1.2. Declaraciones nutricionales

En el caso de las declaraciones nutricionales (referentes al contenido o componentes de un alimento), las únicas que son actualmente posibles son las que aparecen en el Anexo del Reglamento y que en 2013 eran unos 30 tipos de declaraciones cuya relación actualizada puede consultarse en el registro europeo (<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>) o en su adaptación española disponible en AESAN (http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/detalle/registro_comunitario_declaraciones.shtml). Se trata de declaraciones del tipo de “bajo contenido en sal/sodio”, “fuente de”, “rico en”, etc.: es decir, sujetas a límites cuantitativos claramente establecidos. Tal anexo es modificable, incorporando nuevas posibilidades o alterando las existentes, previa justificación científica (informada por EFSA) y en los términos expresados por la reciente Reglamentación Europea.

2. Declaraciones de propiedades saludables o **HEALTH CLAIMS**

Dentro de los *health claims*, podemos distinguir: b1) declaraciones de propiedades saludables *funcionales* (Artículo 13 del Reglamento); y los dos subtipos referidos en el Artículo 14: de *reducción de riesgo de enfermedad* y las relativas al *desarrollo y la salud de los niños*.

Además, desde otro ángulo, pueden distinguirse las declaraciones de salud *funcionales-génicas* (artículo 13.1)(las puede llevar cualquier alimento que reúna las condiciones de uso establecidas para la declaración) respecto de las *funcionales basadas en pruebas científicas recientemente obtenidas* y/o que incluyan una eventual *protección de los datos* sujetos a derechos de propiedad (artículo 13.5)(estas últimas con un periodo de protección

o uso exclusivo del solicitante de 5 años). Ambos tipos de declaraciones pueden acreditar a un alimento, a una categoría de alimentos o a un componente alimentario que puede encontrarse en diferentes alimentos o productos, o pueden acreditar a un producto o a una marca o línea de productos concretos.

Sólo 248 declaraciones de propiedades saludables o *health claims* han sido acreditados (incluidas en el Registro comunitario, a principios de 2014), entre un total de 2123 solicitudes registradas y evaluadas. *Una tasa de éxito del 11,5%*. La mayoría (70%) corresponden a los nutrientes tradicionalmente considerados esenciales (vitaminas, ácidos grasos esenciales y minerales esenciales).

Una declaración debe estar fundamentada científicamente mediante la toma en consideración de la totalidad de los datos científicos disponibles y la ponderación de las pruebas o evidencias. En el caso de los *health claims*, deben distinguirse los diferentes procedimientos para su acreditación, que es diferente para las declaraciones funcionales (Art.13.1) incluidas en la lista de preexistentes en el mercado (Art.13.3), para las nuevas que se tuvieran que ir incorporando a la referida lista (Art.13.5) y para las declaraciones de reducción de riesgo de enfermedad o las relativas a los niños (Ar.14).

2.1. La lista de claims funcionales. Un proceso complejo y controvertido (Artículos 13.1 y 13.3 del Reglamento)

Se trata de la lista de claims ganadores, los que pueden continuar en el mercado, de entre los más de dos mil propuestos. En el caso de las declaraciones funcionales (Art.13.1), el primer paso fue considerar la práctica totalidad de las preexistentes en el mercado, en los diferentes países de la UE, para determinar cuales de ellas podían seguir utilizándose y cuales no. Se trataba de obtener una lista positiva, y se arbitró un procedimiento para recoger las solicitudes de las partes interesadas en cada estado miembro, que deberían ser remitidas a la Comisión a más tardar el 31 de enero de 2008, acompañadas de las condiciones de aplicación y de las referencias de justificación científica pertinentes. Al respecto, el Reglamento establece que, previa consulta a la Autoridad, la Comisión debía adoptar una lista comunitaria de declaraciones permitidas y todas las condiciones necesarias para el uso de dichas declaraciones a más tardar el 31 de enero de 2010; lo que no se ha cumplido hasta 3 años después, y subsisten dudas.

El proceso fue mucho más complicado de lo previsto; de hecho, prácticamente ninguno de los plazos previstos se cumplió y se han producido, sobre la marcha, diversos ajustes o

adaptaciones muy relevantes y controvertidos. Inicialmente se plantearon más de 40.000 posibilidades de *claims*, que se habían preparado en los distintos países sin instrucciones claras y con un rigor en su preparación bastante diverso dependiendo del país, por lo que se tuvo que proceder a un cribado o filtrado de las duplicidades, unificando *claims* y alimentos similares, eliminando propuestas claramente desenfocadas, etc., y cabe reconocer que no hubo unas reglas de juego claramente establecidas y expuestas para permitir una efectiva intervención de empresas y otras partes interesadas. Al final, tras más de 3 años (2007 a 2010) se pudo completar una *lista*, primero provisional y posteriormente consolidada con 4637 entradas (denominadas IDs); y se emplearon más de 3 años (2008 a 2011) en su evaluación científica por el Panel de EFSA. Fue un proceso de gran impacto en el sector, con trascendencia mediática importante y en el que, en lugar de lo deseado por las empresas, no hubo una única publicación de la EFSA conteniendo las opiniones sobre todos los *claims* propuestos (ningún solicitante deseaba el protagonismo para sus *claims* rechazados, y mucho menos en solitario), ni tampoco una sucesión de opiniones a medida que se fueron adoptando (la práctica habitual de los Paneles de EFSA). Se optó por una forma intermedia, y se fueron haciendo públicos, sucesivamente, cuatro paquetes de opiniones.

Entre los numerosos aspectos de este proceso destaca que, ante las perspectivas de una evaluación científica desfavorable que hubiera afectado, de modo generalizado, a prácticamente todos los productos/extractos botánicos, el 27 de septiembre de 2010 la CE decidió excluirlos de la evaluación y quedaron (aún lo están) pendientes de futuras decisiones o soluciones técnicas o políticas. El problema se puso de manifiesto cuando se constató que el Panel de EFSA no podía aceptar (teniendo en cuenta los criterios derivados del Reglamento) el uso tradicional (la denominada “evidencia histórica”) como prueba sólida determinante de substanciación científica de los *claim*. Dado que este uso tradicional (evidencia histórica) es el principal elemento que se tiene en cuenta para aceptar “productos botánicos medicinales tradicionales”, a veces con idéntica composición e indicaciones que los productos botánicos clasificados como alimentos (complementos alimentarios), el no aceptar este tipo de evidencia hubiera conducido a rechazar los *claims* en los complementos alimentarios mientras que los mismos productos, si se tramitaban como productos medicinales, podían acceder a *claims* similares. Estaríamos ante una situación de competencia “aparentemente injusta” entre dos sectores económicos rivales, teniendo en cuenta que un mismo producto puede ser considerado un complemento alimentario en un Estado de la UE y, al mismo tiempo, como un producto medicinal en otro. Además, con el funcionamiento del mercado único no hay barreras entre países y los productos circulan libremente.

Adicionalmente, en este proceso se emplearon 2 años (2009-2011) para preparar la propuesta de Reglamento con la referida “lista” (acuerdo del comité SCOFCAH, formado por los estados miembros y CE). Fue sometida al Parlamento Europeo que, tras rechazar una objeción (basada en agravios comparativos y procesales) la aprobó finalmente el 21 de marzo de 2012 (EC, 2012) y dicho Reglamento entró en vigor el 14 de diciembre de 2012 e incluyó una lista de 222 *claims* permitidos. Posteriormente, se producen dos modificaciones (EC, 2013(a), 2013(b)) pues esta lista se ha completado con nuevas disposiciones legales que incluyen 6 *claims* adicionales con entrada en vigor en Enero de 2014 (EC, 2013(b)), y otros 3 *claims* que entraron ya en vigor de modo inmediato (EC, 2013(a)), como corresponde a los *claims* que llevan consigo derechos de propiedad a favor de los solicitantes. Cabe resaltar que el uso de estos *claims* “en propiedad” queda en manos de los solicitantes durante un periodo de 5 años, y está basado en lo dispuesto en el Artículo 21 del Reglamento, ya que los datos obtenidos fueron considerados por el Panel de EFSA, determinantes para acreditar el *claim*.

Así pues, hasta el momento se han aprobado 231 *claims funcionales* (definidos por el artículo 13.1). Y estos son los *health claims* que, de entre los preexistentes en el mercado, pueden seguir utilizándose en la publicidad que se refiera a efectos *funcionales*, beneficiosos para la salud de los alimentos; junto a un pequeño número de otros *claims* (los definidos en el artículo 14 y que se consideran en un apartado posterior).

Entre los *claims* funcionales, está claro que los ganadores han sido las vitaminas y los minerales esenciales considerados tradicionalmente. Son la mayoría de los aprobados; junto a ellos, destacan ejemplos aislados de éxito, tales como algunas fibras dietéticas (control de la glucosa sanguínea, colesterol sanguíneo, control del peso), ún único caso de probiótico (resistencia a digestión de la lactosa); polifenoles de aceite de oliva (antioxidantes de lípidos de las lipoproteínas LDL); nueces (mejora funcional de los vasos sanguíneos), sustitutos de comidas (control del peso), ácidos grasos esenciales (función cardíaca normal); una serie de sustitutos del azúcar, como xilitol y sorbitol (mantenimiento de la mineralización dental o en disminución de la respuesta glucémica después de las comidas); bebidas con carbohidratos y electrolitos (deporte, actividad física) y creatina (ejercicio intenso de corta duración), entre otros (véase la lista en <http://ec.europa.eu/nuhclaims/>).

Con la adopción de la “lista”, se dió un paso trascendental en la implementación práctica del Reglamento, si bien siempre acompañado de mucha controversia pues subsisten las dudas de si estamos ante “la lista” (prevista en el Art.13.3 del Reglamento) o ante “una lista”, es decir si lo que se adoptó es sólo una “lista incompleta” (faltarían, por ejemplo los productos botánicos excluidos, quizás temporalmente, de la evaluación por la CE).

2.2. Se van a ir introduciendo cambios en la lista

Está previsto en el Reglamento que todo cambio de la lista, basado en pruebas científicas generalmente aceptadas, se adoptará previa consulta a la EFSA, y esto puede hacerse por dos vías: a) de acuerdo con el Artículo 13.4, a iniciativa de la Comisión o a petición de un Estado miembro, basado en pruebas científicas generalmente aceptadas; y b) de acuerdo con el artículo 13.5, a iniciativa de parte (empresas, típicamente), las basadas en pruebas científicas recientemente obtenidas y/o que incluyan una solicitud de protección de los datos sujetos a derechos de propiedad (excepto las que se refieran a los niños, que deben autorizarse de forma similar a las de reducción de riesgo, según se indica más adelante).

La opción por una de las dos alternativas puede conllevar ventajas e inconvenientes. En el primer caso (vía estado miembro), la solicitud no está sujeta a una normativa estricta, y puede dar lugar a adaptaciones de la solicitud durante el proceso, fruto de reflexiones o diálogo entre las representaciones, etc., lo cual puede ser útil especialmente cuando el caso no esté claro, forme parte de un conjunto de posibles casos de interés más amplio, o debido a su naturaleza, o a posibles conflictos con otras legislaciones, etc., pero los plazos pueden alargarse mucho. En el caso de una solicitud vía artículo 13.5, la normativa aplicable, las guías para la preparación de la propuestas y las reglas de juego en general, están delimitadas de forma más precisa, pero también es cierto que existe una incertidumbre derivada de la poca experiencia registrada y que hay una tradición (que no se prevé vaya a cambiar) de escasa comunicación entre el solicitante y la EFSA, que pueden hacer ponderar mejor (dependiendo de las circunstancias concurrentes en cada caso) la otra opción.

En particular, los más recientemente aprobados se refieren a ciruelas (función digestiva); alfa-ciclodextrina (respuesta glucémica postprandial); varios *claims* relativos a ácidos grasos omega-3, adicionales a los ya aprobados en la lista inicial (control de triglicéridos y presión sanguínea) y Fructosa (glucemia).

2.3. *Health claims* de reducción de riesgo de enfermedad, de crecimiento y salud de los niños, y los funcionales basados en nueva ciencia.

Los *claims* del Artículo 14 (de reducción de riesgo de enfermedad y los relativos a crecimiento y salud de los niños) se tramitan a instancia de empresas o partes interesadas, a través de un estado miembro de la UE (que ejerce un mero control administrativo) y son evaluadas por la EFSA, *caso por caso*.

El mismo procedimiento se aplica a las declaraciones de propiedades saludables funcionales correspondientes al Artículo 13.5 (basadas en pruebas científicas recientemente obtenidas y/o las que incluyan una solicitud de protección de los datos sujetos a derechos de propiedad). Estas se incluyen en un anexo aparte del Registro Comunitario, haciendo constar el hecho de esta protección del uso de tal declaración (por 5 años a favor del solicitante), salvo en caso de que un solicitante posterior obtenga autorización para la declaración sin referencia a los datos protegidos por derechos de propiedad industrial del solicitante original. Esta disposición contiene una clara intencionalidad de estimular la I+D+i en el sector alimentario, si bien existen algunas incertidumbres y ni de lejos es el mismo esfuerzo la simple compleción de un proceso de substanciación que el desarrollo de todo un programa encaminado a ello, incluidos los inicios que pueden haber sido más difíciles y costosos que la propia finalización. La aplicación en la práctica de esta disposición supone un verdadero reto, también en el campo jurídico.

2.4. Claims funcionales basados en basados en nueva ciencia y/o que incluyan protección de datos en propiedad (Claims del Artículo 13.5).

Junto a los *claims* señalados anteriormente y aprobados para un uso generalizado, hasta Enero de 2014 se han aprobado unos pocos *claims* conllevando derechos de propiedad a favor del solicitante (5 años) y basados en nueva ciencia. El *claim* pionero fue para dos tipos de extractos acuosos de tomate, para el *mantenimiento normal de la agregación plaquetaria y el flujo sanguíneo normal*. Otros 3 aprobados recientemente (EC, 2013(a)) han sido: *Mantenimiento de la mineralización dental* (Bebidas ácidas no alcohólicas reformuladas); *menor incremento de la glucemia en comparación con productos bajos en SDS (Slow Digestive STArch)* (Almidón de digestión lenta); *mantenimiento de la elasticidad de vasos sanguíneos, que contribuye al flujo sanguíneo normal* (flavonoles de cacao). En la tabla 1 se indican estas primeras 4 declaraciones de propiedades saludables funcionales acreditadas en base a nueva ciencia (basadas en pruebas científicas recientemente obtenidas y/o con protección de los datos sujetos a derechos de propiedad)

2.5. Los Health Claims de reducción de riesgo de enfermedad

Una declaración de riesgo de enfermedad no puede expresarse como de “*prevención*” de la enfermedad sino como de “*reducción de un factor de riesgo*” de la enfermedad. Así, el Reglamento precisa: “se entenderá por «declaración de reducción del riesgo de enfermedad»

Nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimentos	Declaración	Condiciones de uso de la declaración	Número del boletín de la EFSA	Norma comunitaria
Concentrado de tomate soluble en agua I y II	El concentrado de tomate soluble en agua I y II contribuye a mantener la agregación de plaquetas normal, lo cual favorece una buena circulación sanguínea	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con un consumo diario de 3 gramos de concentrado de tomate soluble en agua I o 150 miligramos de concentrado de tomate soluble en agua II en hasta 250 mililitros de zumos de frutas, bebidas aromatizadas o bebidas de yogur (a menos que el nivel de pasteurización sea elevado), o con un consumo diario de 3 gramos de concentrado de tomate soluble en agua I o 150 miligramos de concentrado de tomate soluble en agua II en complementos alimenticios tomados con un vaso de agua u otro líquido.	Q-2009-00229 y Q-2010-00809	Decisión de la Comisión 2009/980 de 17 de diciembre de 2009; y Decisión de la Comisión 2010/770 de 13 de diciembre 2010
Bebida ácida, no alcohólica y reformulada con: <ul style="list-style-type: none"> • Menos de 1 g de hidratos de car bono fermentables por 100 ml (azúcares y otros hidratos de car bono excepto polioles). • Calcio desde 0,3 hasta 0,8 moles por mol de acidulante. • pH entre 3,7 y 4,0. 	La sustitución de bebidas ácidas que contienen azúcar, como los re frescos (típicamente de 8 a 12 g de azúcares/100 ml) por bebidas re formuladas contribuye al mantenimiento de la mineralización den tal (*).	Para poder llevar la declaración, las bebidas ácidas reformuladas deberán ajustarse a la descripción del alimento objeto de la declaración.	2010;8(12):1884	Decisión de la Comisión 851/2013 de 03 de Septiembre de 2013
Almidón de digestión lenta	El consumo de productos con un elevado contenido de almidón de digestión lenta incrementa menos la concentración de glucosa en la sangre después de una comida que los productos con bajo contenido de almidón de digestión lenta (**).	Esta declaración únicamente puede utilizarse en alimentos en los que los hidratos de car bono digeribles proporcionen al menos el 60 % de la energía total y en los que, como mínimo, el 55 % de estos hidratos de carbono sean almidón digerible, del cual al menos el 40 % sea almidón de digestión lenta.	2011;9(7):2292	Decisión de la Comisión 851/2013 de 03 de Septiembre de 2013
Flavonoles del cacao	Los flavonoles del cacao ayudan a mantener la elasticidad de los vasos sanguíneos, lo que contribuye a un flujo sanguíneo normal (***).	Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 200 mg de flavonoles del cacao. Esta declaración únicamente puede utilizarse para bebidas de cacao (con polvo de cacao) o para chocolate oscuro que proporcionen, como mínimo, una ingesta diaria de 200 mg de flavonoles del cacao con un grado de polimerización de 1 a 10.	2012;10(7):2809	Decisión de la Comisión 851/2013 de 03 de Septiembre de 2013

Tabla 1. Las cuatro primeras declaraciones de propiedades saludables funcionales acreditadas en bases a nueva ciencia (Artículo 13.5 del Reglamento)

cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un *factor de riesgo* de aparición de una enfermedad humana". Así por ejemplo, en el caso de los esteroides vegetales (la primera que se informó favorablemente por el Panel de la EFSA, en 2007) la redacción es: *Se ha demostrado que los fitosteroides (esteroides vegetales) disminuyen/reducen la colesterolemia (la concentración de colesterol en sangre). Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatía coronaria.*

Estas declaraciones de reducción de riesgo deben acompañarse de una exposición en la que se indique que la enfermedad a la que se refiere la declaración posee múltiples factores de riesgo y que la alteración de uno de estos factores de riesgo puede tener o no un efecto benéfico. Todo ello debe indicarse además de cualesquiera otros aspectos que correspondan según el tipo de alimento; por ejemplo, si se trata de alimento autorizado bajo la legislación de nuevos alimentos (Novel Foods) (EU, 1997) le corresponden unas obligaciones de etiquetado que se establecieron en la propia decisión de autorización o en Reglamentos o disposiciones adicionales; por ejemplo, en el caso de los esteroides vegetales, corresponde indicar que el producto es sólo para las personas que desean reducir su colesterolemia, entre otros aspectos.

En la tabla 2 se indican las declaraciones de reducción de riesgo de enfermedad, sólo 11 autorizadas hasta Enero de 2014. Por el escaso número de las acreditadas ya puede deducirse que la substanciación científica de este tipo de declaraciones es muy exigente y, en principio, requiere de un esfuerzo de I+D muy considerable.

Los *claims* ganadores de reducción de riesgo de enfermedad, se iniciaron con la aprobación de los esteroides y estanoles vegetales, que reducen el colesterol sanguíneo, un factor de riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, y hasta enero de 2014 han sido 11 los *claims* de este tipo (tabla 2).

2.6. Los *Health Claims* relativos al desarrollo y salud de los niños

En cuanto a los *claims* relativos al desarrollo y salud de los niños, en el registro comunitario encontramos un total de 11, que corresponden a propiedades saludables de varias vitaminas, ácidos grasos esenciales y minerales esenciales (tabla 3).

Nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimentos	Declaración	Condiciones de uso de la declaración	Número del boletín de la EFSA	Norma comunitaria
Fitoesteres: esteroles extraídos de plantas, libres o esterificados con ácidos grasos para uso alimentario	Se ha demostrado que los Fitoesteres disminuyen/reducen la colesterolemia. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 1,5 a 2,4 gramos de fitoesteres. Solo podrá hacerse referencia a la magnitud del efecto para los alimentos incluidos en las categorías siguientes: grasas amarillas para untar, productos lácteos, mayonesa y aliños para ensaladas. Cuando se haga referencia a la magnitud del efecto, deberá comunicarse al consumidor el rango completo “del 7 % al 10 %”, así como el periodo a partir del cual surte efecto: “de dos a tres semanas”	Q-2008-085; y Q-2009-00530 y Q-2009-00718	Reglamento (CE) no 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009; y Reglamento (UE) Nº 376/2010 de la Comisión, de 3 de mayo de 2010,
Ésteres de fitoestanol	Se ha demostrado que los ésteres de fitoestanol disminuyen/reducen la colesterolemia. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 1,5 a 2,4 gramos de fitoestanoles. Solo podrá hacerse referencia a la magnitud del efecto para los alimentos incluidos en las categorías siguientes: grasas amarillas para untar, productos lácteos, mayonesa y aliños para ensaladas. Cuando se haga referencia a la magnitud del efecto, deberá comunicarse al consumidor el rango completo “del 7 % al 10 %”, así como el periodo a partir del cual surte efecto: “de dos a tres semanas”	Q-2008-118; y Q-2009-00530 y Q-2009-00718	Reglamento (CE) no 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009; y Reglamento (UE) Nº 376/2010 de la Comisión, de 3 de mayo de 2010,
Goma de mascar edulcorada con 100% de xilitol	Se ha demostrado que la goma de mascar edulcorada con 100% de xilitol reduce la placa dental. Un contenido/nivel elevado de xilitol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de caries en los niños.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta mínima de 2-3 gramos de goma de mascar edulcorada con 100% de xilitol 3 veces al día después de las comidas.	Q-2008-321	Reglamento (CE) no 1024/2009 de la Comisión, de 29 de octubre de 2009
Fitoesteres/ésteres de fitoestanol	Se ha demostrado que los fitoesteres y los ésteres de fitoestanol disminuyen/reducen el colesterol sanguíneo. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 1,5 a 2,4 gramos de fitoesteres/fitoestanoles. Solo podrá hacerse referencia a la magnitud del efecto para los alimentos incluidos en las siguientes categorías: grasas amarillas para untar, productos lácteos, mayonesa y aliños para ensaladas. Cuando se haga referencia a la magnitud del efecto, deberá comunicarse al consumidor el rango completo «del 7 % al 10 %» así como el periodo a partir del cual surte efecto «de dos a tres semanas».	Q-2008-779	Reglamento (UE) No 384/2010 de la Comisión de 5 de mayo.
Chicle sin azúcar	El chicle sin azúcar ayuda a reducir la desmineralización dental. La desmineralización dental es un factor de riesgo en el desarrollo de la caries dental.	Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene mascando 2-3 g de chicle sin azúcar durante veinte minutos al menos tres veces al día después de las comidas.	Q-2010-00119	Reglamento (UE) Nº 665/2011, de la Comisión de 11 de julio.
Chicle sin azúcar	El chicle sin azúcar contribuye a neutralizar los ácidos de la placa. Los ácidos de la placa son un factor de riesgo en el desarrollo de la caries dental.	Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene mascando 2-3 g de chicle sin azúcar durante veinte minutos al menos tres veces al día después de las comidas.	Q-2010-00120	Reglamento (UE) Nº 665/2011, de la Comisión de 11 de julio.
Betaglucano de avena	Se ha demostrado que el betaglucano de avena disminuye/reduce el colesterol sanguíneo. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Debe informarse al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 3 g de betaglucano de avena. La declaración puede utilizarse para alimentos que contienen al menos 1 g de betaglucano de avena por porción cuantificada.	Q-2008-681	Reglamento (UE) Nº 1160/2011 de la Comisión de 14 de noviembre,.
Betaglucano de cebada	Se ha demostrado que el betaglucano de cebada disminuye/reduce el colesterol sanguíneo. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Debe informarse al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 3 g de betaglucano de cebada. La declaración puede utilizarse para alimentos que contienen al menos 1 g de betaglucano de cebada por cada porción cuantificada.	Q-2011-00798 Q-2011-00799	Reglamento (UE) Nº 1048/2012 de la Comisión de 8 de noviembre de 2012.

Tabla 2. Declaraciones de reducción de riesgo de enfermedad. 11 autorizadas hasta Enero de 2014.

Nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimentos	Declaración	Condiciones de uso de la declaración	Número del boletín de la EFSA	Norma comunitaria
Ácido α -linolénico y ácido linoleico, ácidos grasos esenciales	Los ácidos grasos esenciales son necesarios para el crecimiento y el desarrollo normales de los niños.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 2 gramos de ácido α -linolénico (ALA) y una ingesta diaria de 10 gramos de ácido linoleico (LA).	Q-2008-079; y Q-2009-00548	Reglamento (UE) Nº 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009; y Reglamento (UE) Nº 376/2010 de la Comisión, de 3 de mayo de 2010.
Calcio y vitamina D	El calcio y la vitamina D son necesarios para el crecimiento y el desarrollo normales de los huesos en los niños.	Esta declaración sólo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de calcio y vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-116	Reglamento (UE) Nº 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009.
Calcio	El calcio es necesario para el crecimiento y el desarrollo normales de los huesos en los niños.	Esta declaración sólo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de calcio de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-322	Reglamento (UE) Nº 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009.
Vitamina D	La vitamina D es necesaria para el crecimiento y el desarrollo normales de los huesos en los niños.	Esta declaración solo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-323	Reglamento (UE) Nº 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009.
Proteínas	Las proteínas son necesarias para el crecimiento y el desarrollo normales de los huesos en los niños.	Esta declaración solo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de proteínas de acuerdo con la declaración FUENTE DE PROTEÍNAS que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-326	Reglamento (UE) Nº 983/2009 de la Comisión, de 21 de octubre de 2009.
Fósforo	El fósforo es necesario para el crecimiento y el desarrollo normales de los huesos en los niños.	Esta declaración sólo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de fósforo de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-217	Reglamento (UE) Nº 1024/2009 de la Comisión, de 29 de octubre de 2009.
Yodo	El yodo contribuye al crecimiento normal de los niños.	Esta declaración sólo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de yodo de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-324	Reglamento (UE) Nº 957/2010 de la Comisión de 22 de octubre de 2010.
Hierro	El hierro contribuye al desarrollo cognitivo normal de los niños.	Esta declaración sólo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de hierro de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006.	Q-2008-325	Reglamento (UE) Nº 957/2010 de la Comisión de 22 de octubre de 2010.
Ácido docosahexaenoico (DHA)	La ingesta de ácido docosahexaenoico (DHA) contribuye al desarrollo visual normal de los niños hasta los 12 meses de edad.	Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 100 mg de DHA. Cuando la declaración se haga con respecto a preparados de continuación, el alimento debe contener al menos un 0,3 % del total de ácidos grasos como DHA.	Q-2008-211; Q-2008-688; Q-2008-689	Reglamento (UE) Nº 440/2011 de la Comisión, de 6 de mayo.
Ácido docosahexaenoico (DHA)	La ingesta materna de ácido docosahexaenoico (DHA) contribuye al desarrollo normal de los ojos del feto y del lactante alimentado con leche materna.	Se informará a las mujeres embarazadas o en período de lactancia de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 200 mg de DHA además de la ingesta diaria recomendada de ácidos grasos omega-3 para los adultos, esto es, 250 mg de DHA y de ácido eicosapentaenoico (EPA). La declaración puede ser utilizada solamente para aquellos alimentos que aporten una ingesta diaria de al menos 200 mg de DHA.	Q-2008-675	Reglamento (UE) Nº 440/2011 de la Comisión, de 6 de mayo.
Ácido docosahexaenoico (DHA)	La ingesta materna de ácido docosahexaenoico (DHA) contribuye al desarrollo normal del cerebro del feto y del lactante alimentado con leche materna.	Se informará a las mujeres embarazadas o en período de lactancia de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 200 mg de DHA además de la ingesta diaria recomendada de ácidos grasos omega-3 para los adultos, esto es, 250 mg de DHA y de ácido eicosapentaenoico (EPA). La declaración puede ser utilizada solamente para aquellos alimentos que aporten una ingesta diaria de al menos 200 mg de DHA.	Q-2008-773	Reglamento (UE) Nº 440/2011 de la Comisión, de 6 de mayo.

Tabla 3. Los primeros 11 *Health Claims* relativos al desarrollo y salud de los niños.

3. Los perfiles nutricionales

La caracterización o perfilado nutricional de los alimentos puede definirse como la disciplina que, basándose en principios y consideraciones científicas, y teniendo como referente la salud, trata de clasificar los alimentos de acuerdo con su composición y con determinados objetivos específicos, previamente establecidos, en el campo de la alimentación. Tal como han sido planteados en Europa, tienen un componente científico pero uno mayor de carácter político o de gestión, y ello dificulta su concreción que depende de acuerdos que deben conjugar intereses diversos.

En Europa, se ha planteado definir a los *perfiles nutricionales apropiados* con el sólo objeto de que los alimentos que se ajusten a estos perfiles está previsto que sean los únicos autorizados a llevar declaraciones nutricionales o de salud. Así lo prevé el artículo 4 del Reglamento que nos ocupa, y se aplicarán perfiles menos exigentes para llevar *claims* nutricionales que *health claims*. Así ha planteó en las propuestas inicialmente preparadas por la CE y que no han pasado de una fase inicial sin mayor acuerdo.

En el trasfondo está que en nutrición se suele considerar que la alimentación es buena o mala, en base a la dieta en su conjunto y no en base a considerar cada alimento individual como sano (saludable) o no sano (no saludable), aisladamente. Sin embargo, hay ya poderosas razones (de salud, económicas, científicas) que fuerzan a matizar esta consideración. La raíz del problema es la creciente prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, (tales como los desordenes cardiovasculares y neurológicos, la obesidad, la diabetes tipo 2, algunos tipos de cáncer, la osteoporosis,...) que en las sociedades desarrolladas son responsables de más del 50-60% de todas las causas de muerte y que, en gran medida, dependen del exceso de consumo de varios componentes individuales de los alimentos. Resultan determinantes los nuevos conocimientos de la gran influencia de los componentes de los alimentos, junto a las pautas alimentarias y al estilo de vida en general, en el origen de todos estos problemas.

Se considera que los consumidores pueden percibir los alimentos promocionados con declaraciones o *health claims* como productos que poseen una ventaja de salud con respecto a productos similares u otros productos a los que, por ejemplo, no se han añadido estos nutrientes o determinadas otras sustancias que justifican el *claim*. Sin requerimientos de perfil nutricional apropiado para que un alimento pueda llevar *claims* (o medidas análogas), se podría alentar en exceso a los consumidores a aumentar la ingesta total de ciertos alimentos, y así de nutrientes concretos (grasa saturada o sal, por ejemplo) cuyo

consumo excesivo no es deseable. Además, los perfiles nutricionales pueden ayudar a evitar circunstancias en las que las declaraciones nutricionales o de propiedades saludables puntuales oculten las características nutricionales generales de un determinado producto alimenticio, lo que podría inducir a error a los consumidores.

Sin embargo, aunque los perfiles nutricionales según la nueva legislación europea, es verdad que tienen el único propósito de regular las circunstancias en que puedan hacerse las declaraciones, la percepción del consumidor puede ir mucho más allá, con consecuencias de mayor calado: al haber alimentos cuyo perfil sea considerado apropiado para llevar *claims* y otros alimentos con un perfil no apropiado, el consumidor percibirá los primeros como “buenos o más saludables” mientras que a los otros los considerará peores o malos. Resulta pues muy controvertido el desarrollo de este aspecto de la legislación. Sin embargo, puede reconocerse ya, en particular, que los perfiles nutricionales constituyen un potente estímulo a la investigación e innovación en el sector agroalimentario: muchos productores tienden ya a mejorar sus alimentos teniendo como referencia que se aproximen a los perfiles nutricionales que se piensa puedan ser considerados (de modo inmediato o en el futuro) apropiados o “más saludables”: menos grasa saturada y menos azúcar (menor densidad energética), menos sal, más fibra dietética, etc. (figura 1).

3.1. ¿Qué entendemos por perfil nutricional apropiado o adecuado?

Desde el punto de vista práctico, el Reglamento sólo aporta ciertas indicaciones y creemos que este concepto de Perfil Nutricional está bastante abierto a una progresiva (pero lenta) evolución, cuyo ritmo vendrá dictado por criterios de aceptabilidad y aplicabilidad práctica en nuestra sociedad.

En principio, lo inicialmente explicitado en el texto legislativo es que los perfiles nutricionales de los alimentos deben basarse en conocimientos científicos sobre dietas y nutrición, así como sobre su relación con la salud, y deberán tener en cuenta: a) las cantidades de determinados nutrientes y otras sustancias contenidas en los alimentos como, por ejemplo, grasas, ácidos grasos saturados, ácidos grasos trans, azúcares y sal o sodio, y para las cuales se pretende limitar ingestas excesivas en la dieta total; b) la función e importancia de los alimentos (o de las categorías de alimentos) y la contribución a la dieta de la población en general o, en su caso, de determinados grupos sometidos a riesgo, incluidos los niños; y c) la composición nutricional global de los alimentos y la presencia de nutrientes cuyo efecto en la salud haya sido reconocido científicamente, tales como el de grasas poliinsaturadas

y monoinsaturadas, hidratos de carbono disponibles diferentes de los azúcares, vitaminas, minerales, proteínas y fibras.

En sentido amplio, el concepto de perfil nutricional supone poder contemplar todos los aspectos relativos a la composición de los alimentos, junto a su función, la relación con la salud, los aspectos particulares de los grupos de población, etc. En cuanto a la composición, supondría la ponderación específica de los diferentes componentes (unos considerados favorables y otros que deben limitarse) en su totalidad, algo inalcanzable en la práctica, en el momento actual (figura 1). Por ello, al menos inicialmente, se tiende a concentrar la atención en unos pocos componentes (sal o sodio, ácidos grasos saturados; azúcares sencillos), y ni siquiera con tal simplificación ha sido posible adoptar los perfiles nutricionales, tal como preveía el Reglamento (a más tardar el 19 de enero de 2009). Cuatro años más tarde siguen sin poderse concretar.

4. Nutrición personalizada: biomarcadores, tecnologías ómicas y nutrigenómica

La nutrigenómica (Palou, 2007) utiliza, además de las técnicas tradicionales en Nutrición, las nuevas **tecnologías ómicas** (transcriptómica, proteómica, metabolómica). Se nutre de los rápidos avances en el conocimiento de los genes que conforman el genoma, sus mecanismos de regulación y cómo ciertos componentes de los alimentos inciden en estos sistemas; y se beneficia de los grandes avances en el conocimiento de ciencias como la Bioquímica, la Genética y la Fisiología humanas y, en particular, el Metabolismo. Así, la Nutrigenómica dota de un valor añadido a los conocimientos epidemiológicos y a los contenidos clásicos de la nutrición, confiriendo a esta ciencia una nueva dimensión con una sólida capacidad predictiva. Estas modernas tecnologías han capitalizado la gran cantidad de información aportada sobre todo a raíz de la secuenciación del genoma humano en 2001.

Desde luego hoy no es aún posible disponer de tratamientos matemáticos apropiados para integrar apropiadamente los muchos millares de datos que generan los estudios que aplican las tecnologías ómicas y, siendo difícil precisar, creemos que se procesa menos de 3% de la información obtenida; el resto se pierde. De cara al futuro, comienza a ser posible predecir, en cierto grado muy limitado, el comportamiento de las personas en respuesta a diferentes tipos de alimentación, incluso sus preferencias alimentarias, su sensibilidad frente a diferentes estímulos y su conducta.

4.1. Biomarcadores nutrigenómicos

La capacidad de identificar en edades tempranas determinadas sensibilidades de las personas a enfermedades o funciones, podría reforzar (junto con el asesoramiento dietético y de estilo de vida, y el conocimiento de interacciones dieta-genotipo) los beneficios de la dieta sobre la salud humana. En este sentido, el concepto de *biomarcadores nutrigenómicos* resulta de conjuntos de datos característicos de la respuesta (a la dieta o a una determinada composición y/o pauta alimentaria) del sistema biológico considerado, indicativos de la derivación del sistema hacia una determinada condición, saludable o adversa; por ejemplo, biomarcadores de desarrollo de hipertensión, obesidad, diabetes, depresión, etc.

Es lógico que estos nuevos biomarcadores, que pueden basarse en cientos o miles de parámetros, puedan representar fielmente los ajustes o desequilibrios que se producen en nuestro organismo y que al final tienden a desplazar nuestras tendencias hacia estados de salud o de bienestar o hacia condiciones adversas, y que los puedan reflejar de modo más fiel que los biomarcadores clásicos, más o menos puntuales, disponibles rutinariamente en los análisis clínicos, por ejemplo. Para muchas enfermedades o alteraciones de la salud o del bienestar no se dispone aún de biomarcadores apropiados o bien, los que tenemos, no son identificables y útiles de forma suficientemente precoz. Este es uno de los principales cuellos de botella que hoy limita una penetración mayor del sector de la alimentación en el terreno de la salud y el bienestar. En la Universidad de las Islas Baleares desarrollamos (2010-2015) un proyecto Europeo amplio para la investigación y desarrollo de nuevos biomarcadores (BIOCLAIMS, 2010) para el establecimiento de futuras declaraciones de salud en los alimentos en Europa en la próxima década. Algunos biomarcadores pueden ser útiles para la mayoría de la población, mientras que la aplicabilidad de otros puede ser para determinados genotipos o fenotipos de subgrupos de población o incluso para personas individuales. La combinación del genotipado y fenotipado moleculares con el uso de biomarcadores nutrigenómicos en muestras apropiadas, junto con el abaratamiento y agilidad de las nuevas tecnologías, puede permitir un seguimiento no invasivo de los estados de salud y bienestar de las personas, individualmente y a lo largo de toda la vida (BIOCLAIMS, 2010). Se están iniciando ya proyectos, experiencias e incluso servicios, en este sentido.

4.2. Nutrigenética

Actualmente se está acumulando mucha información sobre la influencia de la genética en la respuesta a la alimentación. El genotipado de los individuos que participan en estudios

dietéticos de intervención se ha incorporado a muchos de los protocolos de estudio a gran escala que analizan las relaciones entre dieta y enfermedad. El concepto de nutrición individualizada, ha capturado la imaginación de los investigadores de la nutrición y a la vez también se está incorporando en los esquemas de las principales empresas a nivel internacional, y se empieza a aplicar en la práctica, como en el ejemplo que aquí consideramos (Alimentómica, 2014). El atractivo de la **nutrición individualizada** o personalizada, así como sus implicaciones potenciales éticas y sociales está ya bajo la atención de los medios de comunicación generales.

En los últimos años han aparecido en el mercado numerosos productos que proporcionan información genética relacionada con el riesgo a desarrollar patologías u otras condiciones relacionadas con el bienestar. En el área del Metabolismo, muchos de estos *kits* o tests aportan información genética sobre la presencia de variantes génicas (principalmente SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*) asociadas a padecer obesidad, diabetes, hipertensión y otras alteraciones, aportando una aproximación al riesgo de desarrollarlas. En algunos casos, además, aportan consejos sobre el estilo de vida y recomendaciones sobre la dieta de acuerdo con el perfil genético del individuo. Sin embargo, a menudo dichos productos presentan una serie de limitaciones que cuestionan su aplicación, fiabilidad, rigurosidad e incluso, la FDA ha limitado la comercialización de uno de ellos por considerar que no hay suficiente información sobre la seguridad y eficacia de su uso libre, y además, manifiesta que el uso médico de dicho test no ha sido aprobado (Zhang, 2013). En particular, muy frecuentemente, las recomendaciones alimentarias se plantean sin tener en cuenta los hábitos alimentarios preexistentes.

Un ejemplo reciente que se ha erigido de entre este tipo de productos es Metigentity (www.metigentity.com/) que ha considerado en su desarrollo las carencias de otros planteamientos similares y se presenta como un producto en continua evolución (Alimentómica, 2014) y posee algunas características intrínsecas que lo diferencian notablemente de otros por su utilidad/aplicación (se puede extraer información que es práctica para el individuo), continua actualización, adaptabilidad al individuo, integración y personalización de la interpretación de los resultados, no constituye un test aislado sino que cuenta con la colaboración de un especialista médico/nutricionista quien contribuye al asesoramiento y seguimiento de la persona en estudio y, finalmente, lleva implícito un sistema de seguimiento de los resultados de las recomendaciones que maximiza la eficacia de la intervención terapéutica personalizada.

Un aspecto crucial es el análisis e interpretación, junto con la integración y presentación de la información para cada individuo. En general, los kits disponibles actualmente en el mercado ofrecen un baremo de riesgo asociado a variantes génicas y (si es conocido) el beneficio asociado a una intervención dietética o de estilo de vida. Pero esta interpretación, que se suele efectuar gen a gen (o SNP a SNP) podría dar lugar a recomendaciones contradictorias. Algunos kits comerciales, para soslayar parcialmente este problema acaban haciendo recomendaciones generales de sentido común y por tanto al final no son personalizadas. De hecho, en un informe de la Oficina de Responsabilidad Gubernamental de EEUU (GAO-06-977T, Jul 27, 2006, <http://www.gao.gov/products/GAO-06-977T>) se pone de manifiesto que en una tanda de kits analizados, procedentes de diferentes empresas, las recomendaciones que se proponen se ajustan más a las características dietéticas y de estilo de vida de los sujetos que a su información genética (al contrario de lo especificado en sus respectivas descripciones) e incluso para la misma muestra se describen variantes génicas diferentes según la casa comercial. El tema está abierto a las numerosas iniciativas pero la utilidad de las diferentes alternativas es lo que determinará su permanencia en el mercado.

Muchos tests nutrigenéticos disponibles actualmente se suelen vender directamente al consumidor a través de internet, quien se toma la muestra y la envía a un laboratorio para su análisis. Posteriormente, el consumidor recibe de manera confidencial recomendaciones específicas para adaptar su estilo de vida y su dieta en función de los riesgos potenciales para la salud detectados. En este planteamiento no hay un interlocutor especializado que pueda guiar al consumidor en el proceso de interpretar la información ni en las etapas posteriores que pueden implicar incorporar cambios de hábitos dietéticos y/o de estilo de vida además de una reevaluación del progreso conseguido por un profesional. Sin embargo, consideramos que la participación de verdaderos expertos en nutrición es, actualmente, del todo necesaria.

4.3. Epigenética y modificación por nutrientes de la susceptibilidad individual al desarrollo a largo plazo de enfermedades y otras alteraciones no deseadas.

La alimentación a lo largo de la vida, particularmente durante las etapas tempranas del desarrollo y durante el crecimiento, puede condicionar fuertemente nuestra salud a lo largo de la vida. Así, incluso la alimentación de la futura madre representa un factor primordial —mucho más de lo que anteriormente se creía— en como será el desarrollo del niño, especialmente en lo concerniente a su futuro bienestar, salud y resistencia a enfermedades.

De hecho, actualmente se sabe que algunas alteraciones que se presentan en la edad adulta (entre ellas, enfermedad cardiovascular, obesidad, diabetes tipo II, osteoporosis y otros problemas y alteraciones), y que eran atribuidas a un estilo de vida malsano o a factores genéticos, son el resultado directo del entorno uterino durante el embarazo y/o de la alimentación durante la lactancia o desarrollo.

Un ejemplo lo constituye el conocimiento de la nueva función de la leptina en la alimentación durante la lactancia, descubierta en nuestro laboratorio (Pico et al., 2007). Así, se trata de una de las proteínas que se encuentra de manera natural en la leche materna humana y que no está presente en fórmulas infantiles, y la referida nueva función conocida se ejerce durante la lactancia, confiriendo protección futura frente al desarrollo de sobrepeso, obesidad y otras complicaciones médicas asociadas que se tienden a desarrollar sobretudo en la edad adulta (Palou and Pico, 2009; Sanchez et al., 2008).

El término *imprinting* o programación metabólica describe los procesos por los cuales las células adquieren una cierta memoria biológica para manejar influencias externas, y que puede ser transmitida a la descendencia celular. Es decir, determinados estímulos que operen en un período crítico o sensible de nuestra vida (que podríamos considerar como una ventana específica de sensibilidad) pueden dar lugar a efectos duraderos o permanentes sobre la estructura o la función de nuestro organismo, efectos que pueden permanecer durante muchos años e incluso a lo largo de toda la vida. Los mecanismos (metilación de DNA y acetilación de histonas, entre otros) se van conociendo de forma creciente, y en la última década se van sucediendo ejemplos de estos efectos.

La secuenciación del genoma humano, nos ha revelado también la gran heterogeneidad de las poblaciones humanas, una variabilidad genética entre personas mucho mayor que la previamente supuesta, calculándose que el genoma humano alberga unos diez millones de polimorfismos. A ello se une la complejidad derivada de las prolijas interacciones entre los genes y su regulación, así como con la variabilidad epigenética, el *imprinting* metabólico: nuestra historia de cómo comemos, como sentimos, las influencias del entorno que van quedando grabadas de modo permanente. Todo ello permitirá un seguimiento personalizado a lo largo de la vida, y recomendaciones adaptadas a cada uno y no al promedio estadístico de la población. Y alimentos con *health claims* mucho más específicos que los ahora emergentes. Todo ello promueve un cambio profundo en el pensamiento humano en cuanto a como esta información puede ser explotada óptimamente en beneficio de la salud y el bienestar.

Referencias

- Alimentómica (2014). METIGENTY (Estudio del perfil nutrigenético individualizado para la prevención y control de la propensión al sobrepeso-obesidad). <http://www.alimentomicacom/>.
- BIOCLAIMS (2010). BIOmarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food" (BIOCLAMS, Grant agreement no. 244995).
- EC (2012). COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. Official Journal of the European Union **L136**, 1-40.
- EC (2013(a)). COMMISSION REGULATION (EU) No 851/2013 of 3 September 2013 authorising certain health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health and amending Regulation (EU) No 432/2012. Official Journal of the European Union **L235**, 3-7.
- EC (2013(b)). COMMISSION REGULATION (EU) No 536/2013 of 11 June 2013 amending Regulation (EU) No 432/2012 establishing a list of permitted health claims made on foods other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. Official Journal of the European Union **L160**, 4-8.
- EU (1997). REGULATION (EC) No 258/97 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Union **L43**, 1-6.
- EU (2007). Corrigendum to Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union **L12**, 3-18.
- Palou A. (2006). [New challenges in basic and applied nutrition]. Revista de Medicina de la Universidad de Navarra **50**, 62-70.
- Palou A. (2007). From nutrigenomics to personalised nutrition. Genes & Nutrition **2**, 5-7.
- Palou A. and Pico C. (2009). Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. Appetite **52**, 249-252.
- Palou A., Pico C. and Bonet M.L. (2004). Food safety and functional foods in the European Union: obesity as a paradigmatic example for novel food development. Nutrition Reviews **62**, S169-181.
- Pico C., Oliver P., Sanchez J., Miralles O., Caimari A., Priego T. and Palou A. (2007). The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. International Journal of Obesity **31**, 1199-1209.
- Polledo J.J.F., Palou A. and Jordana J. (2011). Implicación Social de la Industria Alimentaria (Barcelona: Ergon).
- Sanchez J., Priego T., Palou M., Tobaruela A., Palou A. and Pico C. (2008). Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life. Endocrinology **149**, 733-740.
- Zhang S. (2013). 23andMe ordered to halt sales of DNA tests. Nature (*Nature News*, 25 November 2013).



Nutrigenómica: nuevas herramientas al servicio de la salud a través de la personalización de la nutrición y el diseño de nutraceuticos.

David de Lorenzo

Centro de Estudios en Genómica y Nutrición – CESGEN.
Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida – PCiTAL.
Turó de Gardeny, Edifici 23A.
25003 Lleida.
david.delorenzo@cesgen.es

Resumen

La ciencia de la Genómica Nutricional, o Nutrigenómica, permite hoy día soñar con el desarrollo de una nueva generación de nutraceuticos, personalizados (optimizados) según el genoma/metabolismo individual, y por tanto más eficientes y con menos efectos secundarios. Durante este capítulo se mostrará cómo gracias al conocimiento de las interacciones entre variabilidad genética y compuestos bioactivos en los nutrientes, es posible incluso el diseño de ciertos Nutraceuticos aptos únicamente para determinados perfiles genómicos, y no otros. Finalmente, se plantearán las posibles perspectivas y cronologías para este prometedor campo, así como los requerimientos que deberán cumplir los profesionales del área.

Introducción

La alimentación es, de todos los factores ambientales a los que estamos expuestos, el más importante a la hora de determinar la aparición de las enfermedades más comunes en nuestra sociedad occidental actual. Así, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, el cáncer y la diabetes son responsables de 35 millones de muertes al año en todo el mundo. En Europa, estas enfermedades crónicas no infecciosas representan el 70% de todos los fallecimientos, y se estima que esta cantidad aumentará hasta el 80% para el año 2030 (Bloom et al, 2011). Es conocido desde hace tiempo que una elevada proporción de estas patologías (alrededor de un 80% de infartos y diabetes de tipo 2 y de un 40% de cánceres) podrían ser evitadas

con una dieta adecuada y un aumento del consumo de alimentos beneficiosos para la salud, como las frutas y las verduras (Doll and Peto, 1981). El estudio y posterior conocimiento de los principios bioactivos que producen estos efectos beneficiosos para la salud, así como de su mecanismo de acción, ha propiciado la denominación de *Nutracéuticos* a todos aquellos compuestos presentes en los nutrientes de interés para la salud humana.

Los nutraceuticos pueden dividirse en dos tipos de compuestos: suplementos dietarios y alimentos funcionales. Los suplementos dietarios, en principio destinados a complementar la dieta, contienen nutrientes bioactivos concentrados, bien en forma de líquido o cápsulas. Como ejemplo tenemos vitaminas, minerales, aminoácidos y otros metabolitos. Por otro lado, los alimentos funcionales son alimentos en un estado casi natural, pero enriquecidos en la concentración de algún nutriente específico, o incluso con ingredientes adicionales, que no existen en el alimento original (como puede ser la vitamina D en la leche, tradicionalmente añadida ya que al ser ésta rica en calcio, se favorece la absorción de la vitamina). Este enriquecimiento persigue habitualmente un beneficio específico para la salud.

Aunque en principio podríamos esperar que este beneficio fuera universal e igual para todos, los recientes avances en Genómica han revelado que la variabilidad genética y metabólica interindividual puede interactuar con los compuestos bioactivos presentes en los nutraceuticos, modulando así su efecto en la salud. En este capítulo se pretende analizar cómo el conocimiento de estas interacciones abre la puerta a una nueva generación de nutraceuticos, personalizados, más eficientes, y con menos efectos secundarios.

1. Influencia de la genética en la respuesta a nutraceuticos

Es sabido desde hace tiempo que la respuesta a intervenciones nutricionales o a nutraceuticos es variable entre personas. En el estudio de Katan et al (1986), tras una intervención nutricional para reducir los niveles de colesterol, se observaron individuos que respondían bien (hiper-respondedores), y otros que no respondían al tratamiento (hipo-respondedores). En la Figura 1 se representa una simulación (basada en datos reales) de los cambios en el colesterol total que experimentarían 40 personas tras una intervención nutricional del estilo del estudio de Katan et al, suponiendo una distribución normal (con una media de -10 mg/dl y una desviación típica de 20 mg/dl) de los valores obtenidos.

De manera similar a lo que ocurre en los casos reales, la simulación muestra que un número elevado de individuos presentan una respuesta en torno a la media (individuos normo-respondedores), mientras que en torno a estos valores existe un porcentaje no despreciable

de individuos que no responden igual que la media (a la izquierda del diagrama están los denominados *hiper-respondedores*, con una disminución significativamente mayor en los niveles de colesterol que la media, y a la derecha del diagrama se encuentran los *hipo-respondedores*, aquellos que o bien no disminuyen los niveles de colesterol, o incluso los incrementan). En esta simulación, aunque sí es cierto que el efecto medio tras el tratamiento es de una reducción de 10 mg/dl en la concentración de colesterol, y por tanto podríamos decir que el tratamiento reduce los niveles de colesterol, es evidente que esta última afirmación no es válida para todos los casos. Un nutracéutico que por tanto presentara esta dispersión en sus efectos, aunque podríamos asegurar un efecto beneficioso medio, no presentaría efectos en algunas personas, y en otras incluso presentaría efectos negativos, contrarios a lo que se espera de él.

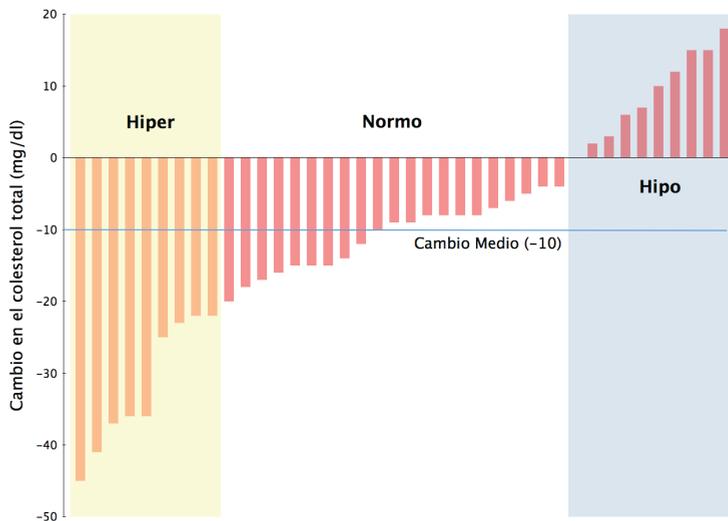


Figura 1. Simulación de los valores de cambio en los niveles de colesterol total tras una intervención nutricional, suponiendo una distribución normal con una media de -10 mg/dl y una desviación típica de 20 mg/dl. Cada barra en el eje de las X representa un individuo, y su respuesta en el cambio de colesterol es el correspondiente valor en el eje Y.

Esta variabilidad en la respuesta a cambios en la dieta está en parte causada por las diferencias genéticas existentes entre personas. No existen dos copias del genoma humano idénticas: de media, un 1% de la secuencia nucleotídica es diferente entre dos genomas al azar, lo cual implica entre 3 y 6 millones de diferencias en la secuencia del ADN entre dos personas cualquiera (3,4). La inmensa mayoría de estas variaciones son polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), también denominados recientemente de una manera etimológicamente más adecuada, SNVs (*Single Nucleotide Variations*). Como su propio nombre indica, son variaciones en la secuencia de ADN que afectan a un

único nucleótido. Estas diferencias son las que en parte explican la heterogénea respuesta humana a la dieta, y también las que explican que las recomendaciones nutricionales generales no ayuden a todos por igual en la prevención de enfermedades o en la mejora del estado de salud.

2. Interacción genoma-nutrientes

Existen factores tanto genéticos como nutricionales conocidos que ejercen un efecto cuantificable (tanto de forma positiva como negativa) en la salud. En muchas ocasiones, actúan de forma independiente, de tal forma que sus efectos son constantes incluso en entornos muy diferentes. Es el caso de factores genéticos (Figura 2B) responsables de enfermedades hereditarias como la hemocromatosis, caracterizada por una acumulación excesiva e incorrecta de hierro en diferentes órganos, principalmente el hígado, y que está causada por mutaciones puntuales en el gen HFE, y factores nutricionales (Figura 2C) como la deficiencia de vitamina C, causante del escorbuto.

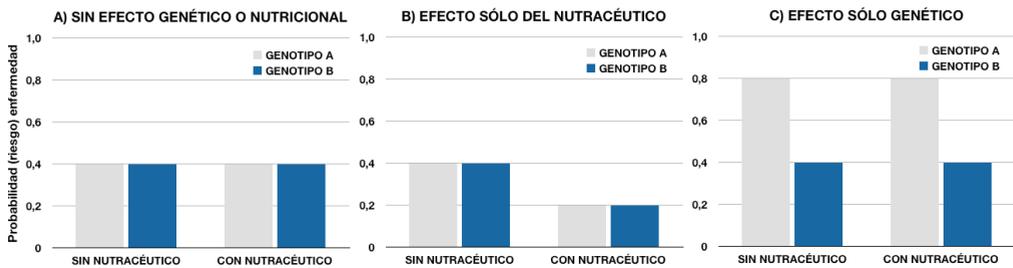


Figura 2. Representación esquemática del efecto sobre el riesgo para la salud de factores únicamente nutricionales (2B) y únicamente genéticos (2C). En 2B, la presencia en la dieta de un nutriente bioactivo (en el ejemplo del texto, la vitamina C - escorbuto) reduce el riesgo de padecer una determinada enfermedad a la mitad, independientemente del genotipo en el que se presenta. En este caso, si el ambiente permanece constante (por ejemplo una correcta ingesta de vitamina C), no hay diferencias en el riesgo para cada uno de los dos genotipos analizados. La determinación del riesgo en este caso es puramente ambiental (nutricional). En 2C, aquellos individuos portadores del genotipo A multiplican por dos su riesgo de padecer la enfermedad, independientemente de si han incorporado el nutraceutico o no en su dieta. En este caso la determinación del riesgo es puramente genética, y que sea elevado depende exclusivamente de la presencia o ausencia del genotipo A (en el ejemplo del texto, mutaciones del gen HFE), y no del ambiente (ingesta/no ingesta del nutraceutico).

Sin embargo, cuando sobre el riesgo a padecer una enfermedad influyen tanto factores genéticos como ambientales (nutricionales), el efecto final sobre la salud de la persona puede venir dado por una simple adición de ambos efectos de forma independiente (Figura 3A, sin interacción), o bien puede existir una interacción entre ambos factores, a través de la cual la presencia de determinado genotipo puede potenciar más de lo que se esperaría la acción de un determinado nutriente (Figura 3B, con interacción).

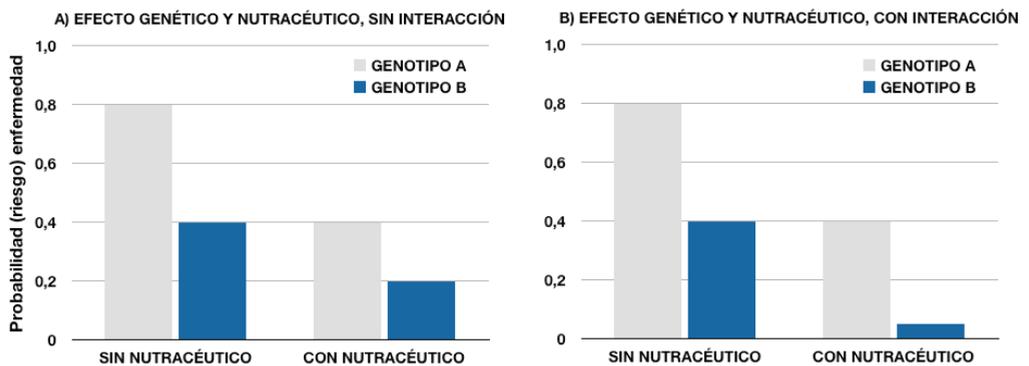


Figura 3. Posibles casos del efecto combinado de dos factores diferentes (uno genético y el otro ambiental-nutricional) sobre la salud humana. En A) se representan los dos factores como independientes, siendo el genotipo B y la presencia del nutraceutico en la dieta los factores protectores, determinando un riesgo de sólo un 20%. La presencia del genotipo A multiplicaría el riesgo por un factor de 2 (riesgo 40% genotipo A con el nutraceutico), y la ausencia del nutraceutico multiplicaría de nuevo por 2 el riesgo (hasta un 80%) de padecer la enfermedad (en el caso del genotipo A sin el nutraceutico). En B) el riesgo de padecer la enfermedad para el genotipo A sin el nutraceutico sigue siendo de 80%, y observamos que tanto el genotipo B (sin nutraceutico) como el nutraceutico (en el mismo genotipo A) reducen el riesgo a la mitad (40%). Pero cuando se encuentran juntos (genotipo B más nutraceutico), el riesgo se reduce todavía menos de las 8 veces que le correspondería si fueran efectos independientes (hasta un 5%, es decir una reducción de x16, en vez del esperado 10%, correspondiente a una reducción de x8).

Un ejemplo del caso representado en la figura 3A sería el ejemplo bien conocido de la deficiencia de folato y SNPs presentes en la secuencia de genes implicados en el transporte y metabolismo de folato y homocisteína, como por ejemplo el gen MTHFR (van der Linden, 2006). La suplementación con ácido fólico de mujeres gestantes puede llegar a reducir significativamente la frecuencia de defectos del tubo neural (NTD) en sus hijos. Entre un 10-30% de estas mujeres presentan variantes genéticas en el gen MTHFR que reducen la eficacia de la maquinaria enzimática relacionada con el folato, con lo que su riesgo aumentará proporcionalmente, y deberán por tanto aumentar todavía más la concentración de ácido fólico en su dieta. No hay en este caso interacción porque el efecto de ambos factores (nutrición y genética) sobre la salud es independiente el uno del otro. Así, si por ejemplo la ausencia de un factor nutricional (como podría ser el ácido fólico durante el embarazo) multiplica el riesgo de padecer una enfermedad por un factor de x2, y la presencia del factor de riesgo genético aumenta el riesgo por un factor de x3, el riesgo final de aquellas personas que presentasen ambos factores (carencia del nutriente protector y presencia de la variante de riesgo) sería x6.

El ejemplo de interacción representado en la figura 3B es, sin embargo, el caso que más nos interesa. Para entender de forma más clara este efecto de interacción genoma-nutrición, y ejemplificar cómo esta interacción puede afectar al desarrollo y uso de nutraceuticos,

usaremos un ejemplo recientemente descubierto por nuestro grupo de investigación (Serrano et al, 2013)

2.1. Efecto de una bebida de soja con vitamina D en el riesgo cardiovascular

Las bebidas de soja son una mezcla compleja de compuestos que incluyen algunos compuestos bioactivos conocidos (como es el caso de las isoflavonas), así como algunos compuestos desconocidos cuyo efecto en la salud sea desconocido hasta ahora. Esta característica hace que sea difícil atribuir el efecto observado de una de estas bebidas a un solo compuesto. En este sentido, se ha observado tradicionalmente una respuesta muy heterogénea tras su administración. Estas diferencias han sido atribuidas en algunos casos a los diferentes procesos de metabolización de las isoflavonas durante la fermentación colónica (Jacobs et al, 2009), así como a algunas variantes genéticas que participan en el metabolismo de los lípidos (Torres et al, 2009).

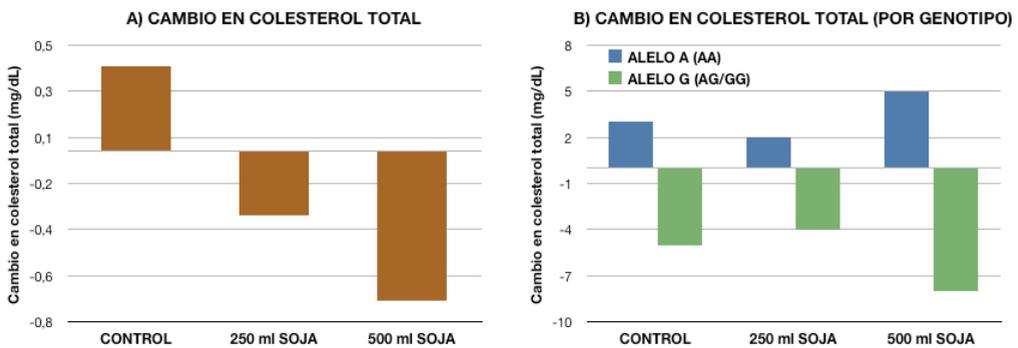


Figura 4. Efecto neto en el colesterol total de una bebida de soja suplementada con 25-hidroxivitamina D, después de 2 meses de tratamiento, A) para el total de 106 sujetos experimentales divididos en tres grupos según tratamiento, y B) agrupados según tratamiento y genotipo en el polimorfismo BsmI (rs1544410) del gen del receptor de la vitamina D (VDR). Las diferencias en A no son estadísticamente significativas, mientras que en B se encontraron diferencias significativas en la reducción de los niveles de colesterol total en el grupo de 500 ml/día con el alelo G (test de t Student para datos emparejados).

En nuestro experimento, tras administrar tres diferentes cantidades (control, 250 ml/día y 500 ml/día) de una bebida de soja enriquecida con vitamina D (25-hidroxivitamina D), y sin tener en cuenta la variabilidad genética presente dentro de cada grupo de voluntarios, se observó una gran variabilidad en la respuesta. A pesar de observar una tendencia a la reducción del riesgo cardiovascular directamente proporcional a la ingesta de soja (Figura 4A), las diferencias no fueron significativas debido en gran parte a esta variación. Sin embargo, al separar los datos de cada grupo según no sólo el tratamiento, sino también

según el genotipo en el polimorfismo BsmI del gen del receptor de la vitamina D (VDR), se observó que la tendencia era diametralmente opuesta según el genotipo en consideración (Figura 4B): mientras que para aquellos individuos que presentaban al menos un alelo G (individuos AG y GG), la tendencia era igual que la media, a la reducción de los niveles de colesterol. Pero en este caso la reducción fue estadísticamente significativa. Esto es debido a que en los individuos AA, el efecto de la ingesta de la bebida de soja era el contrario al grupo AG/GG, es decir, a un aumento (aunque no resultó significativo) en los niveles de colesterol total. Al ser las tendencias para los dos grupos opuestas, al calcular el valor total se anulaba el valor de un grupo con el de otro, produciendo el efecto observado de variación prácticamente nula entre grupos cuando no consideramos el genotipo.

Sin entrar en las causas moleculares de estos resultados, hay dos conclusiones importantes de este ejemplo.

- 1- La interacción puede estar ocultando efectos significativos en estudios de alimentos funcionales, si obtenemos respuestas de sentido contrario en un genotipo frente al otro. Por tanto es importante cuantificar.
- 2- En presencia de interacción, es importante definir el genotipo para el cual el nutracéutico presenta el mayor (o el único) beneficio. En este caso, los individuos con genotipo AG/GG serían los únicos beneficiados (en cuanto a niveles de colesterol total en este ejemplo) de la ingesta de esta bebida de soja enriquecida con vitamina D.

¿Podríamos por tanto concluir que la bebida de soja es cardioprotectora, al reducir significativamente los niveles de colesterol? Es evidente que si vemos los resultados globales, no. Al menos no significativamente. Si nos hubiéramos quedado aquí, esta bebida no hubiera sido nunca clasificada como nutracéutico, al menos en lo referente a riesgo cardiovascular. La causa de este resultado negativo la podemos intuir al observar una variabilidad tan elevada en la respuesta al nutracéutico dentro de cada grupo, que indica que existe una fuente de variación no controlada, en este caso la variación genética. Una vez separados los individuos según su perfil genético, podemos observar como la variabilidad intragrupo se reduce, y se distribuye al nivel intergrupar, concretamente a los grupos de los distintos genotipos del SNP BsmI. De esta manera podemos ahora detectar significativamente no sólo las diferencias entre los distintos grupos de bebida vs control (para cada genotipo), sino también la interacción entre nuestro nutracéutico y la variación genética en el gen VDR. En este caso, la interacción se detecta al observar como el efecto de la bebida de soja en los niveles de colesterol total depende del genotipo concreto en el polimorfismo BsmI: La ingesta diaria de 500 mL de bebida de soja suplementada con vitamina D reduce significativamente

los niveles de colesterol total, pero solo en aquellos individuos con al menos una G en el polimorfismo BsmI del gen VDR (sería por tanto un efecto dominante del alelo G, como ya se ha observado en otros casos en los que interviene este polimorfismo). En individuos AA, no sólo no se reduce, sino que la tendencia es contraria, es decir, al aumento de los niveles de colesterol total.

2.2. Consecuencias de la interacción genes-nutrientes para el diseño de nutraceuticos

Desde el punto de vista de la empresa que comercializa esta bebida de soja, ¿qué tipo de acción debería ahora llevar a cabo? Evidentemente, intentar conseguir una declaración nutricional referente a la propiedad cardioprotectora de la bebida es inútil. Sin controlar el genotipo de los participantes en un estudio funcional, lo más probable es que el resultado no sea significativo, sobre todo cuando la frecuencia del genotipo AA en Europa es de un valor nada despreciable del 20% (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs1544410).

La segunda opción sería conseguir la declaración de nutraceutico cardioprotector, pero únicamente para aquellos individuos con al menos un alelo G en la posición. En este caso, hay dos problemas evidentes: uno es el cambio de la información en el etiquetado y el diseño de una información que sea útil y comprensible para el consumidor. A pesar de ser una tarea compleja, no es imposible. Actualmente ya se conocen casos de fármacos para los cuales su capacidad de acción es diferente según la configuración genética individual del paciente, y por ejemplo ya en el año 2007 la FDA en los Estados Unidos recomendó incluir esta información en la etiqueta del anticoagulante warfarina (comercializado con el nombre de *Coumadin*). Para más información, se puede ver el anuncio de prensa en la página: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/2007/ucm108967.htm>.

El segundo problema es el más importante: este tipo de información no será útil al consumidor final hasta que éste disponga de su información genética personal, y de una manera accesible incluso en el punto de venta de los correspondientes nutraceuticos. Si bien esto puede parecer ciencia ficción, desde la obtención de la secuencia del genoma humano en el año 2001 (Lander et al, 2001, Venter et al, 2001), el siguiente gran proyecto puesto en marcha fue la identificación de las diferencias existentes en el material genético. Este interés creciente por la caracterización de la variabilidad genética existente en poblaciones humanas ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías, con el consiguiente abaratamiento del precio en el coste de la lectura del ADN (Figura 5).

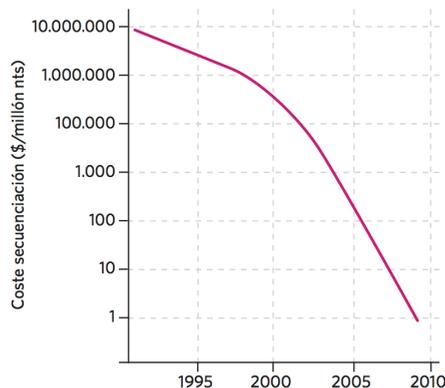


Figura 5. Evolución de los costes de secuenciación (lectura de la secuencia de nucleótidos del ADN) en dólares por millón de nucleótidos. Con un coste actual de unos 3.000 dólares, se espera que, en breve, la lectura de un genoma entero llegue a costar alrededor de los 1.000 dólares, abriendo así la puerta de la genómica personalizada. Fuente: De Lorenzo D. et al (2012).

Conclusiones

La ciencia de la Genómica Nutricional, o Nutrigenómica, permite hoy día soñar con el desarrollo de una nueva generación de nutracéuticos, personalizados (optimizados) según el genoma/metabolismo individual, y por tanto más eficientes y con menos efectos secundarios. Gracias al conocimiento de las interacciones entre variabilidad genética y compuestos bioactivos en los nutrientes, es posible incluso el diseño de ciertos Nutracéuticos aptos únicamente para determinados perfiles genómicos, y no otros.

En una visión global de los mecanismos moleculares de la salud y la enfermedad, la nutrición y la salud humana pasa por la comprensión de las interacciones entre tres conjuntos de genomas:

1. El Genoma Humano, con mayúsculas, en su versión más amplia, que incluye genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma.
2. El genoma de nuestros alimentos, ya que hemos de pensar que son seres vivos y, como tales, poseen un genoma que sintetiza moléculas bioactivas, algunas de las cuáles, por similitud estructural, pueden llegar a interferir con nuestro metabolismo. Un ejemplo claro serían los fitoestrógenos presentes en la soja (como la isoflavona genisteína), moléculas sintetizadas por la planta y que, por su similitud con el estrógeno humano, son capaces de unirse a los mismos receptores y competir con el estrógeno natural.
3. Finalmente un tercer genoma, el genoma de nuestra microbiota. De hecho, el 90% de las células de nuestro cuerpo son bacterias, y sólo un 10% son células humanas.

Durante su paso por el tracto gastrointestinal, los nutrientes son metabolizados por esta enorme cantidad y diversidad de bacterias, y nosotros absorbemos los resultados de su metabolismo y los subproductos asociados.

Ante esta complejidad de nutrientes, ADN, ARN, proteínas y metabolitos, ¿qué puede hacer la Nutrigenómica? ¿Es quizás una utopía pensar que algún día podremos no sólo conocer todas las posibles interacciones entre nutrientes y biomoléculas como el ADN, sino también las consecuencias en nuestra salud de dichas interacciones? A corto plazo es poco probable, aunque su contribución a la comprensión de las causas de las enfermedades comunes relacionadas con la alimentación es hoy día considerable. Pero su mayor contribución a la salud humana será definitivamente a medio y largo plazo.

Por último, el desarrollo de esta nueva generación de Nutracéuticos exigirá la aparición de también una nueva generación de profesionales, formados en genética, metabolismo y nutrición, y que por tanto serían capaces de realizar la integración de información necesaria para el desarrollo de estos nuevos productos. Estos profesionales deberán también ser conscientes de que el hecho de que la Nutrigenómica trabaje sobre el acervo genético humano implica la necesidad de prestar atención al tratamiento que se le da a dicha información, la manera en que se obtiene y la estricta confidencialidad de los estudios en personas. Factores como la transmisión de la información a los sujetos de la investigación, así como al cliente final en el etiquetado de los productos, pasan a tener una mayor prioridad, y debe ser clara y perfectamente comprensible.

Finalmente, el almacenamiento, tanto del material biológico como de la información genética obtenida en los ensayos o de los mismos clientes (en el caso de que se obtuviera), se deben seguir las normas que proporcionan instituciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización del Genoma Humano (HUGO - Human Genome Organisation) y la Organización de Genómica Nutricional (NUGO - Nutrigenomics Organisation). En la página web de esta última (<http://www.nugo.org>) hay disponible una guía bioética para los estudios de Nutrigenómica, que podría también perfectamente ser aplicable al desarrollo de nuevos Nutracéuticos que tengan en cuenta la variabilidad genética subyacente en las poblaciones humanas a las que van dirigidos.

Agradecimientos

Mi agradecimiento personal a los Drs. José Serrano y Manuel Portero, de la Universitat de Lleida, por la aportación de datos suplementarios para la realización de algunas de las gráficas de este texto.

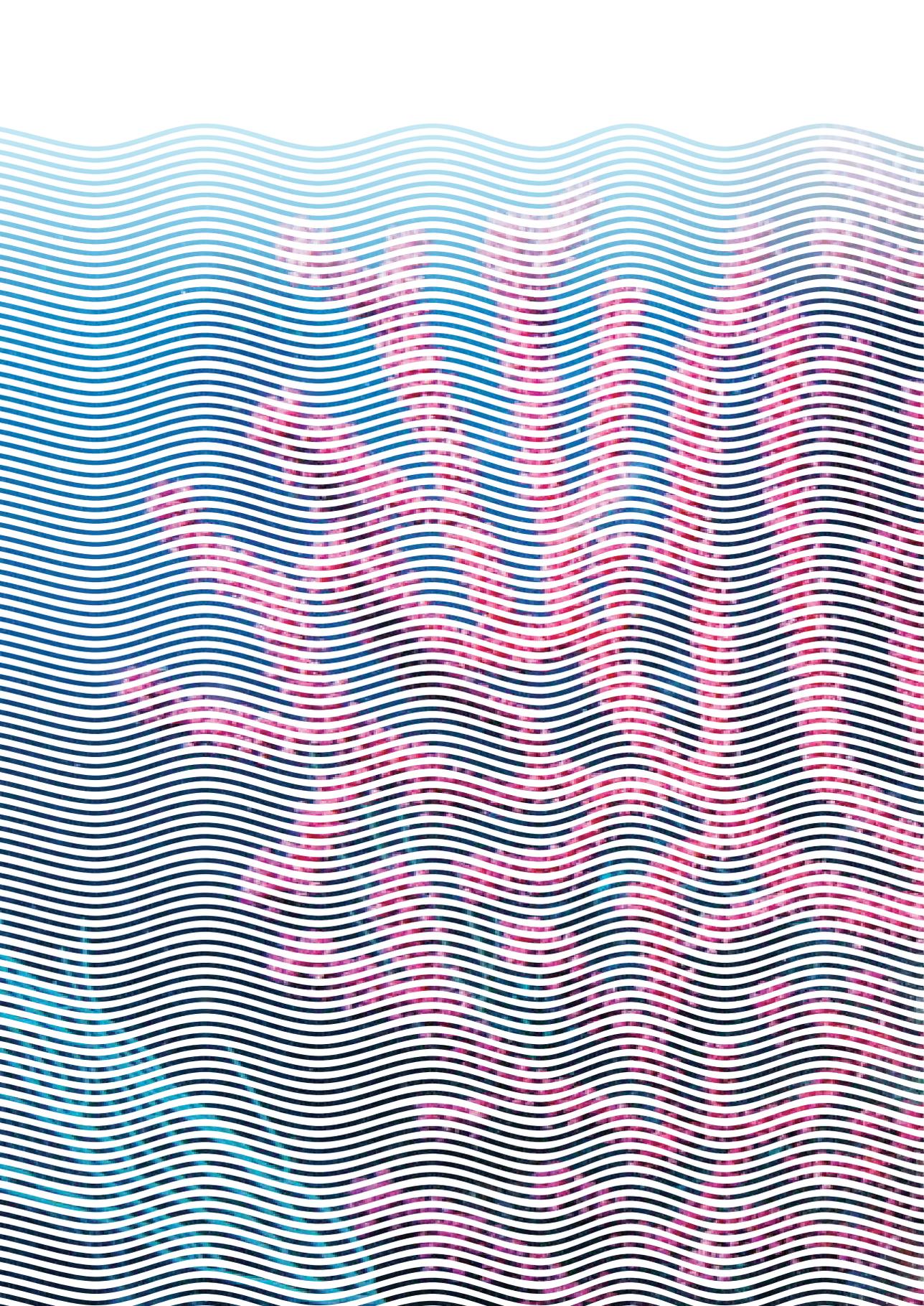
Un agradecimiento muy especial a Julio Maroto, del Centro Tecnológico del Mar, por su iniciativa en la publicación de este libro, y su paciencia en la espera de las contribuciones al mismo.

Conflicto de intereses

David De Lorenzo declara no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Bloom D.E., Cafiero E.T., Jané-Llopis E., Abrahams-Gessel S., Bloom L.R., Fathima S., Feigl A.B., Gaziano T., Mowafi M., Pandya A., Prettner K., Rosenberg L., Seligman B., Stein A.Z. and Weinstein C. (2011). The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Geneva: World Economic Forum.
- De Lorenzo D., Serrano J., Portero-Otín M. y Pamplona R. (2012) *Nutrigenómica y Nutrigenética: Hacia la nutrición personalizada*. Libbooks, Barcelona.
- Doll R. and Peto R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of National Cancer Institute*. 66(6):1191-308.
- Jacobs D.M., Gaudier E., van Duynhoven J., Vaughan E.E. (2009). Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. *Current Drugs Metabolism*. 10:41–54.
- Katan M.B., Beynen A.C., de Vries J.H. and Nobels A. (1986) Existence of consistent hypo- and hyperresponders to dietary cholesterol in man. *American Journal of Epidemiology*. 123(2):221-234.
- Lander E.S. et al – International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.
- Serrano J.C.E., De Lorenzo D., Cassanye A., Martín-Gari M., Espinel A., Delgado M.A., Pamplona R., Portero-Otín M. (2013). Vitamin D receptor Bsm1 polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes & Nutrition*. *In press*.
- Torres N., Guevara-Cruz M., Granados J., Vargas-Alarcón G., González-Palacios B., Ramos-Barragan V.E., Quiroz-Olguín G., Flores-Islas I.M., Tovar A.R. (2009). Reduction of serum lipids by soy protein and soluble fiber is not associated with the ABCG5/G8, apolipoprotein E, and apolipoprotein A1 polymorphisms in a group of hyperlipidemic Mexican subjects. *Nutrition Research*. 29:728–735.
- van der Linden I.J., Afman L.A., Heil S.G. and Blom H.J. (2006). Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proceedings of Nutrition Society*. 65(2):204-15.
- Venter J.C. et al – Celera Genomics (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304-51.



Perfil metabolómico y lipidómico como herramienta para la determinación de ingesta y función de ácidos grasos omega 3

José C.E. Serrano, Ana B. Granado-Serrano, Anna Cassanye, Meritxell Martín-Garí, Mariona Jove, Manuel Portero-Otín

Departamento de Medicina Experimental, Universidad de Lleida
Alcalde Rovira Roure, 80. 25198, Lleida
jceserrano@mex.udl.cat

Resumen

El desarrollo de técnicas cromatográficas y de sistemas bioinformáticos de integración de datos ha permitido el análisis y estudio de las posibles variables metabólicas que determinan el fenotipo de un individuo. La metabolómica-lipidómica de los ácidos grasos omega 3 ha recibido creciente interés por parte de la comunidad científica y sanitaria debido a su estrecha implicación en vías inflamatorias, eje común de la mayor parte de las enfermedades crónicas degenerativas actuales. Este capítulo sirve de guía para el desarrollo de estudios metabolómicos haciendo énfasis, no sólo en los métodos de análisis sino también, en la significancia de los resultados obtenidos.

Introducción

Hace más de 20 años que es ampliamente conocido el papel de los ácidos grasos omega 3 en salud y nutrición, razón por la cual son considerados nutrientes indispensables para un adecuado crecimiento y desarrollo. De la misma forma, se han descrito sus efectos beneficiosos para el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas como enfermedades coronarias, diabetes tipo 2, enfermedades renales, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y enfermedades pulmonares crónicas obstructivas; despertando de esta forma el interés no sólo de la comunidad científica, sino también de las empresas alimentarias interesadas en la formulación de alimentos funcionales.

No obstante, aunque los efectos en salud de los ácidos grasos omega 3 se han constatado a través de varios estudios epidemiológicos y de intervención, los mecanismos de acción a

través de los cuales producen dichos efectos aún no se encuentran claramente establecidos. Uno de los principales problemas en la identificación de dichos mecanismos es la amplia variedad de compuestos producidos durante su metabolismo, así como la diversidad de vías metabólicas implicadas. En este sentido, el surgimiento de nuevas metodologías de amplio análisis como la metabolómica y lipidómica permitiría la identificación de metabolitos en condiciones fisiológicas y patológicas específicas, a partir de los cuales sería factible determinar las dosis y/o requerimientos nutricionales para condiciones específicas.

El objetivo de este capítulo es describir el uso de la metabolómica y lipidómica para que pueda servir como guía en la determinación de la ingesta y función de los ácidos grasos omega 3 a partir de los metabolitos y lípidos identificados en diversas muestras biológicas. Dado que la función de los ácidos grasos omega 3 puede depender de su ingesta, así como de la bioconversión a ácidos grasos de otra tipología, se empezará describiendo las principales fuentes dietarias en la población española, así como los mecanismos que influyen en la bioconversión del ácido α -linoleico a las diferentes especies de ácidos grasos omega 3. Posteriormente, se describirán las concentraciones plasmáticas normales tras su ingesta aguda o crónica, considerando principalmente los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico. Finalmente, se describirán los metabolitos implicados y las concentraciones observadas en condiciones fisiológicas.

En relación con las técnicas de metabolómica y lipidómica se hará referencia al uso de sistemas de cromatografía líquida acoplada a detectores de masas. Las aproximaciones toman en cuenta dos pasos: 1) la comparación del perfil metabolómico y lipidómico de diferentes individuos y 2) la integración de la información obtenida con datos clínicos y moleculares que permitan la generación de hipótesis sobre la significancia del perfil metabólico y lipidómico observados, así como de las posibles rutas y condiciones metabólicas que dan origen a dicho perfil. Existen diversos métodos de análisis descritos en la literatura, entre los cuales se incluyen: ELISA-, LC-, UV-, GC-MS y LC-UV-MS-MS (Lu et al., 2005, 2006; Jove et al., 2011). Finalmente, se referenciarán algunas bases de datos que pueden ser útiles para la determinación de la significancia fisiológica de los perfiles metabolómicos-lipidómicos observados.

1. Metabolismo de los ácidos grasos omega 3

1.1. Aspectos Nutricionales

Los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3 (AGPI n-3), son ácidos grasos de 18 o más carbonos, donde el primer doble enlace está localizado después del tercer carbono a

partir de la terminal metílica. Entre este grupo de ácidos grasos se incluyen los ácidos linoléico (ALA, 18:3 n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) y docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3), de interés nutricional debido a su bioactividad. Las principales fuentes de ácidos grasos omega 3 en la dieta son el pescado, las carnes rojas y las aves. El ALA predomina en plantas de hoja verde oscura y en los aceites de semillas de soja, colza, lino, nueces, grosella y otras frutas rojas, mientras que los animales marinos son ricos en EPA y DHA, al igual que las algas y el plancton de los cuales se alimentan, que constituyen las fuentes primarias de ácidos grasos omega 3. Asimismo, el contenido de ácidos grasos omega-3 varía en función de la especie de pescado, debido a su localización, la estación del año y la disponibilidad de fitoplancton.

Desde el punto de vista fisiológico, la mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por los mamíferos a partir de los hidratos de carbono de la dieta. Pero en el caso de los humanos, el ácido linoleico y el α -linoléico no pueden ser sintetizados de forma endógena, ya que el organismo humano no posee actividad $\Delta 12$ - ni $\Delta 15$ -desaturasa y, por tanto, no puede introducir dobles enlaces en los carbonos 12 o 15. Por este motivo, en nutrición, los ácidos grasos omega 3 son considerados nutrientes esenciales, siendo necesaria su ingesta para cubrir los requerimientos fisiológicos para un buen desarrollo y funcionamiento. Si bien es cierto que, tanto el EPA como el DHA pueden ser producidos a partir del ALA a través de una serie de reacciones enzimáticas en las que intervienen desaturasas y enlongasas, el proceso de conversión parece ser ineficiente (0.04 – 2.84%) (Gibson et al., 2012; Burdge et al., 2003) y está restringido por altas ingestas de EPA, DHA y ALA como se comentará más adelante.

En este sentido varias organizaciones recomiendan incrementar la ingesta dietética de ácidos grasos omega 3, tanto para obtener los beneficios nutricionales para un buen desarrollo, así como para la prevención de enfermedades (tabla 1). La mayor parte de estas recomendaciones se han establecido para la prevención de enfermedades crónicas, principalmente cardiovasculares, y pocas están basadas en los requerimientos de la población general. Recientemente la FAO/OMS ha establecido una recomendación de ingesta para adultos y mujeres no gestantes ni lactantes de 0,250 g/día de EPA+DHA, las cuales permiten un estado nutricional adecuado en la población general. En esta recomendación, no obstante, no se indica la dosis de cada uno de ellos, ni los valores mínimos de ingesta, por la falta de evidencia científica en este aspecto. Aunque si se sugiere un valor máximo aceptable de ingesta de 2 g/día, a partir de los cuales existe riesgo de peroxidación lipídica y una reducción en la producción de citoquinas (FAO, 2010).

Organización	País	Recomendación
National Heart Foundation	Australia	<ul style="list-style-type: none"> 0.5 g/día EPA+DHA más 2 g/día de ALA para reducir el riesgo de enfermedad coronaria. 1.0 g/día EPA+DHA más 2 g/día de ALA para pacientes con enfermedad coronaria documentada 1.2-4.0 g/día EPA+DHA para pacientes con niveles elevados de triglicéridos.
American Heart Association	USA	<ul style="list-style-type: none"> > de 2 raciones de pescado a la semana más aceites ricos en ALA en sujetos sin enfermedad coronaria 1.0 g/día EPA+DHA para pacientes con enfermedad coronaria documentada 2.0-4.0 g/día EPA+DHA para pacientes con niveles elevados de triglicéridos.
OMS	Internacional	0.2-0.5 g/día prevenir enfermedades coronarias e infartos
American Psychiatric Association	USA	1.0 g/día EPA+DHA para el tratamiento de desórdenes afectivos.
Scientific Advisory Committee on Nutrition	Reino Unido	Nutrición en general, por lo menos 0.45 g/día de ácidos grasos omega 3
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	Francia	Nutrición en general, 0.25 g/día EPA; 0.25 g/día DHA, 1% de la ingesta energética en forma de ALA.

Tabla 1. Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos omega 3 a nivel mundial.

Ácido graso omega 3	Rango de consumo (g/día)
α -linolénico	0.76 – 0.94
Eicosapentaenoico	0.05 – 0.32
Docosahexaenoico	0.19 – 0.85

Tabla 2. Rango de ingestas de ácidos grasos omega 3 en la población Española. Tomado de Amiano et al. 2001; de los datos del estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer) realizado Gipuzkoa, País Vasco.

En el caso de España, el consumo de ácidos grasos omega-3 (según datos de consumo del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación) es alrededor de 380 mg/día (340 mg/día de ácido docohexaenoico y 40 mg de eicosapentanoico), de los cuales el 67% proviene del consumo de pescados azules (atún, sardina y salmón). Resultados similares reportan otros investigadores con ingestas inferiores a 500 mg/día (tabla 2), sugiriendo que la ingesta promedio está por encima de los valores mínimos recomendados, pero por debajo de las recomendaciones para la prevención de enfermedades. En relación con otros biomarcadores de status de ácidos grasos omega 3, el omega 3 index (que se describe adelante en el apartado 3) en la población española es notablemente más elevado en comparación con países como

Estados Unidos (e.g. 7,1% vs 5,0%) pero menor en comparación con países con un elevado consumo de productos marinos como Japón, Korea y Alaska (Sala-Vila et al., 2011).

1.2. Absorción, metabolización y distribución de ácidos grasos omega 3

Para comprender mejor la metabolómica de los ácidos grasos omega 3 es necesario describir su ruta de acceso al organismo, su vía de distribución hacia los tejidos, las principales formas y sitios de almacenamiento, así como los compuestos producidos a partir de su metabolismo natural e inducido bajo condiciones fisiológicas o patológicas.

Como se mencionó anteriormente, los organismos vertebrados, por regla general, son incapaces de sintetizar ácidos grasos omega 3 a partir de precursores dicarbonados debido a la incapacidad de introducir dobles enlaces distales al carbono 9, motivo por el cual para cubrir las necesidades metabólicas es necesario obtenerlos a partir de la dieta. La absorción de los ácidos grasos ocurre principalmente en las porciones distales del intestino delgado mediado por los transportadores específicos para ácidos grasos FATP4 y CD36. No obstante, su biodisponibilidad depende de varios factores como sus propiedades físico-químicas (estructuras químicas a las cuales se encuentra asociado, e.g. triglicéridos); la matriz alimentaria en la cual se encuentra; la presencia o ausencia de otros compuestos que puedan incrementar o inhibir su absorción; su metabolización después de la absorción; y factores individuales, como el estado de salud y el perfil genético del individuo.

Entre las fuentes marinas de ácidos grasos omega 3, la estructura química a la cual se encuentran asociados puede variar considerablemente su biodisponibilidad. Generalmente el DHA se encuentra asociado a triglicéridos principalmente en la posición sn-2, y en pocas cantidades en forma de ácidos grasos libres, o enlazados a fosfolípidos, mientras que el EPA puede estar distribuido aleatoriamente en las tres formas. En este sentido, es de esperar que después de los procesos digestivos de la lipasa pancreática sobre las fuentes marinas de DHA, se obtenga como producto principal un mono-acil-glicérido de ácido graso omega 3. No obstante, algunos productos purificados de ácidos grasos omega 3 comerciales, producidos a partir de procesos de enriquecimiento y re-esterificación, muestran ácidos grasos omega 3 asociados en posición sn-1 y sn-2, lo cual puede dar como resultado de los procesos de digestión una mayor cantidad de ácidos grasos omega 3 libres.

Por otro lado, se han descrito diferencias en la eficiencia de la digestión de ácidos grasos omega 3 en relación a la molécula a la cual se encuentran esterificados. Estudios *in vitro*, demuestran que la eficiencia de las lipasas pancreáticas es de 10 a 50 veces menor sobre los ésteres-alcohol en comparación con los ésteres-glicerol (Yang et al., 1990). Adicionalmente,

en estudios *in vivo* se reporta una mayor biodisponibilidad en plasma de ácidos grasos omega 3 esterificados a fosfolípidos que unidos en forma de triglicéridos. Posiblemente, por una mayor exposición física de los fosfolípidos en las micelas biliares durante el proceso de digestión, favoreciendo la acción de la lipasa pancreática así como de la fosfolipasa A2. En relación a la interacción con otros componentes de la matriz alimentaria, poco se sabe sobre el efecto de otros nutrientes en la estabilidad de los ácidos grasos omega 3 durante los procesos de digestión. En términos generales para todos los ácidos grasos, su biodisponibilidad plasmática puede verse reducida por la formación de jabones cálcicos (Gacs y Barltrop, 1977). Si bien el grado de formación de jabones disminuye con el mayor grado de insaturación de los ácidos grasos y con la mayor longitud de cadena, es un factor poco determinante en la absorción de ácidos grasos omega 3.

La cinética de absorción a nivel intestinal puede estar determinada también por competencia entre los ácidos grasos digeridos. De forma general, existe una mayor afinidad del transportador FATP4 por ácidos grasos de cadena larga en relación con los de cadena corta; y por los de mayor insaturación en relación con los ácidos grasos monoinsaturados y saturados. Por ejemplo, la tasa de absorción del ácido araquidónico es mayor que la del ácido linoleico, y la del ácido α -linolénico mayor a la del araquidónico (Punchard et al., 2000). Adicionalmente, otras propiedades físicas de los ácidos grasos como su solubilidad (elevada para los de cadena corta y menor para los insaturados y de cadena larga), pueden afectar la velocidad de absorción, así los valores de velocidad máxima de absorción disminuyen al incrementar el grado de insaturación de los ácidos grasos (Graham y Sackham, 1983).

Respecto a la características celulares de absorción, algunos ácidos grasos pueden “difundir” a través de la membrana celular vía mecanismos de “flip-flop”. No obstante, la mayor parte de los ácidos grasos son transportados a través de las proteínas de membrana

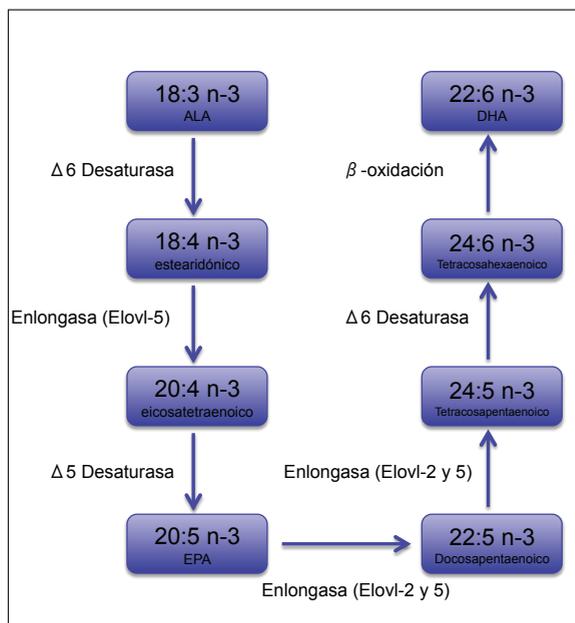


Figura 1. Biosíntesis de ácidos grasos omega 3 a partir del ALA.

CD36 y FATP4. La proteína de transporte CD36 se encuentra de forma más abundante en el tercio proximal del intestino delgado (Lobo et al., 2001) y es posiblemente inexistente en el íleon y colon. Sin embargo, su importancia en la absorción de lípidos no se encuentra claramente establecida, ya que los ratones knock out para CD36 no muestran signos de malabsorción lipídica a excepción de los ácidos grasos de cadena muy larga (Drover et al., 2008). Es posible que la deficiencia de este transportador pueda ser compensada por una mayor tasa de absorción en partes distales del tracto gastrointestinal. No obstante, su deficiencia induce cambios en la formación de quilomicrones, observándose quilomicrones con un volumen 35% inferior en comparación con ratones controles. La mayor importancia de los receptores CD36 radica posiblemente en la señalización a nivel del sistema nervioso central, así se ha observado que una reducción en la ingesta energética induce un incremento en la apatencia por alimentos lipídicos; efecto que parece estar regulado a nivel central por estos receptores.

Una vez absorbidos a través de la membrana apical de los enterocitos, los AGPI n-3 pueden ser utilizados como fuente de energía a través de la β -oxidación o incorporados al retículo endoplasmático para su reesterificación en triglicéridos, necesarios para la formación de quilomicrones y su transporte a través del sistema linfático para su captación por parte de los tejidos. Los quilomicrones remanentes son captados a partir de receptores específicos del tejido hepático, donde sufren una endocitosis y son digeridos a ácidos grasos libres. Las cinéticas de absorción suelen ser diferentes dependiendo del ácido graso en estudio. Por ejemplo, el EPA tiene una curva de absorción en la cual se ve un incremento progresivo hasta un pico máximo a las 8 horas y después disminuye paulatinamente; mientras que el DHA muestra un comportamiento bifásico con 2 picos máximos, uno 2 horas después de la administración del producto y otro a las 8 horas post-prandiales, manteniéndose elevado incluso 72 horas después de su administración (Schneider et al., 2011), lo que sugiere la participación hepática en la síntesis de DHA.

En relación con la síntesis de ácidos grasos omega 3, el hígado juega un papel importante por la capacidad del mismo de sintetizar DHA y EPA. Es en el hígado donde se producen una serie de reacciones de desaturación y enlongación, a partir de Δ -6 y 5 desaturasas y enlongasas, que permiten la conversión de ALA a EPA y el ácido tetracosahexaenoico (THA) (figura 1). Posteriormente el THA es dirigido a los peroxisomas, donde es convertido a DHA a través de la β -oxidación y a continuación es transportado de nuevo al retículo endoplasmático para su activación con la Coenzima A y su esterificación con fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina (figura 2).

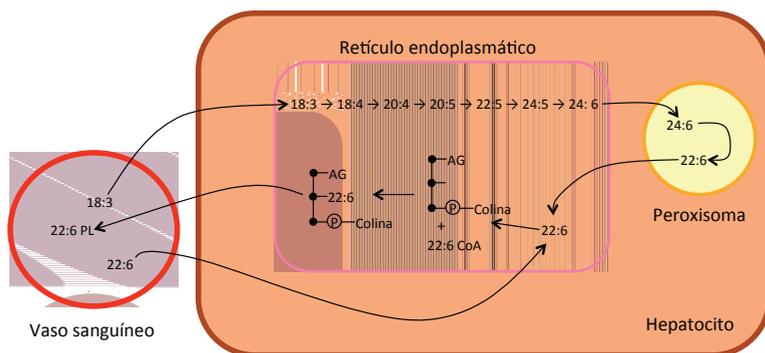


Figura 2. Síntesis de DHA en el tejido hepático a partir de fuentes dietéticas de ALA.

Las mismas enzimas de elongación y desaturación también están involucradas en el metabolismo del ácido linoleico a derivados más insaturados como el ácido araquidónico (20:4 n-6), el ácido adrenico (22:4 n-6) y, en situación de deficiencia de ácidos grasos esenciales, pueden generar el ácido eicosatrienoico a partir del ácido oleico. El hecho de que el ácido linoleico y el ALA compartan el mismo sistema enzimático implica que existe competencia para su metabolización. Este aspecto es importante sobre todo en dietas occidentales, donde el consumo del ácido linoleico es 10 veces mayor al ALA, sugiriendo que el metabolismo del primero predominaría.

También es necesario mencionar que se han reportado otros factores ambientales que inducen una disminución en la conversión del ALA en EPA y DHA, así como cambios en los perfiles de ácidos grasos en los tejidos. Por ejemplo, el consumo crónico de alcohol modifica el perfil de ácidos grasos de membrana, posiblemente por una mayor tasa de catabolismo de ácidos grasos. Estudios en animales muestran que la exposición crónica de alcohol disminuye la concentración de ácidos grasos poliinsaturados, y especialmente la concentración de DHA y AA, en hígado y cerebro. Así mismo, también se reportan niveles inferiores de DHA y AA en sangre de individuos alcohólicos. Otros factores como el tabaquismo muestran una correlación inversa con los niveles de DHA, la cual es independiente de la ingesta dietética de DHA. Posiblemente el daño oxidativo inducido por este factor induciría una mayor tasa de destrucción oxidativa del DHA y/o cambios en el metabolismo del DHA y EPA.

Tomando en cuenta solamente factores lipídicos, al incrementar la ingesta dietética del ALA se observa un incremento dosis dependiente de los niveles de EPA en fosfolípidos plasmáticos, así como en células sanguíneas (e.g. plaquetas, leucocitos). Sin embargo, el efecto del incremento del DHA inducido por el ALA no se encuentra claramente establecido y algunos estudios indican que existen diferencias respecto al sexo. Varias publicaciones describen que

las mujeres tienen niveles de DHA 2,5 veces mayores en comparación con los hombres. Más interesante resulta el hecho de que las mujeres que siguen una terapia de restitución hormonal con estrógenos muestran niveles de DHA 3 veces mayor que las mujeres sin medicación. En la misma línea, el tratamiento hormonal en hombres transexuales induce un incremento en los niveles de DHA, mientras que las mujeres transexuales con terapia de testosterona muestran niveles inferiores de DHA en comparación con otras mujeres. Estudios con ALA marcado también indican que la tasa de conversión de ALA a DHA puede verse afectada considerablemente por la dieta en el caso de las mujeres, mientras que en los hombres no se observan efectos significativos. Así, la tasa de conversión de ALA a DHA se ve disminuida en mujeres que siguen una dieta rica en pescado, mostrando una tasa de conversión similar a la de los hombres. Estos datos sugieren que los estrógenos juegan un papel importante en la conversión del ALA a DHA.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar esta dependencia del sexo, entre los cuales se mencionan las diferencias en las tasas de β -oxidación, la composición del tejido adiposo, la movilización de grasas, además del posible efecto de las hormonas sexuales en la actividad de las enlongasas y desaturasas. Existe evidencia de que la tasa de β -oxidación del ALA es alrededor del 33% en los hombres, mientras que en las mujeres es del 22% (Burge et al., 2002a y 2002b), situación que podría limitar la conversión del ALA en DHA. No obstante, las tasas de β -oxidación son similares a las observadas para otros ácidos grasos (por ejemplo palmitato) y por lo tanto, podrían reflejar las diferencias de la mayor masa muscular observada en los hombres en comparación con las mujeres. En el mismo sentido, el porcentaje de tejido adiposo es mayor en mujeres que hombres, así como el contenido de ácidos grasos no esterificados en plasma, los cuales son sensibles a hormonas y tienden a estar incrementados en mujeres en comparación a los hombres. Aún así, posiblemente los estrógenos son los principales determinantes de la tasa de conversión del ALA a DHA. Estudios *in vitro* han identificado que la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa (determinada por la producción de ácido araquidónico) en microsomas hepáticos aislados de ratas hembras, es reducida por el 17β -estradiol y la testosterona (Marra et al., 1988), sugiriendo que la regulación enzimática viene dada a partir de la señalización del receptor estrogénico.

Por último, la tabla 3, muestra un resumen de factores nutricionales, hormonales y otros diversos, que podrían influir en la actividad de las desaturasas y enlongasas. Algunos autores sugieren que la regulación de la transcripción de estas enzimas está determinada en su mayor parte por factores nutricionales de disponibilidad energética en comparación con factores hormonales. Así, en estudios de experimentación animal, la $\Delta 6$ -desaturasa es estimulada por incrementos de la ingesta de proteínas y energía (De Tomas et al., 1980; Brenner, 1981,1991).

Efecto que podría estar parcialmente mediado por la insulina, la cual se ha asociado positivamente con un incremento de la actividad de la $\Delta 6$ -desaturasa (Holman et al., 1983). Así mismo, los ácidos grasos poli-insaturados, entre ellos mayoritariamente los AGPI n-3, son los principales reguladores de factores de transcripción como PPAR $\alpha/\delta/\gamma$, SREBP1/2 y LXR α/β , que a su vez regulan varios genes relacionados con el metabolismo de glucosa y lípidos, como puede ser el transporte de grasas, síntesis de ácidos grasos, oxidación de ácidos grasos vía microsomal, vías metabólicas peroxisomales y mitocondriales, cetogénesis y desaturación de ácidos grasos. Es decir, los ácidos grasos omega-3 y -6 incrementan la β -oxidación a través de la activación de PPARs y simultáneamente previenen la lipogénesis a través de la inhibición de los factores de transcripción LXRs y SREBP, siendo su efecto más relevante en el hígado que en el resto de tejidos. Otros factores, como polimorfismos en los genes *FADS1* y *FADS2* (Fatty acid desaturase 1 y 2 respectivamente) muestran diferentes tasas de producción de DHA a partir de ALA (Xie e Innis, 2008) debido a una disminución en la actividad enzimática.

Enzima	Activación	Inhibición
<i>D6-Desaturasa</i>	Factores Nutricionales ATP Deficiencia de AGE Deficiencia Phe, Tyr Dietas hiperproteicas Dietas hipograsas Zn, Mg Piridoxina	Alcohol etílico Ayuno Glucosa, glicerol Deficiencia proteínas Deficiencia piridoxina Colesterol exógeno n-3 y n-6 AGPI AGS Exceso de Phe, Tyr trans-AGMI
	Factores hormonales Insulina	Glucagón Adrenalina Glucocorticoides ADH, ACTH Hiper e hipo T3 y T4
	Otros Temperatura externa baja Ayuno/re-alimentación	Temperatura externa alta Envejecimiento Radiación Virus oncogénicos
<i>D5-Desaturasa</i>	Insulina Acido linoléico AA Acido g-Linolenico	Dietas libres de grasa Colesterol exógeno Glucosa Vitamina A Ácidos grasos omega-3 Glucagón, adrenalina, glucocorticoides
<i>Enlongasas</i>	Deficiencia de ácidos grasos esenciales Dietas libres de grasa	Ayuno

Tabla 3. Factores que influyen en la actividad de las desaturasas y enlongasas.

En este sentido, es importante reiterar que para el análisis del consumo-funcionalidad del DHA y EPA, los niveles observados en sangre y tejidos pueden provenir tanto de la dieta como de la síntesis hepática y los mecanismos reguladores de las reacciones de elongación y desaturación, siendo el hígado un órgano clave como procesador y distribuidor de DHA hacia otros tejidos del cuerpo.

1.3. Incorporación de EPA y DHA en fosfolípidos de membrana en tejidos.

Los glicerofosfolípidos son los principales componentes de la membrana celular y su composición en ácidos grasos en algunos tipos celulares puede depender de la ingesta dietética de éstos. Por ejemplo, la ingesta dietética de EPA y DHA tiende a incrementar su contenido en membranas celulares a expensas de una reducción en los niveles de ácido araquidónico (AA) (O'Shea et al., 2009; Schuchardt et al., 2011). No obstante, la incorporación del EPA y DHA en fosfolípidos de membrana en algunos tejidos no se encuentra completamente esclarecida, a pesar de que resulta especialmente importante, ya que el perfil de ácidos grasos de membrana influye en sus propiedades físicas (grosor y fluidez) y biológicas (asociados a proteínas de membrana como enzimas, canales iónicos, receptores y transportadores).

Las isoformas de los transportadores de ácidos grasos (FATP), que muestran distintos patrones de expresión entre tejido (hígado, tejido adiposo, riñón, músculo y sistema nervioso central), podrían explicar las diferencias de captación de ácidos grasos de las VLDL en tejidos con diferentes requerimientos metabólicos de ácidos grasos. Así, se explicaría el enriquecimiento específico en DHA del sistema nervioso central, donde ácidos grasos específicos, según las necesidades metabólicas del sistema nervioso, son liberados de las lipoproteínas o la albúmina por la lipoprotein lipasa endotelial, específica de los capilares neurales, y posteriormente captados por la FATP1, expresada en la parte luminal de dichos capilares. El DHA captado es transportado a continuación hacia los astrocitos, donde puede ser incorporado a la membrana celular o transferido a otras neuronas para su incorporación a la membrana celular o empaquetamiento en el aparato de Golgi, desde donde puede ser transportado a la terminal sináptica para ser incorporado a elementos sinápticos y transferido a otras neuronas.

En el caso del músculo esquelético, a diferencia del sistema nervioso central, se ha demostrado en estudios de experimentación animal que el perfil de ácidos grasos saturados está altamente correlacionado con el perfil dietario. El perfil de ácidos grasos poliinsaturados sin embargo parece no estar influenciado por la dieta, pero sí la relación entre ácidos grasos omega 6 y 3. En el sentido de que un incremento en la proporción omega 6/omega 3 induce una mayor incorporación de ácidos grasos de la serie omega 6 y viceversa. Hecho que resulta

interesante debido a sus respectivos efectos en salud, sobre todo en situaciones inflamatorias como la insulinoresistencia (Abbott et al., 2010).

Posteriormente, estos mismos autores realizaron un estudio más detallado del efecto de dietas con diferentes perfiles de ácidos grasos sobre la composición lipídica de la membrana celular en hígado, cerebro, corazón, glóbulos rojos y plasma, observando que el perfil de ácidos grasos en fosfolípidos era prácticamente invariable con la dieta, incluso en el plasma y glóbulos rojos (Abbott et al., 2012) (figura 3). Por el contrario, el contenido de ácidos grasos en la fracción de triglicéridos podría ser un mejor indicador de la ingesta dietética. Adicionalmente, observaron que el balance entre los ácidos grasos omega 3 y 6 presentaba un comportamiento bifásico en relación a su composición en membranas celulares, de manera que las dietas con bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (menos del 10% de la energía) mostraban una alta correlación entre el perfil de ácidos grasos dietético y el de membrana celular; siendo el efecto en ingestas superiores al 10% no significativo.

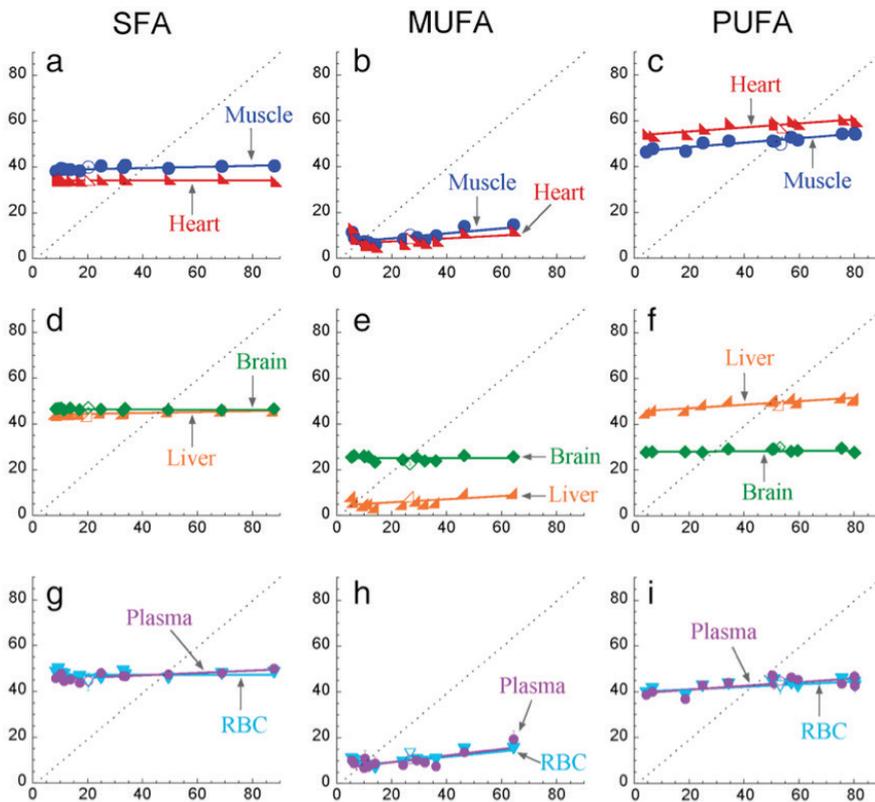


Figura 3. Correlación entre el perfil de ácidos grasos de membrana en músculo, corazón, cerebro, hígado, plasma y glóbulos rojos en ratas alimentadas con dietas de diferentes perfiles de ácidos grasos. Tomado de Abbot et al., 2012.

2. Biomarcadores clásicos del consumo de ácidos grasos omega 3

Debido a la importancia del consumo de ácidos grasos omega 3 en salud y nutrición, desde hace varios años que existe un creciente interés en la determinación por un lado, de la relación entre la ingesta y el contenido de estos ácidos grasos en diferentes compartimentos corporales y por otro, de la significancia biológica de la presencia de estos ácidos grasos en los tejidos. Hasta la fecha, se han descrito varios biomarcadores, aunque debido a la complejidad del metabolismo de estos nutrientes, no existe un consenso específico sobre cuál es el mejor biomarcador de ingesta y funcionalidad.

Un biomarcador es un espécimen biológico utilizado como un marcador de exposición a una sustancia, de metabolismo de una sustancia, o de la interacción entre la exposición y el metabolismo de una sustancia que tiene un efecto conocido en la disminución del riesgo de enfermedades. Un biomarcador aceptable debe cumplir las siguientes características:

- a) El método para la determinación del biomarcador debe estar estandarizado, ser específico y sensible.
- b) El material biológico utilizado para la cuantificación del biomarcador debe ser accesible y de fácil obtención.
- c) Debe existir una correlación entre el contenido del biomarcador en el material biológico y la ingesta dietética del nutriente.
- d) La relación entre el biomarcador y la ingesta dietética debe ser sensible y específica.
- e) El estatus del biomarcador puede estar relacionado o asociado con parámetros clínicos.

En el caso de los ácidos grasos omega 3 se han descrito varios procedimientos y metodologías para la determinación de sus niveles de ingesta dietética y actividad funcional. En términos generales, la valoración del estatus de ácidos grasos omega 3 se puede dividir en 2 aspectos como se describe en la figura 4. Desde un punto de vista *nutricional*, el interés principal es la determinación de la correlación entre la dosis (ingesta dietética) y la funcionalidad de los ácidos grasos a diferentes dosis, de tal forma que sea factible la estimación de los requerimientos nutricionales en la población general. En este aspecto se debe tener en cuenta la tasa de bioconversión de precursores de ácidos grasos omega-3 en la dieta, así como los valores mínimos para un estado nutricional adecuado y los valores máximos a partir de los cuales se pueden observar variaciones en la fisiología normal del individuo por efectos de toxicidad.

Desde un punto de vista *fisiológico*, el interés principal es la determinación de los factores que afectan la absorción/conversión, su distribución en los diferentes tejidos y la funcionalidad

que los ácidos grasos omega 3 y sus metabolitos presentan tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas. El conocimiento científico actual permite describir el estatus de ácidos grasos omega 3 de un individuo, no así las necesidades nutricionales del mismo ya que la relación entre dosis-contenido en diferentes tejidos respecto a su funcionalidad no está claramente establecida. La figura 4, muestra también los factores clave a tener en cuenta durante la evaluación de la ingesta y funcionalidad de los ácidos grasos omega 3. En relación con la dieta, debido a la variabilidad en el consumo de pescado, principal fuente de ácidos grasos omega 3, posiblemente el método más adecuado son los cuestionarios de frecuencia de consumo. No obstante, al ser un método subjetivo no es posible cuantificar el consumo real de un individuo. Deben tenerse en cuenta también los efectos individuales y dietéticos de la absorción y bioconversión de ácidos grasos omega 3, siendo el género y la edad los principales factores influyentes.

No obstante, la metodología para la determinación de ácidos grasos tanto en alimentos como en muestras biológicas está ampliamente documentada. En términos generales, el procedimiento para su determinación incluye una separación de la fracción lipídica de interés, una reacción de transmetilación para la formación de ésteres metílicos (FAME, fatty acids methyls esters) en algunos casos y la posterior identificación de ácidos grasos individuales por técnicas cromatográficas (AOCS, 2007). La metodología es bastante fiable y los principales problemas en la determinación pueden ser debidos a un mal manejo de las muestras, una baja tasa de recuperación de la fracción lipídica o una baja capacidad analítica durante la separación cromatográfica.

A. Nutrición (Dosis-Funcionalidad-Requerimiento)



B. Fisiología

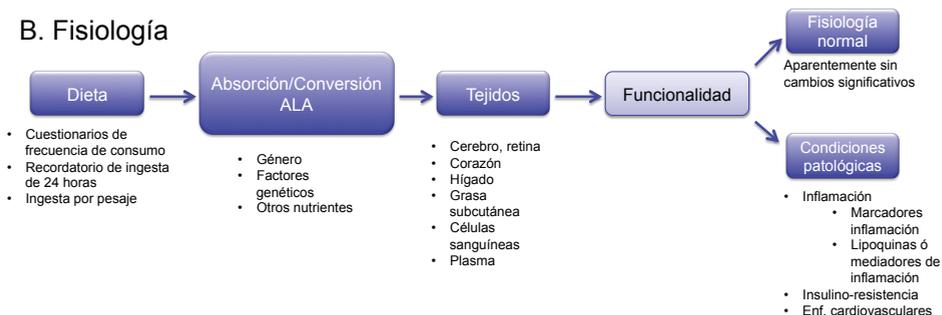


Figura 4. Aproximaciones para el estudio de la metabolómica de los ácidos grasos omega 3, desde un punto de vista funcional-fisiológico y nutricional.

En relación con las muestras de análisis del perfil de ácidos grasos, el interés general radica en la determinación del contenido de DHA y EPA en cerebro, corazón, retina, etc; órganos donde se encuentran en una mayor proporción. Sin embargo, la accesibilidad de estos órganos es nula en la mayor parte de las condiciones experimentales en humanos. Razón por la cual se han buscado otros tejidos y compartimentos biológicos para su análisis que puedan estar correlacionados con el contenido de estos ácidos grasos en dichos órganos diana. Los más ampliamente utilizados son el suero o el plasma, las membranas celulares de los eritrocitos y, de forma menos frecuente, el tejido adiposo, células bucales, espermatozoides, plaquetas y leucocitos (Sarri et al., 2008; Koletzko et al., 1999; Connor et al., 2000; Gulaya et al., 2001; Li et al., 2007; Vedin et al., 2008).

No obstante, es necesario enfatizar que existen diferencias de los niveles de ácidos grasos entre los tejidos sanguíneos y neuronales. Por ejemplo, los niveles de DHA en plasma son alrededor del 2 - 6% en comparación con un 14% o más en algunas partes del cerebro. En el plasma, el DHA se distribuye en dos compartimentos; principalmente en las fracciones de lipoproteínas y en una baja concentración (4-6%) en forma de ácidos grasos libres no esterificados. En la fracción de lipoproteínas, el DHA se encuentra esterificado a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, colesterol y triglicéridos. Mientras que en el cerebro, las fracciones de triglicéridos son bajas y la mayor parte de los AGPI n-3 se encuentra en las membranas celulares en las fracciones de fosfolípidos y diacilglicéridos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, varios estudios han demostrado una correlación entre la ingesta dietética de ácidos grasos omega 3 y su incorporación en compartimentos sanguíneos. En términos generales, la incorporación de DHA en ésteres de colesterol refleja la ingesta en un período de 1 a 2 semanas; el DHA presente en las membranas eritrocitarias, la ingesta en un período de 1 a 2 meses; mientras que el contenido de DHA en el tejido adiposo podría reflejar el consumo durante años. No obstante, algunos autores sugieren que el tiempo de vida media de los lípidos de membrana eritrocitarios es relativamente corto (7-9 h) y que su composición cambia continuamente durante la circulación, respondiendo de la misma forma que el contenido ácidos grasos en plasma (Skeaff et al., 2006). Los cambios de la dieta en relación a la ingesta de ácidos grasos pueden verse reflejados, de forma cualitativa, en las membranas de los eritrocitos en un tiempo tan corto como 2 semanas, observándose incluso correlaciones con algunos ácidos grasos después de 5 días de ingesta. A modo de comparación, en la tabla 4, se muestra el contenido de ácidos grasos en membranas celulares de eritrocitos en una población española. El consumo de ácidos grasos omega 3 en la población estudiada era de 0,9 g/

día (20:5 n-3 + 22:6 n-3) y un índice omega 3 de 7,1 lo cual podría ser considerado como adecuado tanto en ingesta como en composición lipídica de membrana celular.

Ácidos grasos	Medianas	Rango intercuartil
12:0	0.06	0.03 – 0.16
14:0	0.77	0.25 – 1.03
16:0	22.47	21.57 – 23.44
18:0	14.25	11.69 – 16.20
20:0	0.21	0.14 – 0.28
22:0	0.20	0.06 – 0.31
ΣAGS	37.57	35.73 – 39.96
14:1 n-5	0.31	0.14 – 0.48
16:1 n-7	0.53	0.19 – 0.84
cis,9-10:1 n-9	17.64	15.87 – 19.25
20:1 n-9	0.30	0.24 – 0.36
24:1 n-9	0.56	0.31 – 0.87
ΣAGM	20.02	17.9 – 21.67
18:2 n-6	13.42	11.7 – 15.56
18:3 n-6	0.12	0.08 – 0.18
20:3 n-6	1.93	1.64 – 2.29
20:4 n-6	16.52	14.62 – 18.1
Σn-6 AGP	31.98	30.41 – 34.05
18:3 n-3	0.17	0.11 – 0.27
20:5 n-3	0.94	0.71 – 1.26
22:5 n-3	1.81	1.46 – 2.21
22:6 n-3	6.09	5.16 – 6.82
Σn-3 AGP	9.21	7.84 – 10.42

Tabla 4. Proporciones de ácidos grasos en membranas celulares de eritrocitos en una población que sigue una dieta mediterránea. Tomado de Sala-Vila et al., 2011.

Para definir la especificidad de un biomarcador de ingesta de ácidos grasos omega 3, es necesario también tener en cuenta la producción endógena de EPA y DHA a partir de su precursor el ALA. Existe un gran consenso de que la ingesta de ALA contribuye de forma mínima en el incremento de los niveles de DHA en humanos. Si bien es cierto, que el ALA previene la disminución de los niveles de DHA, la suplementación extra de ALA no induce incrementos significativos de DHA en sangre, posiblemente por la regulación de la Δ6 desaturasa como se ha descrito previamente. Varios estudios demuestran que existen niveles marginales de DHA en sangre incluso cuando su ingesta dietética es nula. Sin embargo, la suplementación de DHA a altas dosis promueve un incremento logarítmico de los niveles sanguíneos, de

manera que con ingestas superiores a 2 g/día no se observan incrementos correlativos en sangre, llegando a la saturación del sistema. Es decir, a niveles de suplementación inferiores a 2 g/día, el incremento plasmático de DHA podría corresponder exclusivamente a la ingesta dietética. Este comportamiento logarítmico fue descrito por Arterburn y colaboradores (2006) a partir de una meta-regresión de estudios de dosis respuesta a 16 niveles de suplementación, obteniendo la siguiente ecuación de la curva $y=1,742 \ln(x)+4,023$ ($r^2=0,91$). Otros autores han desarrollado modelos matemáticos predictivos, que aplicados a la ingesta dietética de ácidos grasos omega 3 y 6, pueden predecir la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos y, de manera inversa, en base a la composición de los ácidos grasos plasmáticos, puede determinar la ingesta de ácidos grasos omega 3 de la dieta (Lands et al., 1992).

Pero, ¿cuál sería el mejor indicador en sangre de la ingesta dietética de ácidos grasos omega 3? Existen revisiones sistemáticas que evalúan hasta 41 estudios sobre biomarcadores de ingesta de ácidos grasos omega 3 (Serra-Majem et al., 2012). Como conclusión, las mediciones en plasma y eritrocitos según los datos publicados, parecen ser los mejores marcadores de ingesta; mientras que las fracciones de lipoproteínas LDL y HDL y las células blancas, no muestran una buena correlación entre ingesta y contenido.

En base a esta información se han definido dos índices para determinar el estatus de ácidos grasos omega 3 en poblaciones: 1) El omega-3 index (Harris et al., 2007), que expresa los niveles de EPA + DHA en las membranas eritrocitarias como un porcentaje del total de ácidos grasos; y 2) el HUFA index (highly unsaturated fatty acids; ≥ 20 carbonos y ≥ 3 dobles enlaces), descrito por Stark et al (2008), que determina el contenido de n-3 HUFA en relación con el total de HUFA en compartimentos sanguíneos.

Teniendo en consideración que los niveles sanguíneos de ácidos grasos omega 3 pueden estar correlacionados con la ingesta dietética, el siguiente punto a determinar es si los niveles sanguíneos están correlacionados con los observados en tejidos diana (cerebro, retina, etc.). Varios estudios en modelos animales observan un alto nivel de correlación entre los niveles de DHA en plasma y membrana de eritrocitos y el contenido en cerebro, retina e hígado. Por ejemplo, los niveles de DHA en cerebro de mandriles neonatos correlaciona con los niveles que presentan las membranas de eritrocitos ($r^2=0,86$) (Sarkadi-Nagy et al., 2004). De la misma forma que en cerebro, los niveles cardiacos de DHA muestran una buena correlación con los niveles de la membrana eritrocitaria (Harris et al., 2006) en sujetos con baja y alta ingesta de ácidos grasos omega 3. Sugiriendo que la determinación de la composición de ácidos grasos en compartimentos sanguíneos puede ser un indicador de los niveles de dichos ácidos grasos en otros tejidos.

3. Marcadores metabolómicos y lipidómicos de exposición y funcionalidad de ácidos grasos omega 3.

A modo de introducción, la metabolómica y lipidómica son metodologías incluidas dentro de las ciencias ómicas con el fin de determinar al máximo posible, los metabolitos y lípidos en diferentes compartimentos corporales en un tiempo determinado. Los metabolitos (entre ellos también los lípidos) son pequeñas moléculas químicamente transformadas durante el metabolismo, por lo que su análisis puede proporcionar una visión funcional del estado de un organismo. A diferencia de los genes y las proteínas (genómica y proteómica respectivamente), cuya función y expresión pueden estar regulados epigenéticamente o por modificaciones post-transcripcionales; los metabolitos pueden servir como marcadores de la actividad bioquímica en un momento dado, la cual es altamente correlativa al fenotipo del individuo. El término lipidómica es relativamente nuevo (2001) y se define como el análisis de todos los lípidos de una muestra biológica con el fin de caracterizar las especies moleculares presentes y sus funciones biológicas.

Desde un punto de vista conceptual, el avance en los conocimientos sobre metabolómica-lipidómica pueden verse afectados por el hecho de que los compuestos a analizar son productos de la actividad enzimática, por lo que los resultados pueden presentar variaciones procedentes de diferencias inter-individuales y/o en el tiempo. La composición de metabolitos de una muestra podría reflejar la dieta habitual, genética, fenotipo metabólico, estilos de vida, regulación hormonal y la interacción entre ellos de un individuo. De hecho, la dieta es uno de los factores que más efectos importantes tiene sobre los sustratos, productos e inducción enzimática del metabolismo, con lo cual puede existir una gran variabilidad entre mediciones incluso para un mismo individuo.

El progreso en el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas hace que actualmente sea posible medir de forma rápida miles de metabolitos a partir de una muestra pequeña. No obstante, el primer paso para el estudio del metaboloma (conjunto/composición de metabolitos de una muestra) es la determinación del número de metabolitos a analizar. En algunos casos, puede resultar de interés el análisis de un set definido de metabolitos, por ejemplo de una vía metabólica específica, utilizando una aproximación denominada *Metabolómica Dirigida*, la cual permite una cuantificación más precisa de cada metabolito. Por otro lado, también es posible realizar una aproximación "no dirigida" (*Metabolómica No Dirigida*), en la que se analizan todos los metabolitos posibles y permite la comparación del metaboloma entre dos muestras o tipología de muestras. Esta última aproximación resulta útil en la determinación de nuevos biomarcadores, debido a que muchas de las

moléculas detectadas no se encuentran incluidas en la mayoría de bases de datos actuales de metabolitos. Por otro lado, la cuantificación de metabolitos requiere que cada uno de ellos sea comparado con un estándar interno, determinando la diferencia de áreas. Esta metodología es claramente problemática en el análisis de todas las especies de metabolitos posibles, ya que implica una gran cantidad de estándares internos. Adicionalmente, los rangos de linealidad para la cuantificación pueden ser diversos entre metabolitos, imposibilitando una cuantificación adecuada. De forma que cuando el objetivo del estudio es solamente la identificación química de la especie, la cuantificación de los metabolitos puede obviarse.

El momento de toma de muestras puede ser crucial en la determinación de los efectos de los mapas metabolómicos y lipidómicos en la fisiología del individuo. La mayoría de estudios se realizan en individuos en ayunas. De hecho, la mayoría de bases de datos de metabolitos muestran concentraciones en estados basales que permiten su comparación. En ese sentido, algunos de los efectos de la ingesta prolongada de ácidos grasos omega 3, pueden reflejar cambios en la proporción de diferentes grupos de lípidos. Por ejemplo, el consumo de pescado graso durante 8 semanas muestra una disminución de varias especies de lípidos bioactivos, como ceramidas, diacilgliceroles, lisofosfatidilcolinas y lisofosfatidiletanolaminas, en comparación con un grupo control (ingesta de pescado magro o carne) (Lankinen et al., 2009), los cuales están asociados con la señalización de la insulina y la inflamación.

Así mismo, últimamente se ha reflejado la importancia de la medición de la respuesta de los individuos a los alimentos en la fase post-prandial, ya que se observan diferencias marcadas entre individuos que pueden ser predictoras de ciertas enfermedades (Jackson et al., 2012). Por ejemplo, el incremento de triglicéridos o lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus remanentes son factores de riesgo independientes de enfermedades cardiovasculares (Karpe, 1997). Por otro lado, el efecto de las fluctuaciones de ácidos grasos libres entre mono y saturados puede explicar el cambio de β -oxidación a glicólisis y almacenamiento de grasas en pruebas de tolerancia oral a la glucosa en individuos sanos (Zhao et al., 2009). Las mediciones de metabolitos post-prandiales permiten por lo tanto la identificación de “discriminadores individuales”, que por definición son aquellos metabolitos que muestran una baja variación frente a un estímulo dietario después de la medición en tres exposiciones similares, y la cual es menor en comparación con otros tres sujetos (Zivkovic et al., 2009).

En relación con las técnicas de análisis se debe prestar especial atención tanto a los métodos de extracción, los cuales deben ser adecuados según la especie lipídica a analizar, así como a los métodos de detección. La tabla 5 muestra un resumen de los métodos de análisis recomendados según la especie lipídica. Aunque hay métodos de extracción generalistas,

el uso de un solo solvente o paso de extracción puede limitar el análisis exacto de todas las especies lipídicas. En cuanto al método de detección, la mayoría se basan en el análisis por espectrometría de masas, de las cuales existen dos tipos de aproximaciones: 1) basada en la infusión directa de la muestra sin separación cromatográfica previa, denominada “shotgun lipidomics”; y 2) basadas en la separación cromatográfica previa al análisis de espectrometría de masas. La metodología de “shotgun” permite el análisis de las muestras en base a propiedades físico-químicas y, dado que no necesita una separación previa, permite un mayor número de análisis de muestras en relación al tiempo. El principal inconveniente de este método es que el grado de resolución es bajo y las especies más abundantes en las muestras pueden enmascarar a las de menor abundancia. Posiblemente, el detector más versátil para esta metodología sería un QTOF. Respecto al análisis basado en la separación cromatográfica previa, el análisis dependerá de la tipología de la especie a analizar. En la página web de la American Oil Chemist’s Society, existe información detallada de los métodos de extracción, purificación, separación y detección, que pueden servir de guía para el diseño de experimentos. Asimismo, en la tabla 6 se muestra un resumen de las ventajas y limitaciones de las diferentes técnicas cromatográficas de análisis de lípidos, con el límite de detección específico para cada método. Desde métodos altamente sensibles como el ELISA, que permite cuantificaciones de 1 a 5 pg, posiblemente útil para la determinación de mediadores inflamatorios en condiciones basales; hasta métodos clásicos como la GC-MS.

Grupo	Extracción	Método
Ácidos grasos	Metanol HCl/Isooctano	GC/MS, estándares deuterados
Eicosanoides	SPE	LC/MS (fase reversa)- ESI-QTRAP
Glicerofosfolípidos	Metanol HCl/CHCl ₃	LC/MS (fase normal)- ESI-QTRAP
Cardiolipinas	Metanol HCl/CHCl ₃	LC/MS (fase normal)- ESI-QSTAR-XL utilizando métodos MS/MS.
Glicerofosfolípidos	Acetato de Etilo/ Isooctano Derivatización de diacilgliceroles	LC/MS (fase normal)-ESI-QTRAP, modo de detección [M+NH ₄] ⁺
Ésteres de colesterol	Acetato de etilo/ Isooctano	LC/MS (fase normal)-ESI-QTRAP, modo de detección [M+NH ₄] ⁺
Esteroles	Saponificación, Metanol/CHCl ₃ , SPE	Combinación de GC/MS, LC/MS (fase reversa) en ESI-QTRAP y APCI-MS.
Esfingolípidos	Metanol/CHCl ₃ + KOH metanólico	Combinación de LC-C18, LC-Si y LC-NH ₂ , ESI-QTRAP y API-3000 TQP con métodos MRM.
Prenoles	Metanol HCl/CHCl ₃	LC/MS (fase reversa), QSTAR-XL.

Tabla 5. Resumen de los métodos de análisis recomendados según la especie lipídica a analizar.

Pasada la fase de análisis, el siguiente paso es el procesamiento de datos. En el caso de la metabolómica dirigida, existen varias bases de datos a consultar para la interpretación de análisis metabolómicos y lipidómicos. En el caso de los lípidos, en la página web Lipidomics Gateway se pueden encontrar tutoriales para la determinación de las diferentes especies lipídicas (*Lipidomics methods*). Hasta el momento, tienen indexadas 37566 estructuras de lípidos. Adicionalmente, para la determinación de los efectos de las diferentes especies lipídicas en el metabolismo, transcripción génica, etc., es recomendable utilizar una base de datos más generalistas de metabolitos. El Human Metabolome Database es una base de datos bastante amplia de metabolitos humanos en diferentes compartimentos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo), referida tanto a sus concentraciones en condiciones fisiológicas normales, como patológicas. Esta misma web contiene información espectral del compuesto y un link a la KEGG para la localización de la especie dentro del metabolismo humano, así como las vías metabólicas implicadas.

Método	Límite de detección	Ventaja	Limitación
LC-UV-MS-MS	10 pg - 1 ng	Posiblemente el método más sensible y exacto. No es necesario derivatizar los lípidos.	Métodos específicos son necesarios para la cuantificación de metabolitos.
GC-MS	100 ng	Detección de múltiples analitos en una sola adquisición.	La derivatización es necesaria. Algunos metabolitos no se observarían.
LC-UV	1 ng		Puede existir co-elución de analitos con tiempos de retención similares. Espectro UV del analito es necesario.
ELISA	1 pg a 5 pg	Alta sensibilidad y selectividad.	Disponible para algunos mediadores lipídicos (PGE2, PGD2, LTB4, LXA4).

Tabla 6. Características de los diferentes métodos de lipidómica

En el caso de la metabolómica no dirigida, el trabajo principal es el procesamiento de datos para la comparación de las muestras y filtrado de información. Para ello es necesario la utilización de análisis estadísticos multivariantes, los cuales pueden ser supervisados (PLSDA, Partial Least Squares Discriminant Analysis), en los que se identifican previamente las muestras separandolas por grupos (tratamientos, sexos, edades, etc.); y no supervisados (PCA, Principal Component Analysis), que analiza la varianza entre las muestras, de tal forma que las muestras similares presentan poca variación entre ellas y

tienden a estar agrupadas y las muestras diferentes muestran un mayor grado de variación y se encontrarán más separadas. Estos resultados se grafican de forma tridimensional, donde la variación entre todos los componentes da como resultado una localización en un punto determinado (x,y,z). También se pueden utilizar otros tipos de análisis de agrupación o clusterización para la representación de las diferencias entre las muestras (por ejemplo Heat Map). Identificada la diferencia de masas entre las muestras, se puede hacer uso de las bases de datos metabolómicas descritas anteriormente para la identificación de biomarcadores.

En términos generales, un procedimiento metabolómico para la identificación de biomarcadores consistiría en el desarrollo de una metabolómica no dirigida para la identificación de especies diferenciales, seguido de una metabolómica dirigida para la cuantificación de dichas especies diferenciales, de la siguiente forma:

- i. Extracción y purificación de la muestra
- ii. Análisis por espectrometría de masas
- iii. Determinación de metabolitos diferenciales por métodos de análisis estadístico
- iv. Identificación de metabolitos diferenciales en bases de datos
- v. Selección de patrones y construcción de rectas de calibración
- vi. Cuantificación de metabolitos en muestras

Pero posiblemente, el trabajo más complicado es la comprensión de la significancia fisiológica de los diferentes perfiles metabolómicos obtenidos. En el caso de los ácidos grasos omega 3, existe información sobre el efecto de metabolitos directos, así como de otros metabolitos inducidos por transcripción génica.

El estudio de las funciones señalizadoras de los lípidos es posiblemente más complicado que el estudio de sus estructuras. Las membranas celulares y nucleares son fuentes de moléculas lipídicas señalizadoras denominadas oxilipinas (generalmente por la adición de oxígeno-oxidación a las estructuras); las cuales se pueden clasificar en tres tipos:

- Metabolitos de ciclooxigenasas (COX)
- Metabolitos de lipoxigenasas (LOX)
- Metabolitos del citocromo P450 (cytP450)

Los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga de 18-20 carbonos, incluyendo EPA y AA, son precursores de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos); mientras que los ácidos grasos de 20-22 carbonos, son precursores de resolvinas, lipoxinas y neuroprotectinas (figura 5, esquema general de metabolitos generados a partir del efecto de los ácidos grasos sobre COXs, LOXs y cytP450; tabla 7: lista metabolitos producidos por cada ácido graso). En líneas generales, los ácidos grasos son liberados de las membranas celulares por la fosfolipasa A2 (PLA2) y transformados por las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1, COX-2) en prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX), por las lipooxigenasas (LOX) 5, 8, 12 y 15 en leucotrienos (LT), y ácidos hidroxi-eicosatetraenoico (HETE), hidroperoxi-eicosatetraenoico (HPETE) e hidroxi-eicosapentaenoico (HEPE). Adicionalmente, los derivados trihidroxi de EPA dan lugar a resolvinas (Rv) o lipoxinas (LX); así como los derivados dihidroxi- y trihidroxi del DHA, a las series D de resolvinas, neuroprotectinas y maresinas. Existen dos publicaciones recientes que describen métodos de metabolómica dirigida para el análisis de hasta 39 metabolitos lipídicos de forma simultánea con una sensibilidad de 0.07 a 32 pg (20 pM-10 nM) (Yang et al., 2009 y 2011).

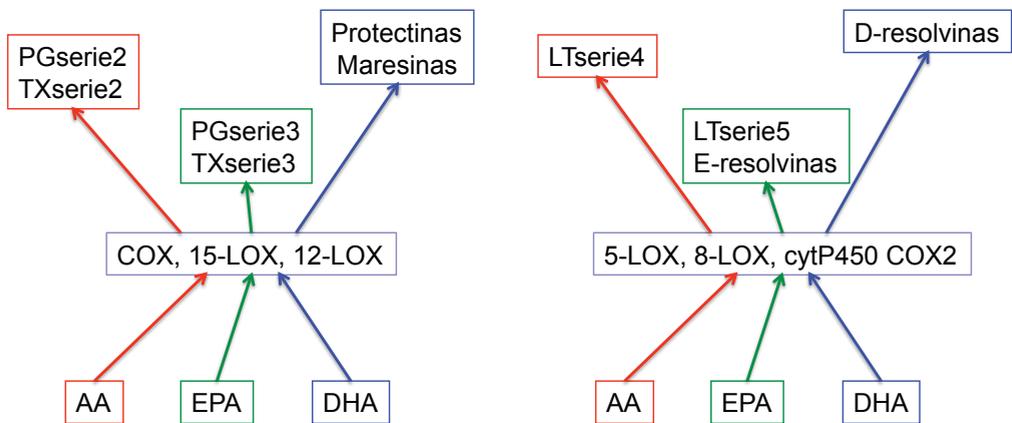


Figura 5. Principales especies lipídicas inducidas enzimáticamente.

Ácido Graso	Enzima	Productos iniciales	Productos intermedios	Productos finales	Función
AA	COX	PGG2, PGH2	PGD2, PGE2, PGI2, PGF2a, PGJ2	TXA2, TXB2	Pro-inflamatorio
	15-LOX	15-HPETE	15-HETE	LXA4, LXB4	Pro-inflamatorio
	12-LOX	12-HPETE	12S-HETE	-	Inactivo?
			12R-HETE	-	Activación de ICAM-1 por NFκB, expresión de proto-oncogenes
	5-LOX	5-HPETE	5-HETE, LTA4	LTB4, LTC4, LTD4, LTE4	Pro-inflamatorio
	8-LOX	8-HPETE	8-HETE	-	Pro-inflamatorio
	COX-2 inhibida por aspirina Cyt P450	15R-HPETE	15R-HETE	15-epi-LXA4, 15-epi-LXB4	Anti-inflamatorio
Cyt P450 Monooxygenasas	Por hidroxilasas: 19-HETE, 20-HETE	-	-	-	-
		Por epoxigenasas: 5,6-EET	8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET	5,6-epoxy-PGE1 diHETEs	Pro-inflamatorio
EPA	COX	PGG3, PGH3	PGD3, PGE3, PGI3, PGF3a	TXA3	Pro-inflamatorio
	15-LOX	15-HPEPE	15-HEPE	-	Anti-inflamatorio
	12-LOX	12-HPEPE	12-HEPE	-	Anti-inflamatorio?
	5-LOX	5-HPEPE	5-HEPE, LTA5	LTB5, LTC5, LTD5, LTE5	Pro-inflamatorio
	COX-2 inhibida por aspirina Cyt P450	18R-HPEPE	5S(6)-epoxy-18R-hydroxy-7E,9E,11Z,14Z,16E-EPA	RvE1	Resolución inflamación
			5S-hydroperoxy-18R-hydroxy-8Z,11Z,14Z,16E-ETA	RvE2	Resolución inflamación
	COX-2 inhibida por aspirina Cyt P450	18S-HPEPE	5S(6)-epoxy-18R-hydroxy-HEPE 5S-hydroperoxy-18S-HEPE	18S-RvE1, 18S-RvE2	Pro-resolvinas
DHA	15-LOX	17S-HPDHA	NDP1	-	Neuroprotección, protección fotoreceptores, protección de estrés oxidativo
	5-LOX	17S-HPDHA	17S-RvD1	-	Pro-resolvinas
	COX-2 inhibida por aspirina	17R-HPDHA	17R-RvD1	-	Pro-resolvinas
	12-LOX	14s-HPDHA	MaR1	-	Pro-resolvinas

Tabla 7. Mediadores lipídicos producidos a partir de diferentes ácidos grasos y sus funciones. Tomado de Kremmyda et al., 2011.

Teniendo en cuenta las diversas vías metabólicas que dan origen a las diferentes especies lipídicas, a la hora de determinar la significancia fisiológica del perfil lipídico analizado es útil considerar los distintos estimuladores enzimáticos (tabla 8) (generalmente citoquinas inflamatorias), y no enzimáticos (estrés oxidativo) de la metabolización de ácidos grasos de membrana. En este sentido, tanto el análisis de vías inflamatorias como del estrés oxidativo puede resultar difícil. En el primer caso, debido a la complejidad de las propias vías inflamatorias y que las células normalmente responden a mapas inflamatorios complicados; y en el segundo caso, porque su inducción puede proceder de orígenes diferentes. Adicionalmente, en relación con el estrés oxidativo, las estructuras lipídicas de las membranas celulares se podrían considerar químicamente frágiles. Los fosfolípidos y particularmente los ácidos grasos poliinsaturados son sensibles a convertirse, mediante varias reacciones químicas de oxidación, hidrólisis, etc (termodinámicamente favorables), en productos de solubilidad y estructuras variables con capacidad de señalización celular. El estudio de reacciones de auto-oxidación controlada en diferentes grados permitiría distinguir entre las especies lipídicas producidas por reacciones enzimáticas biológicamente controladas y las producidas por agresiones oxidantes. Actualmente, no es sorprendente el desconocimiento de la importancia de las diferentes especies lipídicas en la biología celular ya que los derivados lipídicos de cualquiera de estas reacciones parecen tener funciones reguladoras específicas, hasta el punto de que el excesivo uso de antioxidantes puede resultar controvertido.

El estudio de la diversidad de metabolitos inducidos por mediadores lipídicos podría dividirse en 1) relacionados con vías del metabolismo energético y 2) relacionados con vías inflamatorias. No obstante, también podrían estar implicados en otras vías metabólicas a nivel del sistema nervioso central.

La regulación del anabolismo y catabolismo lipídico está críticamente controlada por la homeostasis energética celular, la cual está regulada y auto-regulada por varios receptores nucleares que actúan como sensores de necesidad energética. Entre ellos, se puede mencionar la familia de PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), factores de transcripción de genes involucrados en la regulación de la diferenciación celular, metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y otras vías metabólicas. Se han identificado tres tipos de PPARs (alfa, gama, beta-delta) con una expresión diferencial entre tejidos. PPAR se expresa predominantemente en tejidos que

Enzima	Estimulador
15-LOX	IL-4 IL-13
5-LOX	LPS TNF α GM-CSF
COX-2	IL-1 β LPS TNF α fMLP TGF- β GM-CSF

Tabla 8. Factores inflamatorios estimuladores de enzimas involucradas en la generación de eicosanoides y docosanoides.

oxidan ácidos grasos (hígado, músculo, tejido adiposo marrón), regulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo, transporte y oxidación de lípidos, y la homeostasis de la glucosa. La activación de estos genes resulta en el incremento de la captación y oxidación de ácidos grasos y la hidrólisis de triglicéridos, dando como resultado neto una disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos y un incremento de HDL y flujo de colesterol. Este mecanismo regulador podría resultar importante en patologías metabólicas como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 o, en su conjunto, el síndrome metabólico.

Por otro lado, en condiciones de inflamación, la suplementación de ácidos grasos omega 3 tiende a reducir el contenido de biomarcadores de inflamación, cosa que no ocurre en individuos sanos, posiblemente por los bajos niveles de biomarcadores inflamatorios en plasma que éstos presentan (Rangel-Huerta et al., 2012). No obstante, algunos autores han estudiado el efecto de los ácidos grasos omega-3 en poblaciones sanas, estimulando de manera transitoria la producción de mediadores de inflamación (citoquinas inflamatorias, proteínas de fase aguda) y estrés oxidativo, a través de la respuesta inflamatoria que se induce después del ejercicio físico. En este contexto experimental, la suplementación con ácidos grasos omega-3 muestra una disminución de los niveles de proteína C reactiva, IL-6 y TNF α (Bloomer et al., 2009).

Para finalizar, es posible concluir que desde que Dyerberg estableció una relación entre la ingesta de ácidos grasos omega-3 y el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular al estudiar el patrón dietético de la población esquimal de Groenlandia, varios estudios y meta-análisis de los mismos han demostrado los efectos beneficiosos de la suplementación con ácidos grasos omega-3. Y, aunque los mecanismos y vías metabólicas de acción implicados no están esclarecidos, el estudio de la metabolómica-lipidómica en un punto determinado podría dar una “instantánea” del comportamiento metabólico de los ácidos grasos omega-3. De manera que si esta instantánea se repitiera varias veces a lo largo del tiempo, se podrían vislumbrar las implicaciones metabólicas de dicha suplementación.

Referencias

- Abbott S., Else P., Hulbert A.J. (2010). Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA. *British Journal of Nutrition*, 103:522-529.
- Abbott S., Else P., Atkins T.A., Hulbert A.J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818:1309-1317.
- American Oil Chemical Society. (<http://lipidlibrary.aocs.org/analysis.html>)
- Amiano P., Dorransoro M., de Renobales M., Ruiz de Gordo J.C., Ingóien I, y The EPIC group of Spain. (2001). Very-long-chain omega-3 fatty acids as markers for habitual fish intake in a population

- consuming mainly lean fish. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(10):827-832.
- Arterburn L.M., Hall E.B., Oken H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 83(6 Suppl):1467S-1476S.
- AOCS. (2007). Direct methylation of lipids for the determination of total fat, saturated, cis-monounsaturated, cis-polyunsaturated, and trans fatty acids by chromatography.
- Bloomer R.J., Larson D.E., Fisher-Wellman K.H., et al. (2009). Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids in Health and Disease*, 19:8-36.
- Brenner R.R. (1981). Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 20:41-47
- Brenner R.R. (1991). Endocrine control of fatty acid desaturation. *Biochemical Society Transactions*, 18:773-775.
- Burdge G.C., Jones A.E., Wootton S.A. (2002a). Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *British Journal of Nutrition*, 88:355-363.
- Burge G.C., Wootton S.A. (2002b). Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acid in young women. *British Journal of Nutrition*, 88:411-420.
- Burdge G.C., Finnegan Y.E., Williams C.M., Wootton S.A. (2003). Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]α-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards β-oxidation in older men. *British Journal of Nutrition*, 90:311-321.
- Connor S.L., Zhu N., Anderson G.J., et al. (2000). Cheek cell phospholipids in human infants: a marker of docosahexaenoic and arachidonic acids in the diet, plasma, and red blood cells. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1):21-27.
- De Tomas M.E., Mercuri O., Rodrigo A. (1980). Effects of dietary protein and EFA deficiency on liver delta-5, delta-6 and delta-9 desaturase activities in the early developing rat. *Journal of Nutrition*, 110:595-599.
- Drover V.A., Nguyen D.V., Bastie C.C., Darlington Y.F., Abumrad N.A., Pessin J.E., London E., Sahoo D., Philips M.C. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283:13108-13115.
- FAO/WHO. (2010). *Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation.* 91(66). Roma.
- Gacs G., Barltrop D. 1977. Significance of Ca-Soap formation for calcium absorption in the rat. *Gut*, 18:64-68.
- Gibson R.A., Neumann M.A., Lien E.L., Boyd K.A., Tu W.C. (2012). Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 88(1):139-146.
- Graham D.Y., Sackham J.Y. (1983). Solubility of calcium soaps of long chain fatty acids in simulated intestinal environment. *Digestive Disease and Science*, 28:733-756.
- Gulaya N.M., Margitich V.M., Govseeva N.M., Klimashevsky V.M., Gorpynchenko I.I., Boyko M.I. (2001). Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Archives of Andrology*, 46(3):169-175.
- Harris W.S., Assaad B., Poston W.C. (2006). Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, 98(4S1):19-26.

- Harris W.S., Poston W.C., Haddock C.K. (2007). Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events. *Atherosclerosis*, 193(1):1-10.
- Holman R.T., Johnson S.B., Gerrard J.M., Mauer S.M., Kupcho-Sandberg S., Brown D.M. (1983). Arachidonic acid deficiency in streptozocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Science*, 80:2375-2379.
- Human Metabolome Database: www.hmdb.ca
- Jackson K.G., Poppitt S.D., Minihane A.M. (2012). Postprandial lipemia and cardiovascular disease risk: interrelationships between dietary, physiological and genetic determinants. *Atherosclerosis*, 220:22-33.
- Jové M., Serrano J.C., Ortega N., Ayala V., Anglès N., Reguant J., Morelló J.R., Romero M.P., Motilva M.J., Prat J., Pamplona R., Portero-Otin M. (2011). Multicompartmental LC-Q-TOF-based metabolomics as an exploratory tool to identify novel pathways affected by polyphenol-rich diets in mice. *Journal of Proteome Research*, 10(8):3501-3512.
- Karpe F. (1997). Mechanisms of postprandial hyperlipidaemia-remnants and coronary artery disease. *Diabetic Medicine*, 14 (Suppl 3):S60-S66.
- Kemmyda L.S., Turzicka E., Stankova B., Zak A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease. A review, part 2. *Biomedical papers of the medical faculty of the university of Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155:195-218.
- Koletzko B., Knoppke B., von Schenck U., Demmelmair H., Damli A. (1999). Non-invasive assessment of essential fatty acids status in preterm infants by buccal mucosal cell phospholipid analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 29(4):467-474.
- Lands W.E., Libelt B., Morris A., et al. (1992). Maintenance of lower proportions of (n-6) eicosanoids precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n-3) fatty acids. *Biochemical and Biophysical Acta*, 118(2):147-162.
- Lankinen M., Schwab U., Erkkilä A., Seppänen-Laakso T., Hannila M-L., Mussalo H., Lehto S., Uusitupa M., Gylling H., Oresic M. (2009). Fatty fish intake decreases lipids related to inflammation and insulin signalling – A lipidomics approach. *PLoS ONE*, 4(4):e5258.
- Li D., Yu X.M., Xie H.B. (2007). Platelet phospholipid n-3 PUFA negatively associated with plasma homocysteine in middle-aged and geriatric hyperlipaemia patients. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 76(5):293-297.
- Lipidomics Gateway. <http://www.lipidmaps.org/>
- Lobo M.V., Huerta L., Ruiz-Velasco N., Teixeira E., de la Cueva P., Martín-Hidalgo A., Vega M.A., Bragado R. (2001). Localization of the lipid receptor CD36 and CLA-I/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49:1253-1260.
- Lu Y., Hong S., Gotlinger K., Serhan C.N. (2006). Lipid mediator informatics and proteomics in inflammation-resolution. *Scientific World Journal*, 6:589-614.
- Lu Y., Hong S., Tjonahen E., Serhan C.N. (2005). Mediator-lipidomics: databases and search algorithms for PUFA-derived mediators. *Journal of Lipid Research*, 46:790-802.
- Marra C.A., de Alaniz M.J., Brenner R.R. (1998). Effect of various steroids on the biosynthesis of arachidonic acid in isolated hepatocytes and HTC cells. *Lipids*, 23:1053-1058.
- O'Shea K.M., Khairallah R.J., Sparagna G.C., Xu W., Hecker P.A., Robillard-Frayne I., des Rosiers C., Kristian T., Murphy R.C., Fiskum G., et al. (2009). Dietary ω -3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipids composition and delay Ca^{+2} -induced permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47:819-827.
- Puchard N.A., Green A.T., Mullins G.L., Thompson R.P.H. (2000). Analysis of intestinal absorption of essential fatty acids in vivo in the rat. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 62(1):27-33.

- Rangel-Huerta O.D., Aguilera C.M., Mesa M.D., Gil A. (2012). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. *British Journal of Nutrition*, 107:S159-S170.
- Sala-Vila A., Harris W.S., Cotán M., Perez-Heras A.M., Pinto X., Lamuela-Raventos R.M., Covas M-I., Estruch R., Ros E. (2011). Determinants of the omega 3 index in a Mediterranean population at increased risk of CHD. *British Journal of Nutrition*, 106:425-431.
- Sarri K.O., Linardakis N., Tzanakis A.G., Kafatos A.G. (2008). Adipose DHA inversely associated with depression as measured by the Beck Depression Inventory. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 78(2):117-122.
- Sarkadi-Nagy E., Wijendran V., Diau G.Y. (2004). Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates. *Journal of Lipid Research* 45(1):71-80.
- Schneider I., Schuchard J.P., Meyer H., Hahn A. (2011). Effect of gastric and resistant coating fish oil capsules on intestinal uptake of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Journal of Functional Foods* 3:129-133.
- Schuchardt J.P., Schneider I., Meyer H., Neubronner J., von Schacky C., Hahn A. (2011). Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acids formulations-A comparative bioavailability study of fish oils vrs krill oil. *Lipids in Health and Disease* 10:145.
- Serra-Majem L., Nissensohn M., Overby N., Fekete K. (2012). Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, 107:S64-S76.
- Skeaff C.M., Hodson L., McKenzie J.E. (2006). Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *Journal of Nutrition*, 136(3):565-569.
- Stark K.D. (2008). The percentage of n-3 highly unsaturated fatty acids in total HUFA as a biomarker for omega-3 fatty acid status in tissues. *Lipids*, 43(1):45-53.
- Vedin I., Cederholm T., Freund Levi Y., et al. (2008). Effect of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mono-nuclear leukocytes: the Omega AD study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6):1616-1622.
- Xie L., Innis S.M. (2008). Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *Journal of Nutrition*, 138(11):2222-2228.
- Yang L.Y., Kuksis A., Myher J.J. (1990). Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl ester by pancreatic lipase in vitro: a re-examination. *Journal of Lipid Research*, 31:137-147.
- Yang J., Dong H., Hammock B.D. (2011). Profiling the regulatory lipids: another systemic way to unveil the biological mystery. *Current Opinion in Lipidology* 22:197-203.
- Yang J., Schmelzer K., Georgi K., Hammock B.D. (2009). Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81:8085-8093.
- Zhao X., Petar A., Fritsche J., Elcnerova M., et al. (2009). Changes on the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 296:E384-E393.
- Zivkovic A., Wiest M, Nguyen U., Nording M., et al. (2009). Assessing individual metabolic responsiveness to a lipid challenge using targeted metabolomics approach. *Metabolomics*, 5:209-218.



Aplicación de subproductos marinos en alimentación funcional y cosmética

Juristo Fonollá Joya¹ y Teresa del Moral González²

¹Área de Nutrición y Clínica de Biosearch Life.
Biosearch Life. Camino de Purchil, 66.
18004 – Granada – España.

²Brech S.A. Camino de la Estación s/n. 18230
Atarfe – (Granada) España.
jfjoya@telefonica.net

Resumen

De la ingente actividad industrial relacionada con el mar se genera gran cantidad de subproductos que son susceptibles de ser aprovechados. Si bien el uso de estas sustancias es bien conocido para la farmacia y la nutraceutica, actualmente se están empezando a emplear para el desarrollo de alimentos funcionales y en la cosmética. En el presente capítulo se hace una revisión de sustancias activas que se están aplicando en estos dos campos. Igualmente, y dada la importancia que para la salud y el bienestar están tomando, hacemos una revisión de algas y productos de talasoterapia con aplicaciones cosméticas.

Introducción

En la actualidad, los mares representan para la humanidad la mayor fuente de recursos naturales sobre el planeta y, de todas las actividades relacionadas, es la pesca la que más destaca. Tanto la industria extractiva como la transformadora de productos del mar generan un enorme volumen de subproductos y residuos que, no estando aprovechados, pueden ser una fuente valiosa de materias primas.

A lo largo de la cadena de valor de los productos pesqueros (desde la pesca hasta el consumidor) se genera una gran cantidad de subproductos que son susceptibles de revalorizar mediante el tratamiento adecuado. A través de tecnologías alternativas fundamentalmente basadas en la aplicación de bioprocesos (bien solos o en combinación con tecnologías convencionales) estos subproductos se pueden reintegrar en los ciclos productivos mediante la obtención de materiales de alto valor añadido como moléculas funcionales y bioactivas.

De los recursos vivos del mar que el hombre utiliza como alimento, se ha iniciado la extracción de una serie de compuestos químicos. Algunas de estas sustancias están destinadas a usos farmacéuticos. Por ejemplo, las prostaglandinas, que son reguladores hormonales, se obtienen de los gorgónidos o abanicos de mar; de las esponjas marinas se extrae una solución que en proporciones de 10 y 100 partes por millón tiene una fuerte actividad antibiótica contra cierto tipo de bacterias, como algunos *Stafilococcus aureus* que, hasta hace poco tiempo, representaban un problema en los centros médicos por su resistencia a los antibióticos conocidos. También se han aislado algunas sustancias inhibidoras del crecimiento de tumores malignos como las que se extraen de la almeja, no presentándose toxicidad aparente en los animales tratados de manera experimental.

Pero si del mar se está comenzando a obtener gran cantidad de moléculas bioactivas con aplicaciones médicas, farmacéuticas y nutracéuticas, también se están consiguiendo sustancias o subproductos de la pesca, menos conocidos, con aplicaciones cosméticas y de alimentación funcional.

El objetivo del presente capítulo es revisar los productos o moléculas empleados con estos nuevos fines que representan una nueva oportunidad para la industria pesquera.

1. Nuevos alimentos

Al margen del empleo de los excedentes y de los subproductos del pescado como fuente de proteína para alimentación animal o piscícola, existen otros usos potenciales ligados a la aplicación en bienes de consumo humano de alguno de sus componentes que presentan un elevado valor biológico o funcional.

Según ILSI (ILSI Europe, 1999) un alimento puede ser considerado funcional si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejoría de la salud y/o la reducción del riesgo de enfermar.

Es importante señalar que los alimentos funcionales han de ser ante todo un alimento por lo que no se pueden consumir como una fórmula farmacéutica (polvos, cápsulas, comprimidos, etc.). Además, los alimentos funcionales deben demostrar sus resultados en cantidades que puedan ser consumidas normalmente en la dieta.

En este sentido, las declaraciones de propiedades saludables de los alimentos funcionales deben ser autorizadas por la Unión Europea (Reglamento CE, 2006). Dichas declaraciones

de salud deberán sustentarse en estudios científicos y es EFSA, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, el organismo encargado de valorar dichos estudios y, en su caso, incluir los componentes en el listado de alegaciones de propiedades saludables de los alimentos, indicando la cantidad mínima que debe tener el alimento para que tal efecto pueda ser considerado y, por tanto, publicitado.

En los últimos años, la industria alimentaria ha realizado una gran inversión en el desarrollo de alimentos funcionales como consecuencia del creciente interés del consumidor por una alimentación adecuada. Esta demanda de nuevos alimentos también está siendo seguida por las autoridades que pretenden dar información veraz sobre ellos (Marcos y Aguilera, 2008).

De todos los subproductos bioactivos que la industria pesquera genera (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012), el único que actualmente se está empleando en alimentación funcional es el aceite de pescado y sus principales componentes los ácidos grasos esenciales eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Del mismo modo, del análisis de la lista que Bernal (Bernal, 2005) realizó sobre nutraceuticos o compuestos bioactivos que la industria farmacéutica y alimentaria está utilizando, también resalta que los únicos que tienen origen marino son los mismos compuestos, los ácidos grasos omega 3 EPA y DHA. Tan sólo el escualeno puede encontrarse también enriqueciendo aceite de oliva, aunque su origen no es marino sino vegetal.

2. Ácidos grasos omega 3 de cadena larga

Los ácidos grasos omega 3 de cadena larga EPA y DHA no pueden ser sintetizados por nuestro organismo por lo que debemos incluirlos en la dieta (Arterburn et al., 2006). El inconveniente surge por el hecho de que sólo los podemos consumir en cantidades importantes a través del pescado graso y/o en suplementos y alimentos enriquecidos.

La principal fuente de EPA y DHA en la dieta es el pescado azul que lo toma del fitoplacton ya que las algas marinas son los organismos que tienen la capacidad de sintetizarlos (Arterburn et al., 2006). La cantidad y proporción de los ácidos grasos en el pescado depende de diversos factores como la edad, el tamaño, la época del año, la temperatura del agua y, sobre todo, de la especie (Lavie et al., 2009). El EPA se obtiene de especies como la sardina y la anchoa y el DHA de túnidos (atún, caballa y jurel). En el pescado blanco están pero en menor cantidad.

El consumo de EPA y DHA está recomendado por organismos internacionales (WHO/FAO Join Expert Consultation, 2003) ya que su ingesta es baja en muchos países occidentales y los

beneficios para la salud derivados de ello son múltiples (Calder y Yaqoob, 2009), destacando sobre todos los relativos a la salud cardiovascular (Lavie et al., 2009, AHA, 2006).

Su principal forma de comercialización es como nutracéutico, principalmente como cápsulas de gelatina blanda. Sin embargo, su utilización en alimentación funcional se ha incrementado en los últimos años haciendo de los ácidos grasos omega 3 uno de los compuestos bioactivos más empleados en estos fines. Las matrices alimentarias empleadas son diversas: lácteos (leche, yogur, queso y mantequilla), margarinas, huevos embutidos, zumos, cereales, pan, barras nutritivas, salsas y fórmulas y alimentos infantiles (Whelan y Rust, 2006).

La obtención de huevos enriquecidos en estos ácidos grasos se consigue a través de la alimentación especial de las gallinas (Lewis et al., 2000) con ácidos grasos omega 3 de origen vegetal principalmente y aceite de hígado de bacalao. Estrategias similares se están utilizando para la obtención de leche de vaca (Abughazaleh et al., 2009, Bernal-Santos et al., 2010) e incluso fresas ricas en ácidos grasos omega 3, siendo estas últimas sometidas a un abonado especial.

La evidencia científica que avala las propiedades de estos alimentos funcionales se ha realizado de forma casi exclusiva en productos lácteos (López-Huertas, 2010). Tan sólo hemos encontrado un estudio muy reciente de un zumo de tomate enriquecido en ácidos grasos omega 3 (García-Alonso, 2012) con resultados no muy concluyentes en la reducción del riesgo cardiovascular.

Son 6 los productos lácteos que tienen estudios científicos que acreditan propiedades funcionales (Estévez-González et al., 1998, Visioli et al., 2000, Baró et al., 2003, Carrero et al., 2004, 2005, 2007, Benito et al., 2006, Castro et al., 2007, Fonollá et al., 2009, Martín-Bautista et al., 2010, Romeo et al., 2011). Los efectos estudiados son relativos a la salud cardiovascular, principalmente, y el síndrome metabólico, la nutrición infantil y la salud ósea. En todos estos trabajos los resultados son bastante contundentes en lo relativo a la correcta nutrición y la prevención de enfermedades crónicas. Si bien en todos estos estudios los productos lácteos estaban enriquecidos en ácido oleico además de en EPA y DHA (sólo uno estaba enriquecido con ácidos grasos omega 3 de origen vegetal - Estévez-González et al., 1998-), la obtención de mejores resultados se puede deber al hecho de que la leche facilita la biodisponibilidad de la grasa ya que dispersa a esta (tras el proceso tecnológico de homogeneización) en pequeños glóbulos de grasa que son muy fácilmente absorbibles y, por tanto, muy efectivos (Visioli et al., 2000). De esta forma, pequeñas cantidades de EPA y DHA en la leche consiguen incrementos en plasma y en tejidos de hasta el 40% de estos ácidos grasos.

Sin embargo, a pesar de todos los estudios realizados y la evidencia científica que los avala, la única declaración de salud a la que, de acuerdo con el reglamento de la EFSA (Reglamento CE, 2010), se pueden acoger estos productos es al de anunciarse como fuente de ácidos grasos omega-3. Sin embargo, ello no debe considerarse como una negación de las propiedades beneficiosas que para la salud conlleva el consumo habitual de dichos productos. El hecho de ser fuente de unos nutrientes esenciales y haber demostrado la biodisponibilidad de los mismos supone *per se* un gran beneficio para la salud (además de los beneficios demostrados en los estudios).

3. Activos de origen marino

En los últimos años, la moda de lo natural ha impulsado la búsqueda de nuevos activos en el campo de la cosmética. Esto se vio incrementado en los años 90 con el desarrollo de la encefalopatía esponjiforme o enfermedad de las “vacas locas” que obligó a los fabricantes de productos cosméticos a garantizar la procedencia de los activos de origen animal o incluso a sustituirlos por otros de origen vegetal o marino.

Es en este momento cuando la cosmética, atenta a los intereses de los consumidores, comienza a buscar y utilizar ingredientes de origen marino. Los componentes más utilizados son las macromoléculas con distintas propiedades. Sin embargo, cada día aparecen activos más originales y sofisticados, que si bien no tienen propiedades demasiado contrastadas, son un buen reclamo comercial.

Por otra parte, el desarrollo de la talasoterapia ha fomentado el uso de elementos marinos. La talasoterapia es una práctica terapéutica que consiste en utilizar los elementos marinos para generar un bienestar físico y emocional. Si bien la talasoterapia no utiliza subproductos marinos, es interesante porque se basa en el uso de agua marina, algas y demás productos de origen marino.

3.1. Macromoléculas

3.1.1. Colágeno nativo o hidrolizado

El colágeno es una proteína del tejido conjuntivo que confiere, fundamentalmente, resistencia.

Con una cadena de aminoácidos muy parecida al colágeno sintetizado por el tejido dérmico humano, se extrae de peces de agua fría, se purifica y se hidroliza para obtener bajos

pesos moleculares. Tiene la propiedad de formar un film que retiene la humedad cutánea contribuyendo a mantener la hidratación de la piel. También induce la proliferación de fibroblastos y favorece la síntesis de colágeno por lo que se emplea en medicina regenerativa (Hayashi et al., 2012, Grover et al., 2012). De esta manera se conserva la organización estructural de la dermis.

3.1.2. Elastina

A diferencia con el colágeno, la elastina es una proteína que confiere elasticidad a los tejidos (Grover et al., 2012).

Se obtiene por hidrólisis enzimática del tejido conectivo de algunas especies marinas. Es una proteína que retiene el agua y tiene efectos reafirmantes. Mejora el peinado en cabellos dañados por los tratamientos con álcalis.

3.1.3. Quitosán

Es un derivado de la quitina, que es un polisacárido de N-acetilglucosamina. Obtenido a partir del caparazón de los crustáceos (Alcalde, 2004, Vázquez et al, 2013), forma una película fina y flexible sobre la piel que evita la pérdida de agua y proporciona elasticidad. Se incluye en cosméticos antiarrugas, calmantes, hidratantes y tensores. En cosmética capilar la película del quitosán protege el cabello de las agresiones externas, reduce la carga estática y confiere una fijación ligera del peinado, muy apreciada en espumas y geles. El quitosán también posee una actividad antimicrobiana que justifica su empleo en desodorantes y antiperspirantes. Al igual que el colágeno, se está empleando en medicina regenerativa (Hayashi et al., 2012).

3.1.4. Ácido hialurónico

Se compone de ácido D-glucurónico y DN-acetilglucosamina formando un disacárido. El ácido hialurónico puede tener más de 25.000 disacáridos formando una gigantesca macromolécula. Hasta hace poco, la fuente de ácido hialurónico era la cresta de los gallos principalmente, pero se ha descubierto una mejor fuente en los ojos de los peces ya que es más abundante, contiene más principio activo y los procesos de producción son más económicos (Vázquez et al., 2013).

El ácido hialurónico es una de las sustancias claves para dar volumen a la piel, ya que tiene la capacidad de absorber 1.000 veces su peso en agua, de ahí su alto poder hidratante.

3.2. Aceites marinos

3.2.1. Aceites omega 3

Los aceites de pescados ricos en ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) son muy valorados hoy en día por su demostrada acción contra las manifestaciones clínicas de la atopía (Nicolaou, 2013). Contribuyen, asimismo en la reducción de la psoriasis (Balbás et al., 2011, Nicolaou, 2013) aliviando las lesiones del cuero cabelludo, el prurito, el eritema y la descamación.

3.2.2. Escualeno

No podemos dejar de hablar del escualeno en cosmética pues es un ingrediente muy apreciado (Bhilwade et al., 2010, Kim y Karadeniz, 2012). Se extrae del aceite del hígado de tiburón y tiene propiedades humectantes y suavizantes en la piel. Su uso se vio limitado por la dificultad de extracción y por la preocupación por estos animales. Esto llevó a buscar otras fuentes y hoy en día se extrae principalmente del aceite de oliva.

3.3. Algas

Son los vegetales más abundantes de la naturaleza ya que existen miles de especies de lo más heterogéneas. Muchas de ellas son utilizadas en cosmética por su contenido en sales minerales, vitaminas, oligoelementos, aminoácidos, etc., y por su fácil penetración a través de la piel, proporcionando interesantes y diversas propiedades.

Los pioneros en el cultivo de las algas fueron los franceses que se especializaron en su extracción y purificación (Langreo 2001, Briand, 2003, Alcalde, 2004). Ahora es una industria que se ha extendido por numerosos países bañados por las costas marinas.

Las algas en cosmética pueden usarse como agentes texturizantes de las fórmulas o como principios activos que aportan sus propiedades al producto cosmético donde van incluidos.

Se clasifican según su color en algas pardas, rojas, verdes y verdes-azuladas.

3.3.1. Feofíceas o algas pardas

Suelen ser grandes, se encuentran en hábitats fríos y deben su coloración a la presencia de ciertos pigmentos carotenoides.

Se suelen emplear en la obtención de alginatos. Estos, forman geles al mezclarlos con agua, creando una película plástica que puede utilizarse como mascarilla. Al cabo de unos minutos

esta película se seca y se retira de una sola pieza, por lo que su uso es muy cómodo y limpio. Además sirven como vehículo de principios activos, que al formar una capa oclusiva sobre la piel, penetran con facilidad.

- ***Laminaria digitata***: Tiene propiedades adelgazantes, reafirmantes y seboreguladoras por su composición rica en laminarina, iodo, fucosterol y ácido algínico. Se emplea en tratamientos para pieles y cabellos grasos y en productos anticelulíticos.
- ***Ascophyllum nodosum***: Es rica en minerales, proteínas y carbohidratos. En su composición también entran numerosas vitaminas como caroteno, vitaminas A, E, B, H y C. Su contenido en iodina la hace apropiada para incluirla en tratamientos anticelulíticos como adelgazante. También se han demostrado sus propiedades antioxidantes ya que combate las especies reactivas del oxígeno causantes del daño celular.
- ***Fucus vesiculosus***: Es una importante fuente de iodo por lo que se emplea principalmente para combatir la celulitis y la obesidad. Pero en su composición entran otros principios activos como mucílagos, vitaminas y sales minerales que le confieren numerosas propiedades.
- ***Undaria pinnatifida (wakame)***: Es un alga comestible muy apreciada en Asia cuyo uso se ha extendido a la cosmética. Sus propiedades están basadas en su contenido en fucano, un polímero con actividad antihialuronidasa y antielastasa que sirve para preservar la integridad de la capa dérmica.

3.3.2. Rodófitas o algas rojas

Son más pequeñas que las pardas. Su color rojizo proviene de la presencia de biliproteínas que ocultan el color verde de la clorofila. Se encuentran en todos los mares y pueden vivir a gran profundidad.

- ***Chondrus crispus***. Poderoso hidratante con una concentración elevada en vitaminas, minerales y oligoelementos. Se emplea en cosmética para las pieles secas y sensibles por sus propiedades suavizantes. Tiene también una potente acción antioxidante que combate el envejecimiento.
- ***Palmaria palmata***. Contiene minerales (cloro, potasio, calcio, sodio, magnesio, fósforo), mucílagos y aminoácidos. Por su acción vasodilatadora se incluye en tratamientos anticelulíticos y de piernas pesadas.

- ***Gelidium cartilagineum***. Rica en esteroles, concretamente rodisterol, tiene la propiedad de estimular la lipólisis a nivel local, lo que combate la acumulación de grasa en los adipocitos, y por tanto, la celulitis.

3.3.3. Clorofíceas o algas verdes.

Son pequeñas, principalmente unicelulares, y dan el color verde característico a las charcas y pantanos. Son muy importantes para la cadena alimentaria, ya que forman, junto a otros organismos acuáticos, el llamado plancton, además de ser fuente del oxígeno de la atmósfera.

- ***Ulva lactuca***. Es diez veces más rica en vitamina C que la naranja y dos veces más rica en vitamina A que la col. La industria cosmética la utiliza en la elaboración de productos por sus propiedades hidratantes, remodelantes, relajantes y antiestrés. Se trata de un alga verde marina muy frecuente en el litoral gallego, especialmente en las desembocaduras de los ríos, debido a su facilidad para soportar la baja salinidad del agua.
- ***Enteromorpha compressa***: Sus polisacáridos sulfatados activan la circulación periférica, ayudando en la despolimerización de las acumulaciones de celulitis y en la oxigenación celular. Se incluye en productos regeneradores y en los cosméticos para las bolsas de los ojos. Se ha demostrado su acción calmante del picor, que la hace muy adecuada en la formulación de productos para pieles reactivas.

3.3.4. Cianofíceas o algas verdes-azuladas.

Reciben el nombre de microalgas por su tamaño microscópico. Son unicelulares y de color azul verdoso debido a un pigmento biliproteico.

- ***Spirulina máxima***. La clorofila y la ficocianina que posee el alga renuevan los tejidos y contrarrestan la radiación. Además, estimulan el sistema inmunitario, previniendo enfermedades degenerativas de la piel. Es por esa razón que se utiliza por sus propiedades de óxido-reducción y estimulación de los fibroplastos que la hace apta para tratamientos nutritivos del cutis y como antiarrugas.

3.4. Fangos, barros y limos

La fangoterapia es un método de curación muy antiguo que ya conocían los egipcios hace 5.000 años (Langreo, 2001, Alcalde, 2004). Desde entonces, los barros se han empleado

para mejorar afecciones musculares, respiratorias, infecciosas, reumáticas y dermatológicas, entre otras.

Acumulados en el fondo de las bahías, los elementos naturales terrestres y marinos se mezclan y sedimentan para formar un cieno marino. Estos restos se recogen y se emplean en forma de cataplasmas y envolturas por sus numerosas propiedades ya que son ricos en minerales y oligoelementos. Entre ellas destacan las siguientes: retrasan el proceso de envejecimiento de la piel, actúan contra la celulitis, las estrías y la flacidez, limpian la piel en profundidad oxigenándola y liberándola de las toxinas acumuladas, estimulan la circulación y poseen una acción antiinflamatoria, analgésica y antirreumática.

3.5. Agua de mar

Hoy en día también se utiliza el agua de mar con fines cosméticos (Alcalde, 2004). El mar es un hábitat rico en minerales y elementos traza. Su composición es casi idéntica al plasma sanguíneo.

Los oligoelementos son minerales necesarios para que se produzcan las funciones biológicas celulares interviniendo en estas reacciones como cofactores enzimáticos y como catalizadores.

A diferencia del agua dulce, el agua de mar posee numerosos oligoelementos cuyos efectos curativos de afecciones de la piel son debidos al proceso de ósmosis: el cuerpo absorbe estos elementos, produciéndose una renovación de los mismos en nuestro organismo.

3.6. Activos de lujo

Extracto de caviar, coral, polvo de perlas... Algunos activos marinos nos llevan a evocar el lujo y la sofisticación, que las grandes marcas dirigen hacia sus productos más exclusivos.

3.6.1. Caviar

Por tratarse de huevos de pescado, tiene una composición muy rica: ácidos grasos esenciales omega-3, fosfolípidos, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, D y E, microelementos como cobalto, cobre, fósforo, selenio y cinc y aminoácidos como glicina, histidina, arginina y asparagina (Alcalde, 2004). Actúa como activador del metabolismo celular cutáneo (síntesis de colágeno, hidratación, etc.) y es un potente antioxidante.

3.6.2. Polvo de perlas

Es un ingrediente que se conoce y utiliza en la cosmética china desde hace más de 2.000 años (Alcalde, 2004). Con una riqueza en calcio superior al 30% y 18 aminoácidos en su composición, el polvo de perlas es muy apreciado en el tratamiento del envejecimiento cutáneo, a la vez que proporciona gran luminosidad y suavidad a la piel. El polvo micronizado de las conchas también se emplea por sus propiedades matificantes y suavizantes, así como en cosmética decorativa.

3.6.3. ADN de Salmón

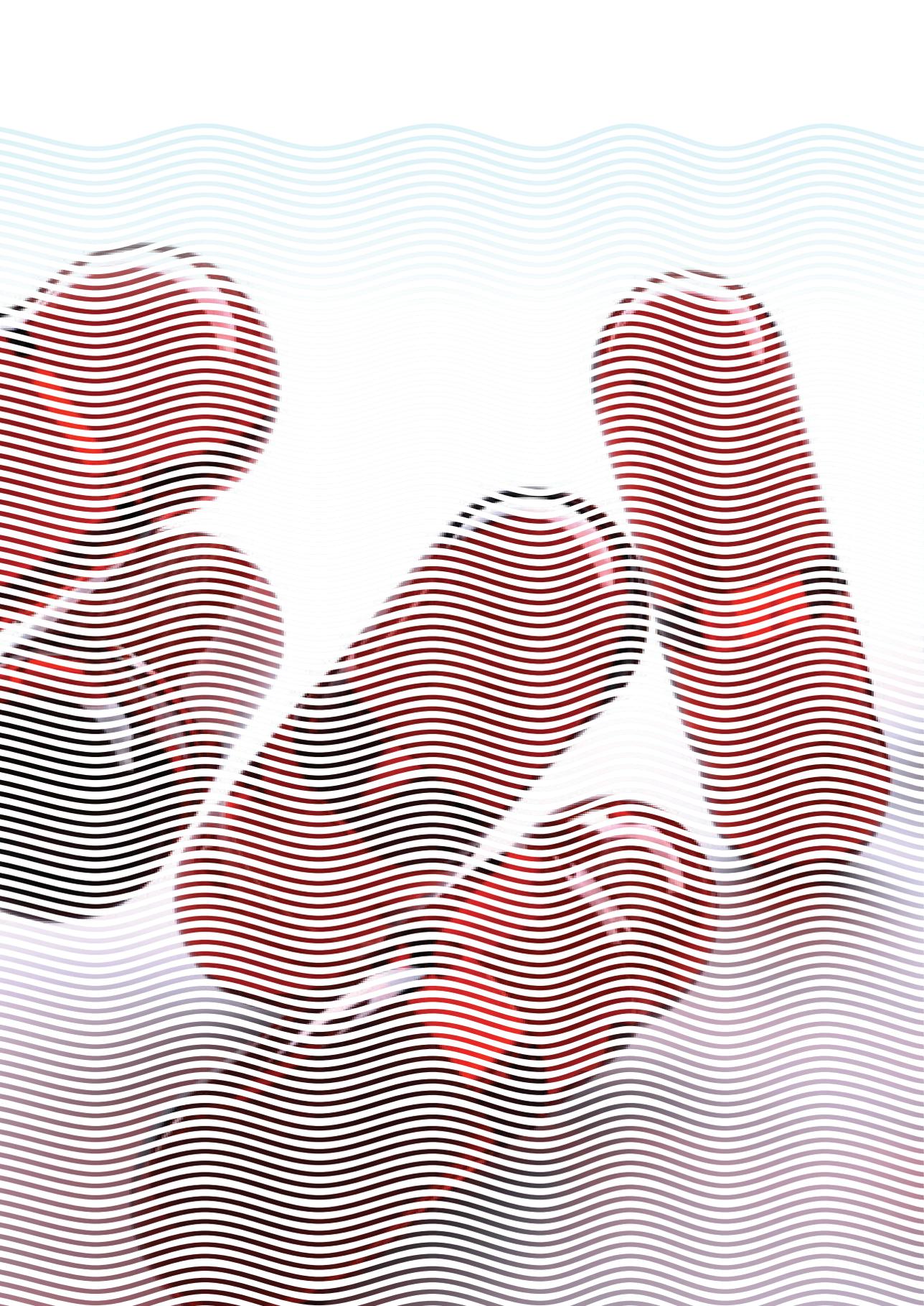
Las formulaciones más completas incluyen ADN de origen marino obtenido de salmón e incorporado en forma de sales (sodio ADN, calcio ADN, cinc ADN, arginina ADN, entre otras) (Alcalde, 2004). El ácido desoxirribonucleico contiene bases púricas y pirimidínicas, desoxirribosa, fósforo y sales minerales que le confieren las acciones antioxidante, antirradicales libres, filtrante de las radiaciones UVB e hidratante, muy indicadas en el tratamiento del envejecimiento cutáneo.

Referencias

- Abughazaleh A.A., Potu R.B., Ibrahim S. (2009) Short communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science*, 92(12): 6156-6159.
- Alcalde M.T. (2004) Activos cosméticos de origen marino. Algas, macromoléculas y otros componentes. *Offarm*, 23(10): 100-104.
- American Heart Association (AHA) Scientific Statement 2006. (2006) Diet and lifestyle recommendations revision: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*, 114: 82–96.
- Arterburn L.M, Hall E.B, Oken H. (2006) Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(suppl): 1467S-1476S.
- Balbás G.M., Regaña M.S., Millet P.U. (2011) Study on the use of omega-3 fatty acids as a therapeutic supplement in treatment of psoriasis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 4: 73-77.
- Baró L, Fonollá J, Peña J.L, Martínez-Férez A, Lucena A, Jiménez J, Boza JJ, López-Huertas E. (2003) n-3 fatty acids plus oleic acid supplemented milk reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clinical Nutrition*, 22: 175–182.
- Benito P, Caballero J, Moreno J, Gutiérrez-Alcántara C, Muñoz C, Rojo G. (2006) Effects of milk enriched with omega-3 fatty acid, oleic acid and folic acid in patients with metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, 25: 581–587.

- Bernal C. (2005) Alimentos funcionales. Revista digital de postgrado, investigación y extensión del Campus de Monterrey. N^o. 70.
- Bernal-Santos G, O'Donnell AM, Vicini JL, Hartnell GF, Bauman DE. (2010) Hot topic: Enhancing omega-3 fatty acids in milk fat of dairy cows by using stearidonic acid-enriched soybean oil from genetically modified soybeans. *Journal of Dairy Science*, 93(1): 32-37.
- Bhilwade HN, Tatewaki N, Nishida H, Konishi T. (2010) Squalene as novel food factor. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(8): 875-880.
- Briand X. (2003) Algal active substances. *Cosmetics & Toiletries*, 118(2): 55-66.
- Calder PC, Yaqoob P. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*, 35: 266-272.
- Carrero JJ, Baró L, Fonollá J, González-Santiago M, Martínez-Férez A, Castillo R, Jiménez J, Boza JJ, López-Huertas E. (2004) Cardiovascular effects of milk enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid folic acid and vitamins E, B6 and B12 in volunteers with mild hyperlipidaemia. *Nutrition*, 29: 521-527.
- Carrero JJ, López-Huertas E, Salmerón LM, Baró L, Ros E. (2005) Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E increases painfree walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease. *Journal of Nutrition*, 135: 1393-1399.
- Carrero JJ, Fonollá J, Martí JL, Jiménez J, Boza JJ, López-Huertas E. (2007) Intake of fish oil, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E for 1 year decreases plasma C reactive protein and reduces coronary heart disease risk factors in male patients in a cardiac rehabilitation program. *Journal of Nutrition*, 137: 384-390.
- Castro IA, Monteiro VCB, Barroso LP, Bertolami MC. (2007) Effect of eicosapentaenoic/docosahexaenoic fatty acids and soluble fibers on blood lipids of individuals classified into different levels of lipidemia. *Nutrition*, 23: 127-137.
- Estévez-González MD, Saavedra-Santana P, Betancor-León P. (1998) Reduction of serum cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels in a juvenile population after isocaloric substitution of whole milk with a milk preparation (skimmed milk enriched with oleic acid). *Journal of Pediatrics*, 132: 85-89.
- Fonollá J, López-Huertas E, Machado FJ, Molina D, Álvarez I, Mármol E, Navas M, Palacín E, García-Valls MJ, Remón B, Boza JJ, Martí JL. (2009) Milk enriched with "healthy fatty acids" improves cardiovascular risk markers and nutritional status in human volunteers. *Nutrition*, 25: 408-414.
- García-Alonso FJ, Jorge-Vidal V, Ros G, Periago MJ. (2012) Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. *European Journal of Nutrition*, 51(4): 415-524.
- Grover CN, Cameron RE, Best SM. (2012) Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10: 62-74.
- Hayashi Y, Yamada S, Yanagi Guchi K, Koyama Z, Ikeda T. (2012) Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine. *Adv Food Nutr Res*, 65: 107-120.

- International Life Sciences Institute (ILSI Europe) (1999). FUFOSÉ: scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81: 1-27.
- Kim SK, Karadeniz F. (2012) Biological importance and applications of squalene and squalane. *Advances in Food & Nutritional Research*, 65: 223-233.
- Langreo N. (2001) Salud y belleza con arcillas, fangos y algas. Tikal (ed), Madrid, España.
- Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. (2009) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 54: 585-94.
- Lewis NM, Seburg S, Flanagan NL. (2000) Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poultry Science*, 79(7): 971-974.
- López-Huertas E. (2010) Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research*, 61: 200-207.
- Marcos A, Aguilera CM. (2007) Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. <http://www.publicaciones-isp.org/productos/t065.pdf>
- Martín-Bautista E, Muñoz-Torres M, Fonollá J, Quesada M, Poyatos A, López-Huertas E. (2010) Improvement of bone formation biomarkers after 1-year consumption with milk fortified with eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, oleic acid, and selected vitamins. *Nutrition Research*, 30: 320-326.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2012) Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos. <http://www.plancalidadproductospesqueros.es/?q=system/files/06-Guia%20Subproductos.pdf>
- Nicolau A. (2013) Eicosanoids in skin inflammation. Prostaglandins, Leucotrienes and Essential fatty acids, 88(1): 131-138.
- Reglamento (CE) nº 1924/2006.
- Reglamento (UE) nº 116/2010.
- Romeo J, Wärnberg J, García-Mármol E, Rodríguez-Rodríguez M, Díaz LE, Gómez-Martínez S, Cueto B, López-Huertas E, Cepero M, Boza JJ, Fonollá J, Marcos A. (2011) Daily consumption of milk enriched with fish oil, oleic acid, minerals and vitamins reduces cell adhesion molecules in healthy children. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease*, 21: 113-120.
- The World Health Organization. (2003) Diet nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of the WHO/FAO Joint Expert Consultation, WHO, Technical Report Series 916.
- Vázquez JA, Rodríguez-Amado I, Montemayor MI, Fraguas J, González MP, Murado MA. (2013) Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: a review. *Marine Drug*, 11: 747-774.
- Visioli F, Rise P, Plasmati E, Pazzucconi F, Sirtori C, Galli C. (2000) Very low intakes of n-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerols and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Pharmacological Research*, 41: 571-576.
- Whelan J, Rust C. (2006) Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annual Review of Nutrition*, 26: 75-103.



Biotecnología marina: utilización de productos de origen marino para reducir la incidencia de enfermedades crónicas

Ignacio Etcheverría Rey

EuroEspes Biotecnología, Ebiotec S.A.

15165 Bergondo, A Coruña

biotecnologia1@ebiotec.com

Resumen

En este capítulo se pretende dar una visión de los antecedentes, el estado del arte y las posibilidades futuras de la aplicación de los compuestos extraídos de organismos marinos al tratamiento de enfermedades graves, haciendo un énfasis especial en cáncer, diabetes, artritis, patologías cardiovasculares y neurodegenerativas. Asimismo, se ha hecho una recopilación de los proyectos y plataformas de investigación dedicadas a esta temática en nuestro país y de las empresas que utilizan estos compuestos y desarrollan fármacos a partir de ellos.

Introducción

La biotecnología marina o también denominada por algunos autores biotecnología azul, es un término utilizado para describir las aplicaciones tecnológicas, desarrolladas en el medio marino y acuático, para la consecución de aplicaciones de utilidad. Estas aplicaciones pueden ser industriales, obteniendo material biotecnológico para procesos o como materia prima generadora de nuevos productos textiles, químicos, detergentes o compuestos para remediación de residuos; agrícolas, produciendo nuevos fitosanitarios y abonos; cosméticas; energéticas, utilizando material marino para la producción de biomasa y biocombustibles; y sanitarias, tanto interviniendo en la salud humana como en la animal desarrollando principios activos y compuestos con acción terapéutica sobre las enfermedades y los síntomas, como son los nutracéuticos.

Se trata de una disciplina que, aunque no es nueva puesto que ya se hacían emplastos de algas en la antigüedad, sí que se encuentra en un estadio incipiente y temprano de su desarrollo. Los primeros compuestos bioactivos de origen marino se aislaron por casualidad a principios de la década de los cincuenta del pasado siglo XX y tardaron quince años en aprobarse como medicamentos.

Afortunadamente, la bioprospección marina es cada vez más común y menos novedosa y vanguardista de lo que lo era hace no tanto tiempo, lo que no quiere decir que sea una vía agotada. De hecho, sucede todo lo contrario, ya que los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra. Se calcula que, en proporción con los productos de origen terrestre, los compuestos generados a partir de la biotecnología marina podrán equivaler al 90% del total.

El planeta Tierra está compuesto en un 70% del agua de los océanos, y éstos representan el 95% de la biodiversidad biológica de todo el globo terráqueo. Añadiendo a este dato la cifra comentada anteriormente sobre la desproporción entre compuestos de origen marino frente a los terrestres, no es descabellado afirmar que el futuro de las nuevas dianas terapéuticas se encuentra en el medio marino.

1. Historia contemporánea sobre la obtención científica de productos terapéuticos

En las primeras décadas del pasado siglo XX los medicamentos utilizados como paliativos de las enfermedades crónicas eran extractos o decocciones bastante simples demandados por una práctica médica fundamentalmente clínica y escasamente científica. Sobre los años treinta empiezan a surgir los primeros conceptos fármaco-cinéticos coincidiendo, a su vez, con el descubrimiento de nuevas y revolucionarias sustancias como las vitaminas, las sulfamidas, la penicilina o la insulina. Estos hechos propician el inicio de disciplinas más medico-farmacológicas y científicas y, así, comienza el desarrollo de técnicas de purificación, de evolución de procesos y de prácticas de ensayos clínicos con sus correspondientes estudios epidemiológicos.

Desde el final de la Segunda Guerra Mundial se estableció un crecimiento exponencial en el desarrollo de la tecnología adecuada para la búsqueda de nuevos medicamentos, la evaluación de su actividad, su efectividad y la seguridad de los mismos. Esta es la época en la que se van desarrollando nuevas técnicas de detección, como la fluorescencia y la radiactividad, nuevos equipos detectores y analizadores, nuevas vías de estudio como

modelos en animales, generación de técnicas *in vitro*, etcétera. Paralelamente a estos avances se establecieron las diferentes especializaciones científicas tales como la farmacología, toxicología, medicina clínica, farmacocinética, genética, biología molecular, bioquímica y la biotecnología.

En los últimos treinta años del siglo pasado todas las disciplinas científicas que surgieron y, en especial, la farmacología, permitieron proporcionar, además de mayor seguridad a los medicamentos, el reconocimiento de las rutas metabólicas de los principios activos y sus dosis, así como marcadores biológicos y dianas terapéuticas. La aparición de la electrónica, que permite la miniaturización, impulsó el perfeccionamiento y refinado de las técnicas *in vitro* que permitirían un extraordinario avance en cuestiones como carcinogénesis, genotoxicidad, mutagénesis, antigenicidad y alteraciones metabólicas. Ya entrados en los años ochenta y con el funcionamiento de los computadores, se produce un gran avance en el campo de la farmacocinética que permite establecer relaciones matemáticas del comportamiento de los fármacos en el organismo. A partir de entonces se relacionarán estas variables con el perfil farmacológico del fármaco y, por tanto, con su eficacia: nace el concepto de biodisponibilidad. La proteómica y la genómica también irrumpen en estos años de manera trascendental, y acompañarán desde entonces a todas las disciplinas científicas. De esta forma se crea paralelamente al desarrollo de nuevos principios activos, disciplinas como la farmacogenómica. Aparece la química combinatoria, la obtención de modelos de animales transgénicos y evoluciona la biotecnología y todo esto permite el objetivo de buscar la comprensión de los procesos de absorción, distribución, metabolismo, y excreción de los principios activos con capacidad terapéutica, así como la cuantificación de los mismos.

2. Actualidad en la búsqueda de dianas terapéuticas

En estos últimos años el avance científico ha permitido identificar nuevos horizontes, así, la biología molecular ha permitido, por ejemplo, identificar nuevos aspectos morfológicos y funcionales de las células, generando nuevas teorías de muerte celular como son la necrosis, la apoptosis y destrucción de los lisosomas. Las mitocondrias, ciertas proteínas y muy especialmente, algunos enzimas catabólicos que participan en la regulación de la muerte celular, podrían constituir importantes dianas terapéuticas. Estos procesos reguladores están implicados en situaciones tan diferentes como enfermedades autoinmunes, procesos cancerosos, isquémicos o inflamación crónica. El avance en el conocimiento de los mecanismos de la apoptosis podrá proporcionar en un futuro próximo nuevas teorías que permitan aplicaciones farmacológicas o incluso quirúrgicas (Costa et al., 2012)

La investigación y el desarrollo de agentes biológicos con fines terapéuticos, o medicamentos biotecnológicos, es una actividad ligada a la existencia del hombre y a su búsqueda por una mejor calidad de vida. La prospección en plantas, microorganismos, vertebrados e invertebrados terrestres para obtener compuestos y moléculas de aplicación en medicina ha sido extraordinariamente elevada. De hecho miles de compuestos naturales se han desarrollado a partir del cribado de muestras del medio terrestre, tan comunes como la penicilina, ácido acetil salicílico, la morfina. Si a todo este trabajo se le añade el estudio en laboratorio mediante plataformas de alto rendimiento de cribado de compuestos, tanto los naturales como los sintéticos, podemos llegar a sostener que el arsenal de productos naturales está casi exhausto.

El cada vez más amplio conocimiento del medio marino está produciendo cantidades cada vez mayores de compuestos candidatos para su utilización en el tratamiento y / o prevención de enfermedades humanas. El estudio multidisciplinar y las nuevas técnicas han conseguido ampliar este listado de compuestos que, desde el avance de conocimiento científico a escala molecular y celular han variado estrategias hacia una búsqueda más competitiva, con el desarrollo de plataformas de alto rendimiento que permiten cribados de miles de compuestos (Capton, 2001). Son muchos los metabolitos secundarios de los organismos marinos, como por ejemplo en gorgonias y esponjas, de los que se empiezan a conocer no sólo su acción y actividad, sino que también su diana o “target” (Haefner, 2003)

3. El sector en España

Tanto en el ámbito público como en el privado, España ha sabido subirse al tren de la Investigación, Desarrollo e innovación (I+D+I) en el campo de la biotecnología marina. De esta forma, existen importantes empresas y organismos públicos dedicados a la investigación del medio marino donde además de desarrollar conocimiento científico ya se están obteniendo grandes avances y resultados biotecnológicos. Por enumerar unos pocos ejemplos de empresas con desarrollo biotecnológico se pueden destacar, entre otras muchas:

- Ceamsa, dedicada a la producción de aditivos a partir de algas rojas; la carragenina, para la industria alimenticia.
- Porto Muiños, que produce algas para consumo.
- ProduBioFuel Systems, en el sector del biodiesel.

- Seaweed Canarias, que se definen como una empresa que pretende crear y proveer de soluciones integrales, sostenibles y de tecnología avanzada, a través de la aplicación industrial de principios activos presentes en las algas, abarcando sectores como la cosmética, la alimentación y la agricultura.
- Ebiotec, empresa pionera en el desarrollo de nutraceuticos de origen marino para uso humano y ganadero.
- Bioalgal Marine, especializada en el cultivo y aprovechamiento integral de microalgas, de las cuales se obtienen fertilizantes e insecticidas.
- Pharmamar, biofarmacéutica decidida a avanzar en el tratamiento del cáncer mediante el descubrimiento, desarrollo, producción y comercialización de fármacos innovadores de origen marino.

Si hacemos mención a las plataformas y a los proyectos, vinculados a organismos públicos y universidades, el número es todavía mucho más elevado y así, por citar a unos pocos están:

- B.E.A., banco español de algas, es un servicio nacional de I+D+i adscrito a la Fundación Canaria Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- C.B.M., Centro de Biotecnología Marina, es un centro de investigación de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria constituido por los Grupos de Investigación en Algología Aplicada (Agronomía Marina, en particular el desarrollo de una actividad agro-industrial de interés para Canarias a través del cultivo y aprovechamiento industrial de los vegetales acuáticos, fundamentalmente algas) y Oceanografía Biológica (en particular el estudio de la distribución, metabolismo y relaciones tróficas de las comunidades planctónicas y su interacción con procesos físicos). Estos dos grupos dependen de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), órgano perteneciente a la Administración Pública de la Comunidad Autónoma de Canarias, quien es competente en el fomento de la investigación y el desarrollo científico y tecnológico, la innovación empresarial y el despliegue de infraestructuras de telecomunicación y de servicios de la sociedad de la información.
- I.I.M., el Instituto de Investigaciones Marinas, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) que se dedica a la investigación integrada y pluridisciplinar en Ciencias Marinas.

- I.O.E., Instituto Español de Oceanografía, un organismo dependiente del Ministerio de Economía y Competitividad, dedicado a la investigación en ciencias del mar, especialmente en lo relacionado con el conocimiento científico de los océanos, la sostenibilidad de los recursos pesqueros y el medio ambiente marino y que cuenta con diez centros repartidos por toda España.
- Campus do Mar es un proyecto liderado por la Universidad de Vigo y promovido por las tres universidades gallegas, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Instituto Español de Oceanografía que aglutina a los agentes socioeconómicos e investigadores de la Euroregión Galicia- Norte de Portugal relacionados con el ámbito marino, buscando así reunir el mayor potencial posible y optimizar los recursos disponibles.
- CETMAR, Centro Tecnológico del Mar, es una fundación de interés gallego que nace en el año 2001 a iniciativa de la Consellería do Mar y la Dirección Xeral de I+D+I de la Xunta de Galicia y del Ministerio de Ciencia e Innovación. Es una plataforma cuyo objetivo es impulsar la cooperación entre las instituciones, los centros de investigación y el sector marítimo-pesquero, así como fomentar la implicación de los sectores dependientes del mar en actividades de I+D+I y favorecer la eficiencia de todas las actividades relacionadas con el uso y explotación del medio marino.

Toda esta expansión en este sector de manera muy vanguardista es debida a que cada vez hay más evidencias de que la búsqueda de productos biológicos marinos, con capacidad de proporcionar herramientas terapéuticas para enfermedades que no han respondido a la farmacología clásica es un camino apropiado y consistente para desarrollar terapias eficaces.

4. Las enfermedades crónicas

Las enfermedades crónicas son enfermedades que afectan a las personas que la padecen durante un largo periodo de tiempo y, por lo general, tienen una progresión lenta. Hay muchos tipos de enfermedades crónicas como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardíacas y las enfermedades o afecciones respiratorias crónicas, que son las principales causas de mortalidad en el mundo. En 2.008, 36 millones de personas murieron de una enfermedad crónica, de las cuales la mitad eran de sexo femenino y el 29% tenían una edad inferior a los 60 años.

Todas ellas suelen compartir, en mayor o menor medida, las causas ambientales que las producen y los síntomas que manifiestan, tales como accidentes cerebrovasculares e ictus,

los infartos, la hipertensión, la hipercolesterolemia y la obesidad. Este último, actualmente tiene una mayor incidencia sobre la población mundial y se puede considerar como un síntoma de una enfermedad, como por ejemplo en la diabetes, o como una enfermedad en sí misma, de hecho se conoce que existe una predisposición genética para la obesidad, a parte de un estilo de vida saludable.

Dentro del amplio rango de enfermedades crónicas también cabe citar la artritis, el cansancio crónico o persistente, el dolor crónico, las cefaleas crónicas, las enfermedades mentales o psiquiátricas e incluso enfermedades autoinmunes como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Son muchas las sustancias que se han descrito con propiedades para proporcionar una gran cantidad de beneficios para la salud y, muchas de éstas se han descrito en el medio marino. Sustancias como los péptidos, ácidos grasos poliinsaturados omega-3, polisacáridos, carotenoides o polifenoles poseen además actividad para reducir la incidencia de las enfermedades crónicas o paliar sus síntomas (Tabla 1)

Sustancias	Bioactividad
Péptidos	Anticoagulantes Antidiabéticos Antioxidantes Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)
Ácidos grasos poliinsaturados omega-3	Anticarcinogénicos Cardioprotectores Antiinflamatorios Protectores de la función cognitiva
Polisacáridos	Anticarcinogénicos Cardioprotectores Antioxidantes
Carotenoides	Anticarcinogénicos Reductores de la obesidad Antidiabéticos Antioxidantes
Clorofilas	Anticarcinogénicos
Polifenoles	Antidiabéticos Antioxidantes

Fuente: Lordan et al., 2.011.

Tabla 1: Compuestos Bioactivos de Origen Marino con Actividad sobre las enfermedades crónicas

5. Enfermedades neurodegenerativas

La patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, cuya prevalencia va en significativo aumento, ha sido profundamente estudiada, y lo poco que se conoce hasta hoy, salvo en los casos de enfermedades monogénicas, indica un origen multifactorial de las mismas, tanto genéticos como factores ambientales (climatología, geografía y asimilación nutricional). De esta manera, se ha demostrado el importante papel que determina la nutrición en la prevención de la enfermedad de Alzheimer, que es una de las mayores causas de demencia. La deficiencia crónica nutricional, tanto por factores endógenos como por factores exógenos, puede contribuir a una disfunción metabólica, que directa o indirectamente repercute en el metabolismo cerebral y termine provocando la neurodegeneración. Además, estudios nutrigenómicos y farmacogenómicos indican que los nutrientes y los fármacos en la enfermedad de Alzheimer operan según un programa genotipo-dependiente. Se ha estudiado un claro componente vascular, que aumenta progresivamente con la edad y que también está en franca relación con la ingesta, de hecho el riesgo cerebro vascular de este tipo de demencia puede ser tan alto, que no permita distinguir, en un estadio avanzado, esta enfermedad de una demencia vascular (Cacabelos et al., 2003, Cacabelos, 2005)

Muchos estudios han sugerido la posibilidad de que diferentes dietas pudiesen contribuir a la prevención de desórdenes (Cacabelos, 2005). En ellos se incluyen diferentes nutrientes como antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, aceites de pescado o lipoproteínas marinas (Pérez-Jiménez, 2005, MacLean et al., 2005). También estudios epidemiológicos, clínicos y de modelos experimentales han demostrado interacciones entre los factores ambientales, el colesterol y la enfermedad de Alzheimer. De esta manera se hace patente la importancia multidisciplinar que han demostrado los ácidos grasos poliinsaturados como paliativo sintomatológico en las enfermedades neurodegenerativas (Sambamurti et al., 2004)

Otro componente patológico de la neurodegeneración, sobretodo de la enfermedad de Alzheimer o del Parkinson, es la inflamación, estrechamente relacionada con lo anteriormente descrito (Esiri, 2007). El cerebro incorpora ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como antiinflamatorios. También una dieta rica en EPA y DHA ha demostrado que puede mantener la neuroinflamación en niveles mínimos (Layè, 2010)

Otros compuestos con capacidad antiinflamatoria son los que inciden suprimiendo la expresión de la enzima pro-inflamatoria ciclooxigenasa-2 (COX-2). Un extracto de *Ulva*

conglobata ha demostrado un efecto muy potente de supresión de la enzima pro-inflamatoria de la COX-2 y de óxido nítrico inducible (iNOS) en la microglía murina BV2 (Jin, 2006). Del mismo modo, un extracto etanólico procedente del alga parda, *Ecklonia cava*, se informó para inducir inhibición significativa de citoquinas dependientes de NF-kB, así como la iNOS y COX-2, reduciendo de este modo la inflamación (Jung et al., 2009). También se ha presentado al alga roja *Neorhodomela aculeate* como un potencial agente neuroprotector y anti-inflamatorio para el tratamiento de trastornos neurológicos relacionados con el envejecimiento (Lim et al., 2006) Sin embargo, como se destaca por los autores, se necesitan más estudios para determinar qué componentes de cada una de las algas contribuyen a las actividades anti-inflamatorias observadas.

Estudios epidemiológicos y clínicos, tanto in vivo como in vitro, sugieren un papel importante de la vitamina E en el funcionamiento cerebral. Se ha encontrado una fuerte asociación entre el aumento de los niveles de vitamina E y α -tocoferol y la reducción de la incidencia de Alzheimer (Morris et al., 2005). La carencia de vitamina C tiene una fuerte repercusión sobre la expresión genética en el sistema nervioso central, ya que la vitamina E regula los genes asociados a hormonas metabólicas, factores de crecimiento, apoptosis y neurotransmisión (Rota et al., 2005). Son muchas las algas que poseen altas cantidades de vitaminas y antioxidantes (Lordan et al. 2011).

El sistema inmunológico representa una sofisticada maquinaria de protección ante los efectos dañinos producidos por ataques bacterianos, de virus o de enfermedades crónicas como el cáncer, el sida o enfermedades autoinmunes.

Extractos lipoproteicos de diferentes especies de pescado azul (*Sardina pilchardus*, *Scomber scombrus* y *Trachurus trachurus*) han mostrado un alto poder hipolipemiente e inmunoregulador (Lombardi y Cacabelos, 1999, Lombardi et al., 2004).

Un estudio en animales superiores, concretamente en cerdos, demostró diversas actividades terapéuticas y paliativas del compuesto E-CAB-94011 en enfermedades crónicas, tales como el cansancio crónico o persistente y los síntomas como la hipertensión arterial, el riesgo cerebrovascular y de infarto de miocardio pertenecientes a las enfermedades cardiovasculares. Se trata de un concentrado de proteína de pescado azul extraído mediante un proceso de liofilización que garantiza sus propiedades naturales. El extracto con el nombre comercial CabyMar, ha demostrado efectos moduladores en la respuesta inmunológica celular y humoral y en los valores hematológicos. Asimismo ha revelado gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes (Lombardi et al., 2005).

Estudios posteriores *in vitro* revelaron una activación de los marcadores de expresión Fas y de apoptosis en linfocitos extraídos de sangre periférica. Estas moléculas de la membrana celular de los linfocitos desempeñan un papel importante en la homeostasis del sistema inmunológico y de la actividad citotóxica.

Al igual que el anterior extracto existe otro, también a partir de pescado azul, denominado comercialmente DefenVid (E-JUR-94013) que ha demostrado similares respuestas inmunoregulatoras y de reducción de porcentajes de células en muerte celular programada (apoptosis) que el anterior compuesto.

Un producto que incide sobre la restauración del sistema inmunológico, reforzándolo y estimulándolo en situaciones de estrés, es el E-Congerine-10423[®], nutracéutico comercializado con el nombre Antigan. Este compuesto de origen marino es un extracto lipoproteico de *Conger conger* obtenido mediante un proceso biotecnológico no desnaturalizante. El proceso biotecnológico, desarrollado en Ebiotec, S.A., permite conservar todas las propiedades biológicas de las lipoproteínas que se encuentran en las membranas musculares de esta especie marina. También se ha estudiado este extracto en diferentes líneas celulares tumorales presentando una actividad citotóxica específica en varias de ellas. Como valor añadido, a parte de su valor proteico, Antigan también ha presentado en las analíticas bioquímicas gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos el ácido eicosapentaenoico (20:5, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6, DHA) (Lombardi et al., 2006).

6. Cáncer

Hace falta sólo una célula que sufra una mutación en su ácido desoxirribonucleico (ADN) para que se desarrolle un cáncer. Ésta en vez de cumplir el ciclo celular normal, es decir, madurar y morir, las células cancerosas se dividen de manera incontrolada y no maduran. Esto puede surgir en cualquier parte del organismo, incluidos la sangre y los órganos formadores de sangre. En este último caso no se forman tumores sólidos, masa de tejido producida por la multiplicación incontrolada de las células, sino que el cáncer circula a través del cuerpo.

Lo diferentes tipos de cáncer reciben su nombre en función del tejido o el órgano en el que se originan (por ejemplo, el cáncer de colon) o, en algunos casos, por el tipo de células que los forman (por ejemplo, leucemia, carcinoma). Cada tipo diferente de cáncer se comporta de forma distinta en cuanto a su crecimiento, a su respuesta al tratamiento y a la probabilidad y perspectivas de supervivencia.

Como principales causas del cáncer cada vez se asocian de manera más clara los factores ambientales. De entre estos factores, diferentes según la región geográfica en donde se resida, destacan el consumo de tabaco, la exposición a carcinógenos relacionados con la profesión, el sedentarismo, la radiación ultravioleta, la radiación ionizante y la dieta occidental. Sólo entre el 5% y el 10% de todos los cánceres se deben a un defecto en varios genes individuales y un sobre un 15% se asocian a infecciones crónicas como las causadas por los virus de la hepatitis, *Helicobacter pylori* o los virus del papiloma humano.

A partir de las plantas terrestres se han desarrollado compuestos que se emplean en la actualidad para el tratamiento del cáncer como son la vincristina, irinotecán, paclitaxel y etopósido. También a partir de microorganismos terrestres se han identificado agentes anticancerígenos como la dactinomicina, bleomicina y doxorubicina. Son menos los compuestos de origen marino que actualmente están aprobados para su uso comercial como fármacos para el tratamiento del cáncer, como son los compuestos citarabine y la trabectedina. Otros agentes antitumorales procedentes de fuentes marinas que actualmente se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos son la briostatina-1, aplidina, dolastatina 10, ET-743, PM01183, didemnina B, PM060184 y el zalipsis®.

Existen muchos ejemplos de compuestos derivados de especies marinas con actividad antitumoral y en diferentes fases ensayos clínicos y preclínicos (Tabla 2).

Otra estrategia utilizada para el desarrollo de terapias contra los diferentes tipos de cáncer es el estudio de inhibidores de la angiogénesis. La actividad anti-angiogénica es considerada como la mejor herramienta para suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis.

Se han descrito varios agentes inhibidores de la angiogénesis derivados de productos naturales de origen marino que han demostrado su efecto. Todos ellos han aportado interesantes novedades en sus características tanto en estructura química como en su actividad, toxicidad y en sus respectivos mecanismos de acción.

La mitad de los agentes inhibidores de la angiogénesis que se han publicado hasta la fecha provienen de animales marinos como túnidos, escualos, pepinos de mar o cohombros y, en su mayoría, de las esponjas. El resto de los agentes provienen de hongos, bacterias y actinomicetes. En menor proporción la procedencia es a partir de fitoplancton.

Las estructuras químicas de los agentes con actividad anti-angiogénesis se han revelado con diferentes estructuras químicas, lo que confiere a cada una de ellas diversos mecanismos de acción inhibitoria frente a la creación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor. La mayor parte

Compuesto	Especie Marina de Procedencia	Características	Actividad estudiada	Referencia Bibliográfica
Agelasinas	<i>Agelas mauritanus</i> - Esponja de Okinawa.	Glicosfingolípido. Derivados sintéticos (KRN7000) han demostrado capacidad para activar células N. K. funcionando como ligando del receptor T de antígeno de membrana.	Antitumoral	Natori et al., 1.994 Hayakawa et al., 2.003
Aplidina	<i>Aplidium albicans</i>	Análogo de las didemnas. Actividad antiangiogénica inhibiendo la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular. Detiene el ciclo celular en las fases G1 y G2.	Carcinoma medular de tiroides Carcinoma renal Melanoma Tumores de origen neuroendocrino	Tarboletti et al., 2.004
Briostatina I	Briozoo <i>Bulgula neritina</i>	Actúa por unión a los mismos receptores que los ésteres de forbol. Regula a la baja la actividad de la protein quinasa C, lo que inhibe el crecimiento, la alteración de la diferenciación y la muerte celular.	Antitumoral	Chin et al., 2.006
Colestanos polioxigenados	Gorgonia <i>Leptogorgia sarmentosa</i> .	Actividad citotóxica en cultivos de células <i>in vitro</i> .	Carcinoma de pulmón Cáncer de colon Melanoma	Garrido et al., 2.000 Boonananwong et al., 2.008
Criptosfaerolida	<i>Cryptosphaeria</i> sp.	Inhibidor de la diferenciación celular a través de la proteína Mcl-1	Carcinoma de colon (cultivo celular)	Finical et al., 2.010
Dolastatinas 10 y 15	<i>Dolabela auricularia</i> - Liebre de mar del Océano Índico.	Actividad antineoplásica a través de la inhibición de la unión de los microtúbulos.	Antitumoral	Pettit et al., 1.987, 1.989
Ecteinascidina 743	<i>Ecteinascidia turbinata</i> - Tunicado colonial (Ascidia)	Potente agente antitumoral con actividad citotóxica contra una gran variedad de tumores en líneas celulares <i>in vitro</i> y contra varios tumores de roedores y xenoinjertos de tumores humanos <i>in vivo</i> . Se mostró particularmente alta actividad contra sarcomas avanzados que habían recaído o eran resistentes a la terapia convencional.	Sarcoma de tejidos blandos avanzado o metastático	Soares et al., 2.005 Rinehart et al., 2.000 Chen et al., 2.005
Escualamina	<i>Squalus acanthias</i> - Tiburón Dogfi.	Un aminosterol inhibidor del factor de crecimiento de células endoteliales. Inhibe también la migración y la angiogénesis.	Antitumoral	Moore et al., 1.993 Hao et al., 2.003
Espisulósina	<i>Spisula polynyma</i>	Actividad antiproliferativa en diversas líneas celulares cancerígenas. Inhibe el crecimiento de melanoma y tumores de próstata en estudios con ratones.	Cáncer de colon (in vitro) Tumores renales (in vitro) Cáncer de estómago (in vitro) Cáncer de faringe (in vitro) Cáncer de páncreas (in vitro) Tumor de próstata (en ratones) Melanoma (en ratones)	Jimeno et al., 1.999 Cuadros al., 2.000
Halicondrina E7389	Derivado del componente halicondrina B proveniente de <i>Halichondria okadae</i> .	Actividad a nivel de los microtúbulos.	Antitumoral	Jordan et al., 2.005
HTI-286	Análogo sintético del tripéptido, hemiasterlina aislado de <i>Hemisterella minor</i> - Esponja de África del Sur.	Despolimeriza microtúbulos y bloquea el crecimiento celular. También ha demostrado antitumoral actividad en modelos murinos de xenoinjertos tumorales humanos.	Antitumoral	Loganzo et al., 2.004
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens</i> - Molusco	Disipéptido cíclico	Melanoma Hepatoma Carcinoma de mama y páncreas	Suárez et al., 2.003
Manzamina A	Varias especies de esponjas.	Efecto citotóxico AsPC-1 células pancreáticas evitando la metástasis.	Células pancreáticas	Guzman et al., 2.010
Sintadotina	<i>Dolabela auricularia</i> - Liebre de mar del Océano Índico.	Análogo de la dolastatina 15	Antitumoral	
Soblidotinun	<i>Dolabela auricularia</i> - Liebre de mar del Océano Índico.	Derivado de dolastatina 10	Antitumoral	

Tabla 2: Otros compuestos derivados de organismos marinos con propiedades anticancerígenas.

de ellos son sacáridos, macrociclos, terpenos, alcaloides y pironas. También se describen en menor medida pépticos, xantonas, saponinas y otras estructuras (Figuras 1, 2, 3 y 4).

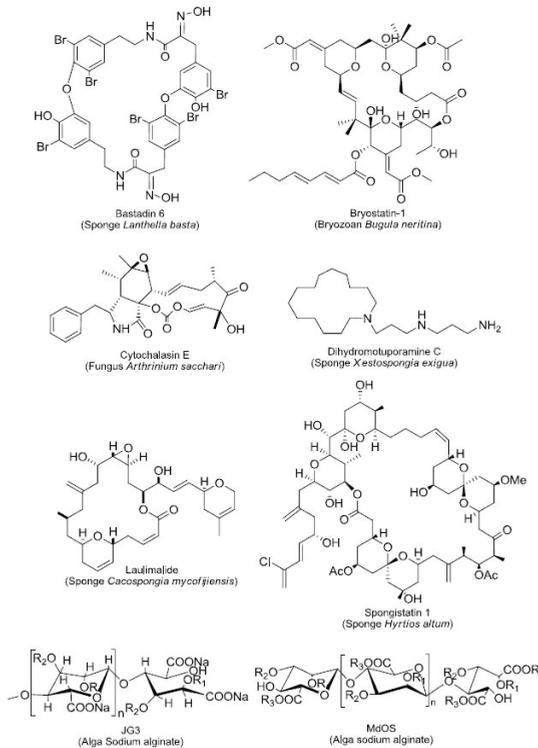


Figura 1. Estructuras químicas y procedencia marina de macrociclos y sacáridos. JG3, R₁ = SO₃Na, R₂ = H o SO₃Na, n = 3-9; MdOS, R₁ = SO₃Na, R₂ = H o SO₃Na, R₃ = CH₂CH(OH)CH₃ o Na, n = 2-8. Fuente: Ying-Qing Wang y Ze-Hong Miao, 2013.

Esta variabilidad en la estructura química ha permitido describir cinco divisiones diferentes según el mecanismo de acción: Agentes moduladores de la protein Kinasa como los derivados del hongo *Hypocrea vinosa* (Ohkawa et al., 2010) que actúan de moduladores de las diferentes cascadas de kinasas relacionadas con los receptores de los factores de crecimiento (endotelial vascular (EGFR), de fibroblastos (FGFR)) para evitar activaciones aberrantes, agentes con capacidad de alterar la estructura del citoesqueleto (Tarboletti et al., 2004), inhibidores del HDAC, inhibidores del MetAP y otros, basados en sus diana (targets) o en sus mecanismos de acción (Ying-Qing Wang y Ze-Hong Miao, 2013)

Actualmente se han identificado docenas de productos naturales de origen marino y sus análogos sintéticos con actividad inhibitoria de la angiogénesis o con actividad desestabilizadora de los vasos sanguíneos.

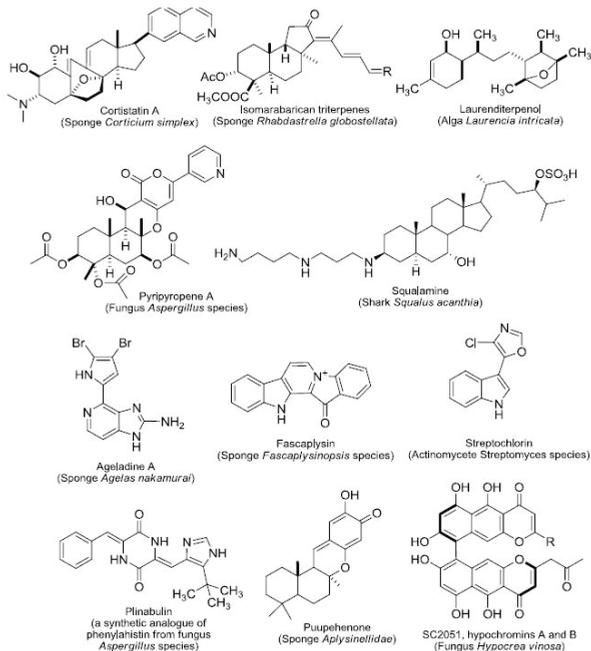


Figura 2. Estructuras químicas y origen marino de terpenos, alcaloides y pironas. SC2051, R = =O; hypocrominas A, R = -OH; y hypocrominas B, R = CH₃. Fuente: Ying-Qing Wang y Ze-Hong Miao, 2.013.

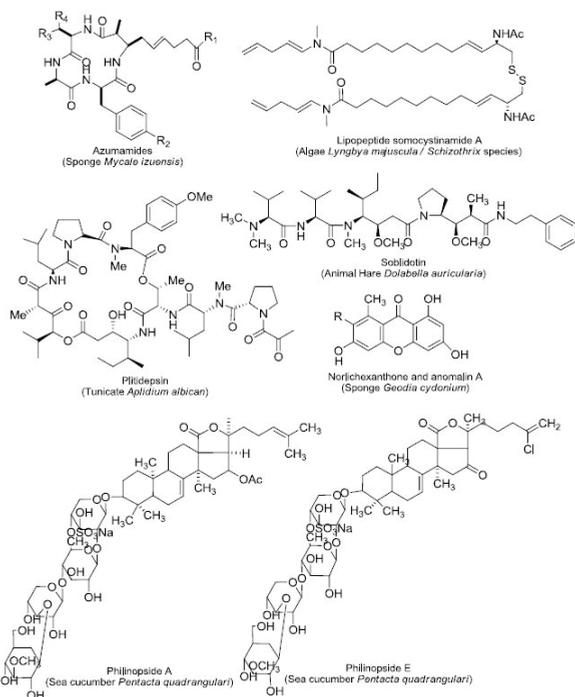


Figura 3. Estructuras químicas y fuente de péptidos, saponinas y xantomas. Norlichexantona, R = H; anomalina A, R = OH. Fuente: Ying-Qing Wang y Ze-Hong Miao, 2.013.

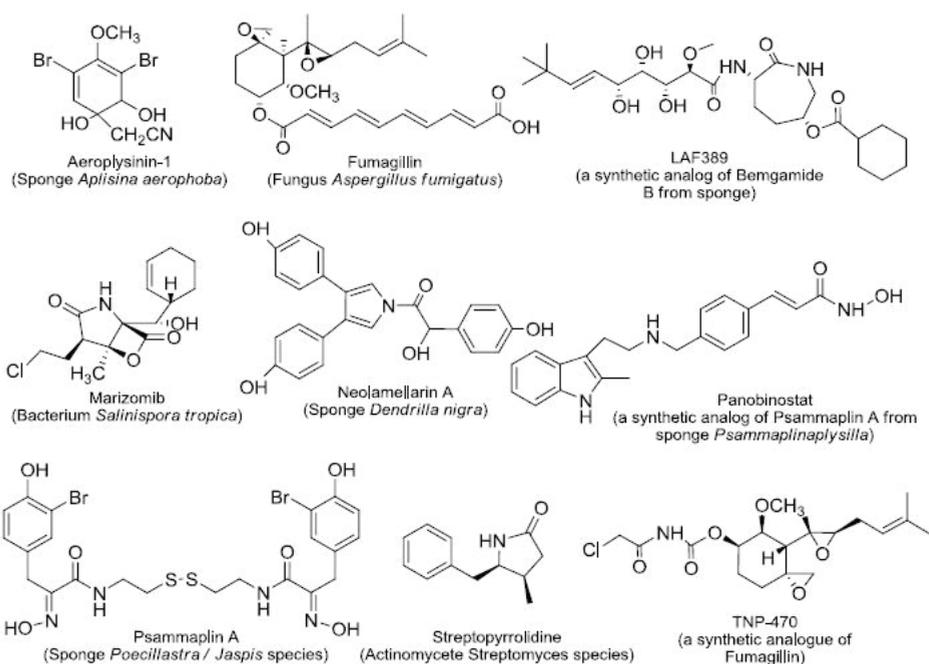


Figura 4. Estructuras químicas y procedencia marina de otros compuestos. Fuente: Ying-Qing Wang y Ze-Hong Miao, 2013.

Como se mencionaba al principio de este capítulo, a mediados del pasado siglo se aislaron a partir de la esponja del Caribe (*Cryptotheca crypta*) nucleósidos con actividad antitumoral y antiviral que no se aprobaron y comercializaron hasta quince años después de su casual descubrimiento.

Primer compuesto de origen marino aprobado en cáncer en los últimos 30 años es un metabolito secundario aislado a partir de una esponja, de un tunicado colonial (*Ecteinascidia turbinata*) Actualmente el principio activo descubierto por la empresa española Pharmamar (perteneciente al grupo Zeltia), la trabectedina se sintetiza químicamente para su comercialización. El éxito del Yondelis® valida el foco en la biotecnología marina (De la Calle, 2007).

No parece demasiado aventurado asegurar que la biotecnología marina es el camino adecuado para encontrar alternativas terapéuticas para la curación de la mayoría de los cánceres, así como la de su sintomatología, tal y como demuestran los numerosos artículos publicados en los que se relatan año tras año numerosos nuevos compuestos con actividad anticancerosa (Schumacher et al., 2011; Sawadogo et al., 2013).

7. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica que afecta a diferentes órganos y tejidos y se caracteriza por el incremento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). El origen de la diabetes puede ser genético o por factores ambiental y se conocen dos tipos de esta enfermedad (Harris y Zimmet, 1997). La principal causa de la enfermedad es la disponibilidad de la hormona insulina circulante, que puede ser debida por el descenso en la secreción por las células β de los Islotes de Langerhans del páncreas o por el uso inadecuado de ésta por parte del organismo, lo que repercute en le metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

Los síntomas principales de la diabetes mellitus son emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia), y pérdida de peso sin razón aparente. La Organización Mundial de la Salud reconoce tres formas de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional (ocurre durante el embarazo), cada una con diferentes causas y con distinta incidencia.

La diabetes tipo 1 o insulino dependiente está causada por una reacción autoinmune, llevada a cabo por las células T, contra las células β de los Islotes de Langerhans, lo que produce la descompensación denominada cetoacidosis y, con ella, toda la cadena de efectos secundarios que produce.

La diabetes tipo 2, no insulino dependiente, es la que afecta a mayor número de personas. Este tipo de diabetes se caracteriza por tener una inadecuada secreción de insulina y por el uso inadecuado de ésta, lo que se conoce como resistencia a la insulina, lo que quiere decir que el receptor de insulina de las células que se encargan de facilitar la entrada de la glucosa a la propia célula está dañado. Se producen serias complicaciones metabólicas a nivel de los vasos sanguíneos, sistema nervioso, corazón, riñones y otros órganos. La diabetes tipo 2 está estrechamente relacionada con la obesidad.

Obesidad - El chitosán es un derivado de la quitina, una sustancia natural que se extrae del caparazón de los crustáceos como las gambas, cangrejos, etc. El Chitosán es un aminopolisacárido natural obtenido por la N-desacetilación de la quitina.

Son muchos los estudios sobre la gran cantidad de sustancias bioactivas marinas que describen efectos contra los diferentes tipos de la diabetes mellitus (Tabla 3).

Especie Marina de Procedencia	Parte funcional estudiada	Actividad estudiada	Ensayo / Modelo Animal	Enfermedad Crónica	Referencia Bibliográfica
<i>Ecklonia cava</i> - Alga parda	Extracto	Supresión de proliferación de de Células estrelladas del hígado mediante la reducción de la producción de oxígeno reactivo y la citokina TGF- .	Cultivos celulares <i>in vitro</i>	Diabetes mellitus tipo 2 y Obesidad	Yokogawa et al., 2.011
		Incremento de la insulina circulante y reducción de los niveles de glucosa. Activación de las rutas de señalización AMPK/ACC y PI3/Akt.	Ratas	Diabetes mellitus tipo 1	Kang et al., 2.010
<i>Oncorhynchus keta</i> - Keta o salmón chum	Disociado de gelatina de la piel	Úlceras/heridas en la piel	Ratas	Diabetes mellitus	Zhang et al., 2.011
<i>Chiloscyllium plagiosum</i> - Pintarroja colilarga de manchas blancas	Péptido activo a partir del hígado.	Regeneración de hígado y protección del páncreas. Descenso de los niveles de glucosa en sangre.	Ratas	Diabetes mellitus tipo 2	Liu et al., 2.013
<i>Ulva lactuca</i>	Polisacaridos	Efecto inhibitorio sobre enzimas -amilasa y maltasa	Ratas	Diabetes mellitus y Obesidad	Belhadj et al., 2.013
<i>Rhodomela confervoides</i> - Alga roja	HPN, sintético análogo de bromofenol BPN	Inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), diana terapéutica para la diabetes.	Ratones C57/KsJ-db/db	Diabetes mellitus tipo 1 (Inflamación)	Shi et al., 2.013
<i>Penicillium</i> sp. JF-55	Aislados tres metabolitos: Penstirilpirona, Ácido Anhidrofúlvico y Citromicetina.	Inhibidores de la proteína PTP1B	Cultivos celulares <i>in vitro</i>	Diabetes mellitus tipo 1 (Inflamación)	Lee D. S. et al., 2.013
Varias especies	Ácidos grasos poliinsaturados omega-3	Filtración glomerular renal (excreción de albúmina)		Diabetes Enfermedad cardiovascular	Lee y Adler, 2.012

Tabla 3: Diabetes mellitus. Relación de algunas de las especies marinas, sus características, actividad sobre la enfermedad y referencia bibliográfica.

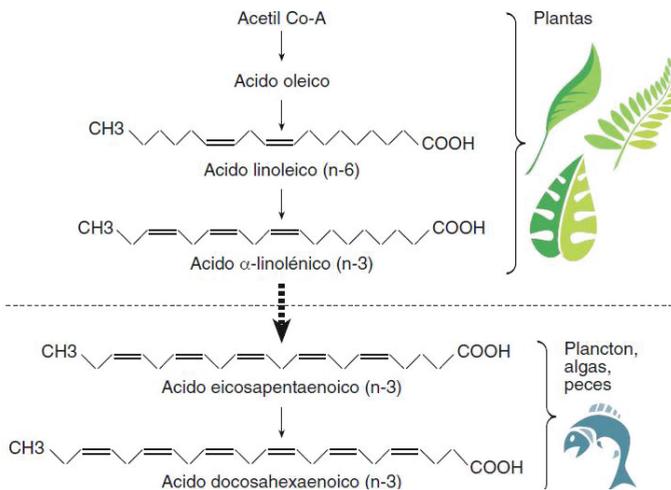
8. Enfermedades cardiovasculares

Se trata de un grupo de enfermedades que engloba a todas aquellas en las que se vea afectado el corazón, el sistema circulatorio venoso y arterial y la circulación sanguínea. De esta manera, la arteriosclerosis, los infartos y microinfartos, los fallos cardiacos o la hipertensión son síntomas directamente relacionados con las enfermedades cardiovasculares.

Este tipo de enfermedad crónica, igual que las enfermedades neurodegenerativas o en los cánceres, tiene un potente factor ambiental en su génesis, además del factor hereditario y, al igual que las otras enfermedades citadas, posee un gran abanico de sustancias con actividad para reducir los factores de riesgo asociados a estas enfermedades. Compuestos de origen marino como el alga *ulva rigida* han demostrado acciones profilácticas sobre parámetros directamente relacionados con riesgo cardiovascular tales como son los niveles de colesterol, LDL, HDL, triglicéridos, etc (Taboada et al., 2010).

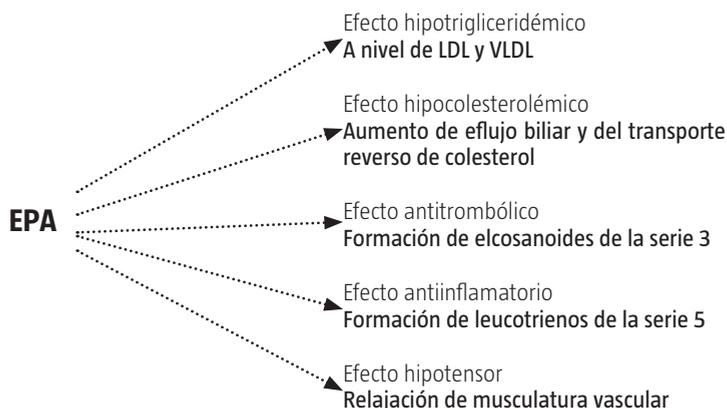
Existen numerosos estudios que demuestran los beneficios de la ingesta de fibra soluble en la dieta que produce un efecto hipocolesterolémico, entre otros efectos, en la sangre. Las algas marinas contienen gran cantidad de polisacáridos solubles, que por lo tanto tienen una función potencial como fibra dietética. Diferentes grupos de investigación han señalado varios polisacáridos como el fucoidan y el sodio alginato como unas de las fracciones solubles en agua procedente de las algas marinas que inducen efectos hipocolesterolémicos y antihipertensivo probado en animales de experimentación (Thomes et al., 2010, Huang et al., 2010).

Otros importantes compuestos que reducen de manera muy importante el peligro de accidente cardiovascular en la población de riesgo son los ácidos poliinsaturados omega-3 (Figura 5), de los que ya se han descrito sus bioactividades y procedencias marinas en este capítulo (Lombardi et al., 2004). El primer reconocimiento de los efectos beneficiosos de los ácidos grasos sobre la enfermedad cardiovascular vino de las observaciones sobre la longevidad de los esquimales, que más tarde se atribuyó a la alta concentración de peces derivados de omega-3 los ácidos grasos de cadena larga (por ejemplo, EPA y DHA) en su dietas (Bang y Dyerberg, 1972). Se ha establecido un índice porcentual que expresa el nivel de EPA y DHA en membranas de las células rojas de la sangre sobre el total de ácidos grasos. Dicho índice no debe ser inferior al 8%. También se ha descrito en diferentes estudios la relación entre una dieta rica en aceite de pescado y el control de la hipertensión esencial (Knapp y Fitzgerald, 1989) (Figura 6).



Fuente: http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/los_acidos_grasos_omega_3_y_su_importancia.htm.

Figura 5. Origen y composición de los ácidos grasos Omega-3.



Fuente: Valenzuela y Sanhueza, 2.009.

Figura 6. Beneficios derivados del consumo de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la salud cardiovascular.

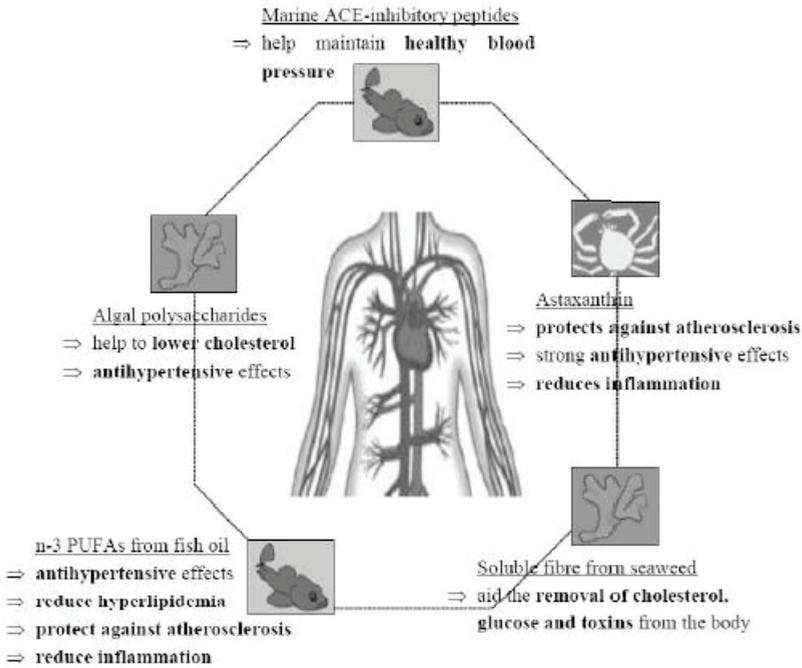
Uno de las vías más estudiadas para el control de la hipertensión arterial es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Esta enzima actúa sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona el cual regula la hemodinámica cardiovascular y el balance de electrolitos en los líquidos corporales. Regula la conversión de la angiotensina I en angiotensina II que es un potente agente vasoconstrictor lo que provoca que se eleve la resistencia vascular periférica y, por ende aumentar la tensión arterial (Skeggs et al., 1956).

Según los estudios publicados, se han descrito como potentes inhibidores de la actividad de la ACE compuestos bioactivos de origen marino tales como péptidos, derivados de quitooligosacáridos y florotaninos de las algas pardas. Como ejemplo, se ha descrito un hidrolizado polipeptídico derivado del atún con un fuerte efecto supresor sobre la presión arterial sistólica de ratas hipertensas y esta actividad antihipertensiva fue similar a la de captopril, un fármaco antihipertensivo comercial (Lee et al., 2010).

Debido a sus propiedades antioxidantes, se cree que los carotenoides pueden tener beneficio terapéutico en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. La astaxantina es un carotenoide derivado del medio marino que además tiene efectos reductores sobre la aterogénesis (Yuan et al., 2010). Además de la prevención de la aterosclerosis y su incidencia sobre el colesterol y los triglicéridos, se ha demostrado en este carotenoide extraído de las algas, un efecto modular en el estado oxidativo vascular y una mejora de en las paredes arteriales (Hussein et al., 2006).

Los compuestos activos citados anteriormente introducidos en la dieta reducen significativamente los factores de riesgo sobre las enfermedades cardiovasculares (Figura 7). Además

de los ácidos grasos omega-3, la astaxantina y los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina también se han observado resultados que sugieren que el agua de las profundidades del mar puede tener el potencial para ser desarrollado como un agente terapéutico hipotensor y de reducción de lípidos para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis (Sheu et al., 2013).



Fuente: Lordan et al., 2011

Figura 7: Incidencia de algunos de los mariscos sobre la salud cardiovascular.

Otro interesante estudio reciente ha evidenciado propiedades no solamente antiinflamatorias, si no que también paliativas de dolor de un extracto de *Perna canaliculus* (PCSO-524™). Dicho compuesto lipídico no polar se ha comparado con la administración de aceites de pescado y placebo en pacientes con osteoartritis (Zawadzki et al., 2013).

9. Artritis

Etimológicamente la palabra artritis deriva del griego “arthros”= articulación y el sufijo “itis” que define la inflamación, de tal forma que artritis equivale a “inflamación de una articulación”.

En las articulaciones los extremos de los huesos están cubiertos por cartílago, y todo ello, cerrado por un tejido conocido como membrana sinovial. En esta membrana es donde asienta la inflamación en la artritis, aunque posteriormente puede lesionar el resto de las estructuras articulares. De esta forma se produce inestabilidad y deformidad de la articulación y, como consecuencia, incapacidad funcional.

Según la Asociación Española de Reumatología, la artritis si afecta únicamente a una articulación se llama monoartritis, cuando son 2 ó 3 recibe el nombre de oligoartritis y si afecta 4 ó más simultáneamente, se denomina poliartritis. Puede producirse por muchas causas, como un traumatismo, ejercicio físico excesivo, también por una infección, mecanismos de autoinmunidad o ser de origen desconocido.

Son más de 100 las enfermedades que pueden motivarla. Las más frecuentes son:

- Artritis Reumatoide: Es una poliartritis que afecta con frecuencia a las articulaciones de los miembros (especialmente manos y pies) y menos a las de la columna. Suele ser bilateral y simétrica, lo cual quiere decir que inflama las mismas articulaciones, en ambos lados del cuerpo. En España hay entre 200 y 400 mil personas con esta enfermedad. Predomina en el sexo femenino, sobre todo a partir de los 40-50 años.
- Gota: Aparece esta enfermedad por un exceso de ácido úrico en el organismo, con lo cual se forman pequeños microcristales, que se depositan en las articulaciones inflamándolas. Es característica la artritis de la articulación que une el pie y el dedo grueso, pero no siempre aparece. También se inflaman con frecuencia rodillas y tobillos. Al principio, la artritis aparece intermitentemente, pero si no se trata el proceso se puede cronificar. Los hombres padecen gota más frecuentemente que las mujeres.
- Espondilitis anquilosante: La espondilitis anquilosante es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta fundamentalmente a las articulaciones de la columna vertebral, las cuales tienden a soldarse entre sí, provocando una limitación de la movilidad (de ahí el término anquilosante, que proviene del griego ANKYLOS y significa soldadura, fusión). Como resultado final se produce una pérdida de flexibilidad de la columna, quedándose rígida y fusionada. Es una enfermedad frecuente, sobre todo en la raza blanca (0.5-1% de la población). Habitualmente aparece en varones entre los 20 y 30 años de edad. En mujeres es menos frecuente y suele ser más leve.
- Artritis psoriática: Es una enfermedad de las articulaciones que se presenta en algunos enfermos de soriasis, lo que le confiere unas características peculiares en cuanto a evolución y pronóstico. La lesión articular es inflamatoria, es decir con dolor,

hinchazón, calor, dificultad de movimiento de la articulación inflamada y a la larga posibilidad de deformación. Sólo un 10% de enfermos con soriasis desarrollarán artritis y la gravedad de ésta no tiene relación con la extensión de la lesión de la piel. Es una enfermedad crónica, que evoluciona irregularmente a lo largo de la vida, con épocas de inactividad y épocas de inflamación y dolor.

- Artritis idiopática juvenil: Es la forma más común de artritis en los niños. Produce dolor, rigidez articular, hinchazón de las articulaciones y pérdida de movimiento. Puede acompañarse de lesiones cutáneas y fiebre.
- Lupus eritematoso: Es una enfermedad autoinmune, de predominio en mujeres jóvenes y que puede dañar la piel, las articulaciones, el corazón, los riñones y otros órganos internos.
- Artritis reactiva: El término artritis reactiva se utiliza para describir la artritis que aparece tras una infección intestinal o génito-urinaria. También puede producir lesiones de la piel, úlceras en la boca, conjuntivitis y fiebre.

Es evidente que la prevención y el tratamiento de la inflamación, el efecto paliativo sobre el dolor y la mejora de la movilidad de enfermo, son las terapias más apropiadas para este tipo de enfermedad. De esta manera, todos los compuestos de origen marino ya mencionados y con actividad antiinflamatoria tienen cabida en la mejora terapéutica y preventiva de esta enfermedad, como son los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 o una gran variedad de lipopolisacáridos con efectos inhibitorios sobre las proteínas pro-inflamatorias (COX-2 e iNOS). Así, se han publicado estudios en los que se presentan sustancias como el extracto del coral blando *Sinularia querciformis*, 11-epi-sinulariolida acetato; el procente de los corales blandos del Japón (*Lemnalia tenuis* o *Lemnalia cervicorni*) llamado lemnalol, como agentes antiinflamatorios en líneas celulares de macrófagos murinos in vitro y en ratas con artritis reumatoide inducida y con gota inducida (Lin et al., 2013, Lee et al., 2013).

10. Otras enfermedades crónicas

Hay otras muchas enfermedades crónicas, algunas ya mencionadas, que también poseen importantes estudios de compuestos marinos para su tratamiento. Así, para el dolor crónico, que afecta a aproximadamente el 20% de las personas en todo el mundo, se han estudiado el veneno de los caracoles marinos de aguas tropicales, los denominados conos marinos. Los péptidos de este veneno han demostrado ser una herramienta valiosa en la neurociencia. Muchos fármacos y péptidos semejantes al AVC1, aislado del *Conus victoriae*,

se han mostrado efectivos, acelerando la recuperación de daños nerviosos, en tratamientos postoperatorios y dolor neuronal.

Existe un fármaco aprobado y comercializado para este tipo de dolencia llamado ziconotida, con el principio activo la ω -conotoxina de que deriva de la especie *Conus magus*. Este péptido potente y selectivamente inhibe Ca (v) de 2.2, lo que resulta en la analgesia en estados de dolor crónico. Sin embargo, este fármaco sólo está disponible a través de la administración intratecal, y los efectos adversos y una ventana terapéutica estrecha han limitado su uso en la clínica. Otros (v) inhibidores de Ca 2.2 están actualmente en desarrollo y ofrecen la promesa de una vía de mejora de la administración y el perfil de seguridad. Esta revisión evalúa el potencial de atacar VGCCs para el desarrollo de analgésicos, con un enfoque principal en conotoxinas que bloquean Ca (v) 2.2 y los desarrollos realizados para transformarlos en productos terapéuticos (Vink y Alewood, 2012).

Conclusiones

Es un hecho irrefutable que la utilización de la biotecnología marina ha sido una herramienta adecuada para la búsqueda de alternativas terapéuticas y paliativas para la curación de las enfermedades crónicas. Son muchos los aspectos por los que se puede afirmar esto último, como es toda la bibliografía existente sobre la gran cantidad de nuevos compuestos, técnicas y conocimiento que en apenas dos décadas de estudios se ha conseguido publicar, o como la obtención de extractos y principios activos contrastados que actualmente ya están en el mercado, hechos que resumidamente se han podido ver en este capítulo.

La biotecnología marina es, sin lugar a dudas, también la herramienta más sólida con la que actualmente hay que trabajar para continuar buscando soluciones a las enfermedades existentes, tanto por la cantidad de futuribles especies que se pueden analizar todavía (el 95% de la biodiversidad biológica de toda la tierra se encuentra en el medio acuático), como por el desconocimiento todavía existente sobre este medio. Así que, no sólo ha sido un extraordinario recorrido, si no que también debe ser el camino a seguir durante los próximos años.

En contraste a lo anteriormente expuesto, también es justo evidenciar el desequilibrio que existe, todavía en esta época, entre la identificación de compuestos con actividad terapéutica frente a la sintomatología de las enfermedades crónicas y la disponibilidad pública de los mismos. Es necesario que una mayor cantidad de los recursos que se distribuyen para todas

las actividades relacionadas con la investigación marina y, en especial con la biotecnología marina, se utilicen en apresurar y agilizar este proceso.

Referencias

- Bang H. y Dyerberg J. (1972) Plasma lipids and lipoproteins in greenlandic west coast eskimos. *Acta Med. Scand.*, 192. 85–94.
- Belhadj S., Hentati O., Elfeki A., Hamden K. (2013) Inhibitory Activities of *Ulva lactuca* Polysaccharides on Digestive Enzymes Related to Diabetes and Obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 119: 81-87; doi: 10.3109/13813455.2013.775159.
- Boonananwong S., Kongkathip B., Kongkathip N. (2008) First Synthesis of 3.16.20-Polyoxygenated Cholestanes, New Cytotoxic Steroids from the Gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. *Steroids*, 73: 1.123-1.127; doi: 10.1016/j.steroids.2008.04.013.
- Cacabelos R., Fernández-Novoa L., Lombardi V., Corzo L., Pichel V., Kubota Y. (2003) Cerebrovascular Risk Factors in Alzheimer´s Disease: Brain Hemodynamics and Pharmacogenomic Implications. *Neurological Research*, 25: 567-580.
- Cacabelos R. (2005) Pharmacogenomics, Nutrigenomics and Therapeutic Optimization in Alzheimer´s Disease. *Aging Health*, 1: 303-348.
- Cacabelos R. (2005) Role of Nutrition in the Prevention of Alzheimer´s Disease. *Aging Health*, 1: 359-362.
- Capton R. J. (2001) Marine Bioprospecting-trawling for Treasure and Pleasure. *European Journal of Organic Chemistry*, 4: 633-645.
- Costa M., Costa-Rodrigues J., Fernandes M. H., Barros P., Vasconcelos V., Martins R. (2012) Marine Cyanobacteria Compounds with Anticancer Properties: A Review on the Implication of Apoptosis. *Marine Drugs*, 10 (10): 2.181-2.207; doi:10.3390/md10102181.
- Cuadros R., Montejo de Garcini E., Wandosell F., Faircloth G., Fernández-Sousa J. M., Avila J. (2000) The Marine Compound Spisulosine, an Inhibitor of Cell Proliferation, Promotes the Disassembly of Actin Stress Fibers. *Cancer Letters*, 152: 23-29.
- Chen X., Chen J., De Paolis M., Zhu J. (2005) Synthetic Studies Toward Ecteinasclidin 743. *The Journal of Organic Chemistry*, 70: 4.397-4.408.
- Chin Y. W., Balunas M. J., Chai H. B., Kinghorn A. D. (2006) Drug Discovery from Natural Sources. *The AAPS Journal*, 8: E239-E253.
- Choi E. J., Park J. S., Kim Y. J., Jung J. H., Lee J. K., Kwon H. C., Yang H. O. (2011) Apoptosis-inducing Effect of Diketopiperazine Disulfides Produced by *Aspergillus* sp. KMD 901 Isolated from Marine Sediment on HCT116 Colon Cancer Cell Lines. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 304-313.
- De la Calle F. (2007) Fármacos de Origen Marino. *Treballs de la SCB.*, 58: 141-155; doi: 10.2436/20.1501.02.50.
- Esiri M. M. (2007) The Interplay Between Inflammation and Neurodegeneration in CNS Disease. *Journal Neuroimmunology*, 184: 4-16.
- Fabian C. J. y Kimler B. F. (2013) Marine-derived omega-3 Fatty acids. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2.013: 97-101; doi: E10.1200/EdBook_AM.2013.33.97.

- Fenical W., Oh H., Jensen P. R., Murphy B. T., Fiorilla C., Sullivan J. F., Ramsey T. (2010) Cryptosphaerolide, a Cytotoxic Mcl-1 Inhibitor from a Marine-Derived Ascomycete Related to the Genus *Cryptosphaeria*. *Journal of Natural Products*, 73: 998-1001; doi: 10.1021/np1000889.
- Garrido L., Zubía E., Ortega M. J., Salvá J. (2000) Isolation and Structure Elucidation of New Cytotoxic Steroids from the Gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. *Steroids*, 65:85-88.
- Guzmán, E. A. Johnson J. D., Linley P. A., Gunasekera S. E., Wright A. E. (2010) A Novel Activity from an Old Compound: Manzamine A Reduces the Metastatic Potential of AsPC-1 Pancreatic Cancer Cells and Sensitizes them to TRAIL-Induced Apoptosis. *Investigational New Drugs*, 29: 777-785. doi: 10.1007/s10637-010-9422-6.
- Haefner B. (2003) Drugs from the Deep: Marine Natural Products as Drugs Candidates. *Drug Discovery Today*, 8: 536-544.
- Hao D., Hammond L. A., Eckhardt S. G., Patnaik A., Takimoto C. H., Schwartz G. H., Goetz A. D., Tolcher A. W., McCreery H. A., Mamun K., Williams J. I., Holroyd K. J., Rowinsky E. K. (2003) A phase I and pharmacokinetic study of squalamine, an aminosterol angiogenesis inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 9: 2.465-2.471.
- Harris M. y Zimmet, P. (1997) Classification of Diabetes Mellitus and other Categories of Glucose Intolerance. En: *International Text Book of Diabetes Mellitus* (2ª ed.), John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 9-23.
- Hayakawa Y., Rovero S., Forni G., Smyth M. J. (2003) Alpha-Galactosylceramide (KRN7000) Suppression of Chemical-and Oncogene-Dependent Carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 9.464-9.469.
- Heo S. J. Park E. J., Lee K. W., Jeon Y. J. (2005) Antioxidant Activities of Enzymatic Extracts from Brown Seaweeds. *Bioresources Technology*, 96: 1.613-1.623.
- Hussein G., Goto H., Oda S., Sankawa U., Matsumoto K., Watanabe H. (2006) Antihypertensive Potential and Mechanism of Action of Astaxanthin: Iii. Antioxidant and Histopathological Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 684–688.
- Honore S., Kamath K., Braguer D., Wilson L., Briand C, Jordan M. A. (2003) Suppression of Microtubule Dynamics by Discodermolide by a Novel Mechanism is Associated with Mitotic Arrest and Inhibition of Tumor Cell Proliferation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2: 1.303 – 1.311.
- Huang F. y Wu W. (2005) Antidiabetic Effect of a New Peptide from *Squalus mitsukurii* Liver (S-8300) in Streptozocin-Induced Diabetic Mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57: 1.575-1.580.
- Huang L., Wen K., Gao X., Liu Y. (2010) Hypolipidemic Effect of Fucoidan from *Laminaria japonica* in Hyperlipidemic Rats. *Pharm. Biol.*, 48: 422–426.
- Ira Bhatnagar y Se-Kwon Kim (2010) Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies. *Marine Drugs*, 8: 2.702-2.720; doi:10.3390/md8102702.
- Jimeno J. M., García-Grávalos D., Ávila J., Smith B., Grant W. And Faircloth G. T. (1999) ES-285, a Marine Natural Product with Activity Against Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 5: 3792s.
- Jin D. Q., Lim C. S., Sung J. Y., Choi H. G., Ha I., Han J. S. (2006) *Ulva conglobata*, a Marine Algae, has Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects in Murine Hippocampal and Microglial Cells. *Neuroscience Letters*, 402: 154–158.

- Jordan M. A., Kamath K., Manna T., Okouneva T., Miller H. P., Davis C., Littlefield B. A., Wilson L. (2005) The Primary Antimiotic Mechanism of Action of the Synthetic Halichondrin E7389 is Suppression of Microtubule Growth. *Molecular Cancer Therapy*, 4: 1.086-1.095.
- Jung W. K., Ahn Y. W., Lee S. H., Choi Y. H., Kim S. K., Yea S. S., Choi I., Park S. G., Seo S. K., Lee S. W., Choi I. W. (2009) *Ecklonia cava* Ethanolic Extracts Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in bv2 Microglia Via the Map Kinase and nf-[kappa]b Pathways. *Food Chemical Toxicology*, 47: 410–417.
- Kang C., Jin Y. B., Lee H., Cha M., Sohn E. T., Moon J., Park C., Chun S., Jung E. S., Hong J. S., Kim S. B., Kim J. S., Kim E. (2010) Brown Alga *Ecklonia cava* Attenuates Tipe 1 Diabetes by Activating Ampk and Akt Signaling Pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 509-516; doi: 10.1016/j.fct.2009.11.004.
- Knapp H. R. y Fitzgerald G. A. (1989) The Antihypertensive Effects of Fish il. A Controlled Study of Polyunsaturated Fatty Acid Supplements in Essential Hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1.037–1.043.
- Kin K. Y., Nguyen T. H., Kurihara H., Kim S. M. (2010) Alpha-glucosidase Inhibitory Activity of Bromophenol Purified from the Red Alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of Food Science*, 75: H145-H150.
- Kirsten Benkendorff (2013) Natural Product Research in the Australian Marine Invertebrate Dicathais orbita. *Marine Drugs*, 11: 1.370-1.398; doi:10.3390/md11041370.
- Layé S. (2010) Polyunsaturated Fatty Acids, Neuroinflammation and Well Being. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 82: 295-303; doi: 10.1016/j.plefa.2010.02.006.
- Lee C. C. y Adler Al. (2012) Recent Findings on the Effects of Marine-Derived n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Urinary Albumin Excretion and Renal Function. *Current Atherosclerosis Reports*, 14: 535-541; doi: 10.1007/s11883-012-0279-3.
- Lee D. S., Jang J. H., Ko W., Kim K. S., Sohn J. H., Kang M. S., Ahn J. S., Kim Y. C., Oh H. (2013) PTP1B Inhibitory and Anti-Inflammatory Effects os Secondary Metabolites isolated from the Marine-derived Fungus *Penicillum* sp. JF-55. *Marine Drugs*, 11: 1.409-1.426; doi:10.3390/md11041409.
- Lee H. P., Huang S. Y., Lin Y. Y., Wang H. M., Jean Y. H., Wu S. F., Duh C. Y., Wen Z. H. (2013) Soft Coral-Derived Lemnalol Alleviates Monosodium Urate-Induced Gouty Arthritis in Rats by Inhibiting Leukocyte Infiltration and iNOS, COX-2 and c-Fos Protein Expression. *Marine Drugs*, 11: 99-113; doi:10.3390/md11010099.
- Lee S. H., Quian Z. J., Kim S. K. (2010) A Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Tuna Frame Protein Hydrolysate and its Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. *Food Chemistry*, 118: 96–102.
- Lim C. S., Jin D. Q., Sung J. Y., Lee J. H., Choi H. G., Ha I., Han J. S. (2006) Antioxidant and Anti-Inflammatory activities of the Methanolic Extract of *Neorhodomela* Aculeate in Hippocampal and Microglial Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 1.212–1.216.
- Lin Y. Y., Jean Y. H., Lee H. P., Chen W. F., Sun Y. M., Su J. H., Lu Y., Huang S. Y., Hung H. C., Sung P. J., Sheu J. H., Wen Z. H. (2013) A Soft Coral Compound, 11-epi-Sinulariolide Acetate Suppresses Inflammatory Response and Bone Destruction in Adjuvant-Induced Arthritis. *Plos One*, 8: e62926; doi: 10.1371/journal.pone.0062926.
- Linn Oftedal, Frode Selheim, Matti Wahlsten, Kaarina Sivonen, Stein Ove Døskeland, Lars Herfindal (2010) Marine Benthic Cyanobacteria Contain Apoptosis-Inducing Activity Synergizing with

- Daunorubicin to Kill Leukemia Cells, but not Cardiomyocytes. *Marine Drugs*, 8: 2.659-2.672; doi:10.3390/md8102659.
- Liu Y., Chen Y., Chen J., Zhang W., Sheng Q., Chen J., Yu W., Nie Z., Zhang Y., Wu W., Wang L., Indran I. R., Li J., Qian L., Lv Z. (2013) A shark liver gene-derived active peptide expressed in the silkworm, *Bombyx mori*: preliminary studies for oral administration of the recombinant protein. *Marine Drugs*, 11: 1.492-1.505; doi: 10.3390/md11051492.
- Loganzo F., Malathi Hari, Tami Annable, Xingzhi Tan, Daniel B. Morilla, Sylvia Musto, Arie Zask, Joshua Kaplan, Albert A. Minnick, Jr., Michael K. May, Semiramis Ayril-Kaloustian, Marianne S. Poruchynsky, Tito Fojo, Lee M. Greenberger (2004) Cells Resistant to HT-286 do not Overexpress P-glycoprotein but have Reduced Drug Accumulation and a Point Mutation in Alpha-tubulin. *Molecular Cancer Therapy*, 3: 1.319-1.327.
- Lombardi V. R. M., Fernández-Novoa L., Etcheverría I., Seoane S., Cacabelos R. (2004) Effects of Fish-Derived Lipoprotein Extracts on Activation Markers, Fas Expression and Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes. *International Immunopharmacology*, 5: 253-262.
- Lombardi V. R. M., Pereira J. A., Etcheverría I., Fernández-Novoa L., Seoane S., Cacabelos R. (2006) Improvement of Immune Function by Means of *Conger conger* Extract in an *In Vivo* Rat Model of Cold Stress. *Food and Agricultural Immunology*, 17: 115-127.
- Lombardi V. R. M. y Cacabelos, R. (1999) E-SAR-94010: A Marine Fish Extract Obtained by Advanced Biotechnological Methods. *Drugs of the Future*, 24: 167-176.
- Lombardi Valter R. M., Fernández-Novoa L., Etcheverría I., Seoane S., Cacabelos R. (2005) Studies on Immunological, Biochemical, Hematological and Growth Regulation by *Scomber scombrus* Fish Protein Extract Supplementation in Young Pigs. *Animal Science Journal*, 76: 159-170.
- Lordan S, Ross R. P., Stanton C. (2011) Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*, 9: 1.056-1.100; doi: 10.3390/md9061056.
- MacLean C. H., Issa A. M., Newberry S. J., Mojica W. A., Morton S. C., Garland R. H, Hilton L. G., Traina S. B., Shekelle P. G. (2005) Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cognitive Function With Aging, Dementia, and Neurological Disease. Evidence report/technology assessment. 114: 1-3.
- Moore K. S., Wehrli S., Roder H., Rogers M., Forrest Jr J. N., McCrimmon D., Zasloff M. (1993) Squalamine: an Aminosterol Antibiotic from the Shark. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 1.354-1.358.
- Morris M. C., Evans D. A., Tangney C. C., Bienias J. L., Wilson R. S., Aggarwal N. T., Scherr P. A. (2005) Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81:508-514.
- Natori T., Morita M., Akimoto K., Kozuka Y. (1994) Agelasphins, Novel Antitumor and Immunostimulatory Cerebrosides from the Marine Sponge *Agelas mauritianus*. *Tetrahedron*, 50: 2.771-2.784.
- Ohkawa Y., Miki K., Suzuki T., Nishio K., Sugita T., Kinoshita K., Takahashi K., Koyama K. (2010) Antiangiogenic Metabolites from a Marine-Derived Fungus, *Hypocrea vinosa*. *Journal of natural products*, 73 (4): 579-582.
- Pérez-Jimenez F. (2005) International Conference on the Healthy Effect of Virgin Olive Oil. *Eur. J. Clin. Invest.* 35: 421-424.

- Pettit G. R., Kamano Y., Herald C. L., Tuinman A. A., Boettner F. E., Kizu H., Schmidt J. M., Baczynskyj L., Tomer K. B., Bontems R. J. (1987) The Isolation and Structure of a Remarkable Marine Animal Antineoplastic Constituent: Dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society*, 109: 6.883-6.885.
- Pettit G. R., Kamano Y., Dufresne C., Cerny R. L., Cherry L. (1989) Isolation and Structure of the Cytostatic Linear Depsipeptide Dolastatin 15. *Journal of the American Chemical Society*, 111: 6.005-6.006.
- Rinehart K. L. (2000) Antitumor Compounds from Tunicates. *Medicinal Research Reviews*, 20: 1-27.
- Rota C., Rimbach G., Minihane A. M., Stoecklin E., Barella L. (2005) Dietary Vitamin E Modulates Differential Gene Expression in the Rat Hippocampus: potential Implications for its Neuroprotective Properties. *Nutritional Neuroscience*, 8:21-29.
- Sambamurti K., Granholm A. C., Kindy M. S., Bhat N. R., Greig N. H., Lahiri D. K., Mintzer J. E. (2004) Cholesterol and Alzheimer's Disease: Clinical and Experimental Models Suggest Interactions of Different Genetic, Dietary and Environmental Risk Factors. *Current Drug Targets* 5: 517-528.
- Sawadogo W. R., Schumacher M., Teiten M.H., Cerella C., Dicato M., Diederich M. (2013) A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-Cancer Activity Reported in 2011. *Molecules*, 18: 3.641-3.673; doi:10.3390/molecules18043641.
- Schumacher M., Kelkel M., Dicato M., Diederich M. (2011) A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-Cancer Activity Reported in 2010. *Molecules*, 16: 5.629-5.646; doi:10.3390/molecules16075629.
- Sheu M. J., Chou P. Y., Lin W. H., Pan C. H., Chien Y. C., Chung Y. L., Liu F. C., Wu C. H. (2013) Deep Sea Water Modulates Blood Pressure and Exhibits Hypolipidemic Effects via the AMPK-ACC Pathway: An *in vivo* Study. *Marine Drugs*, 11: 2183-2202; doi:10.3390/md11062183.
- Shi D., Guo S., Jiang B., Guo C., Wang T., Zhang L., Li J. (2013) HPN, a Synthetic Analogue of Bromophenol from Red Alga *Rhodomela confervoides*: Synthesis and Anti-Diabetic Effects in C57BL/KsJ-db/db Mice. *Marine Drugs*, 11: 350–362; doi: 10.3390/md11020350.
- Shi D. Y., Xu F., He J., Li J., Fan X., Han L. J. (2008) Inhibition of Bromophenols Against PTP1B and Anti-hyperglycemic Effect of *Rhodomela confervoides* Extract in Diabetic Rats. *Chinese Science Bulletin*, 53: 2.476-2.479.
- Skeggs L. T., Jr., Kahn J. R., Shumway N. P. (1956) The Preparation and Function of the Hypertension-Converting Enzyme. *Journal Exp. Med.*, 103: 295–299.
- Soares D. G., Poletto N. P., Bonatto D., Salvador M., Schwartzmann G., Henriques J. A. (2005) Low Cytotoxicity of Ecteinascidin 743 in Yeast Lacking the Major Endonucleolytic Enzymes of Base and Nucleotide Excision Repair Pathways. *Biochemical Pharmacology*, 70: 59-69.
- Suárez Y., González L., Cuadrado A., Berciano M., Lafarga M., Muñoz A. (2003) A New Marine-Derived Compound, Induces Oncosis in Human Prostate and Breast cancer Cells. *Molecular Cancer Therapy*, 2: 863-872.
- Taboada C., Millán R., Míguez I. (2010) Composition, Nutritional Aspects and Effect on Serum Parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal Sci. Food Agric.*, 90: 445-449.
- Tarboletti G., Poli M., Dossi R., Manenti L., Borsotti P., Faircloth G. T., Brogginini M., D'Incalci M., Ribatti D., Giavazzi R. (2004) Antiangiogenic Activity of Aplidine, a New Agent of Marine Origin. *British Journal of Cancer*. 90: 2.418-2.424.

- Thomes P., Rajendran M., Pasanban B., Rengasamy R. (2010) Cardioprotective Activity of *Cladosiphon okamuranus* Fucoidan Against Isoproterenol Induced myocardial Infarction in Rats. *Phytomedicine*, 18: 52–57.
- Valenzuela B. A. y Sanhueza C., J. (2009) Aceites de Origen Marino; su Importancia en la Nutrición y en la Ciencia de los Alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 36: 246-257.
- Vink S. y Alewood, P. F. (2012) Targeting Voltage-Gated Calcium Channels: Developments in Peptide and Small-Molecule Inhibitors for the Treatment of Neuropathic Pain. *British Journal of Pharmacology*, 167: 970-989; doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02082.x.
- Wang J., Chen S., Xu S., Yu X., Ma D., Hu X., Cao X. (2012) In vivo Induction of Apoptosis by Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Associated with Down-Regulating STAT3/EGFR Signaling in Sarcoma 180 (S180) Xenografts-Bearing Mice. *Marine Drugs*, 10: 2.055-2.068. doi:10.3390/md10092055.
- Ying-Qing Wang y Ze-Hong Miao (2013) Marine-Derived Angiogenesis Inhibitors for Cancer Therapy. *Marine Drugs*, 11: 903-933; doi:10.3390/md11030903.
- Yokogawa K., Matsui-Yuasa I., Tamura A., Terada M., Kojima-Yuasa A. (2011) Inhibitory Effects of *Ecklonia cava* Extract on High Glucose-Induced Hepatic Stellate Cell Activation. *Marine Drugs*, 9: 2.793-2.808; doi: 10.3390/md9122793.
- Yuan J. P., Peng J., Yin K., Wang J. H. (2010) Potential Health-Promoting Effects of Astaxanthin: A High-Value Carotenoid Mostly From Microalgae. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54: 1–16.
- Zawadzki M., Janosch C., Szechinski J. (2013) Perna canaliculus Lipid Complex PCSO-524™ Demonstrated Pain Relief for Osteoarthritis Patients Benchmarked against Fish Oil, a Randomized Trial, without Placebo Control. *Marine Drugs*, 11: 1.920-1.935; doi:10.3390/md11061920.
- Zhang Z., Zhao M., Wang J., Ding Y., Dai X., Li Y. (2011) Oral Administration of Skin Gelatin Isolated from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Enhances Wound Healing in Diabetic Rats. *Marine Drugs*, 9: 696–711; doi:10.3390/md9050696.



Desarrollo de compuestos con actividad farmacológica a partir de productos naturales de origen marino

Valter Ruggero y Maria Lombardi

EuroEspes Biotecnología, Ebiotec S.A.

15165 Bergondo, A Coruña

biotecnologia1@ebiotec.com

Resumen

Explorando los océanos, muchos científicos han encontrado que son ricos en organismos que sintetizan poderosos agentes capaces de combatir muchas enfermedades. Algunos ejemplos están representados por la Didemna B, compuesto con potente actividad inmunomoduladora, o la Psammoplina A, la Ecteinascidina-743, la Halicondrina B o la Briostatina, todos ellos potentes inhibidores de crecimiento de células tumorales. Los primeros experimentos de búsqueda de organismos marinos se realizaron a principios de los años ochenta. La tecnología ha hecho grandes avances en la exploración de las profundidades del mar y las nuevas formas de vida se han descubierto en profundidades de hasta hace poco tiempo impensables. Alrededor del 75 por ciento de los medicamentos desarrollados por la industria farmacéutica son de origen natural. Entre los más conocidos, la aspirina (de la corteza de sauce), la morfina (de *Papaver somniferum*), la penicilina (hongos microscópicos), la artemisina (derivado de la planta Artemisia indicado contra la malaria). El reservorio privilegiado es la selva tropical del Amazonas, que produce el 50 por ciento de los principios activos utilizados en farmacología. Ahora bien, en este escenario se une otro: el mar. Considerando que la presencia en el mar de todos los organismos de la Tierra se estima alrededor del 90 por ciento, las posibilidades de encontrar un nuevo fármaco se multiplican por cinco. En esta revisión se analizarán algunos de los compuestos aislados y caracterizados a partir de organismos marinos y sus posibles aplicaciones en el campo del tratamiento farmacológico.

Introducción

Los preparados obtenidos de plantas terrestres se utilizan en el tratamiento de varias enfermedades humanas desde tiempos antiguos. En 1800, los primeros estudios de metabolitos secundarios obtenidos a partir de organismos vegetales demostraron que la flora terrestre es una rica fuente de fármacos (Nguyen et al., 2013, Savoia et al., 2012, Wink et al., 2012), útiles en el tratamiento de enfermedades mortales tales como cáncer (taxol) y las infecciones microbianas (penicilinas). Sin embargo, debido al desarrollo de la resistencia de ciertos patógenos para el tratamiento de drogas y falta de eficacia de la quimioterapia tradicional, los investigadores en el campo de la sustancias naturales rápidamente han dirigido su atención a los nuevos recursos de compuestos biológicamente activos, tales como plantas y organismos animales marinos (Gerwick et al., 2012, Mimouni et al., 2012, Ngo et al., 2012, Sager et al., 2010).

En los océanos viven millones de especies de plantas y animales distintos de la tierra; el medio ambiente marino, proporciona así una nueva área de investigación que ha atraído el interés de los científicos de diferentes disciplinas, tales como químicos orgánicos, bioquímicos, farmacólogos, biólogos y ecólogos. El desarrollo de las técnicas de buceo y más recientemente de los vehículos sumergibles ha permitido a partir de los años sesenta un acceso rápido a organismos que viven tanto en la superficie como a los que habitan en aguas profundas, lo que hace que estén disponibles para el análisis químico. Los estudios que se han llevado a cabo, en gran medida han demostrado que el medio marino es una fuente extraordinaria de nuevos metabolitos bioactivos.

Muchos compuestos de origen marino son estructuralmente complejos, se caracterizan por características funcionales únicas y poseen actividades biológicas notables. Esto es a veces debido a las condiciones extremas del hábitat, la falta de luz, la alta presión, las altas concentraciones iónicas, las variaciones de temperatura y baja disponibilidad de alimentos o espacio de hábitat restringido. La alta concentración de organismos que coexisten en un área limitada les hace muy competitivos y complejos. Los organismos desarrollan una serie de adaptaciones y comportamientos dirigidos a la protección de la especie tales como las estrategias de defensa por la depredación, de la proliferación de especies competitivas, es decir la supresión competitiva de presas móviles por ingestión (Derby y Aggio, 2011).

Las estrategias químicas de una especie hacen uso de la riqueza de las moléculas de su "metabolismo secundario" e incluye compuestos tales como terpenos, alcaloides, policétidos, péptidos, derivados del ácido shikímico, glicósidos, los esteroides y los metabolitos procedentes de diferentes vías biogénicas. Además, y sólo relativo el medio ambiente marino,

es relativamente común la presencia de átomos de halógeno, principalmente cloro y bromo, unidos con enlaces covalentes al esqueleto molecular, lo que es probablemente debido a su buena disponibilidad en el mar (Kim et al., 2012, Ohno et al., 2012, Suárez-Jiménez et al., 2012, Cabrita et al., 2010).

Dado que las condiciones de los océanos son tan diferentes, la química de los productos producidos por los organismos marinos es muy diversa. Además, mientras los recursos terrestres se consideran explorados desde el punto de vista de la farmacéutica y bioquímica, menos del 1% de las especies marinas existentes se han examinado sobre su uso farmacológico potencial (Russo et al., 2011).

Los océanos representan por lo tanto una fuente, aún sin explotar, de compuestos biológicamente activos, y también de nuevas vías bioquímicas aún desconocidas en patógenos que podrían tenerse en cuenta para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

La investigación llevada a cabo durante muchos años en la División de Biotecnología de Eurospes Biotecnología se enmarca en el campo del estudio de los metabolitos secundarios de origen marino; los estudios realizados han permitido la adquisición de informaciones sobre la química de algunas especies de invertebrados marinos presentes en distintos niveles de evolución que pertenecen al phyla Chordata (Subphylum Tunicata) y poríferos. En particular, superando los problemas asociados con la recolección del material biológico y su identificación, la investigación química se ha realizado en la especies *Clavelina phlegraea*, *Polyandrocarpa zorritensis* y *Axinella damicornis*, especies con un metabolismo secundario muy prometedor presentes en el Mediterráneo.

La disponibilidad de las modernas técnicas de cromatografía de aislamiento y purificación, el uso de métodos de purificación guiada mediante *screening* farmacológico, el uso de numerosas técnicas espectroscópicas para la investigación estructural, entre las que cabe mencionar la espectroscopía de masas y en especial modo la resonancia magnética nuclear (RMN), nos ha permitido aislar y caracterizar varios nuevos compuestos algunos de los cuales tienen actividad antitumoral interesante. Los resultados han sido objeto de publicaciones en prestigiosas revistas internacionales.

1. Productos naturales de origen marino

Un gran número de moléculas bioactivas aisladas de fuentes marinas han sido seleccionadas como candidatos prometedores para la evaluación preclínica extensa en el tratamiento de diferentes degeneraciones patológicas y algunos de ellos han pasando a la etapa de ensayos

clínicos para el tratamiento del cáncer. La mayoría de las moléculas naturales marinas son producidas por invertebrados como esponjas, corales, briozoos y ascidias y pertenecen a diferentes clases estructurales tales como poliéteres, terpenos, alcaloides, macrólidos, polipéptidos (Faulkner, 2002).

Los primeros agentes terapéuticos de origen marino se remontan al 1948, cuando Swift y Feeney aislaron los nucleósidos spongouridina (1) y spongotimidina (2) de la esponja *Tethya cripta* (Swift y Feeny, 1948). El desarrollo posterior de los análogos sintéticos ha proporcionado dos compuestos de relevancia clínica importante, la adenina arabinosil (Ara-A, 3), y la citosina arabinosil (Ara-C, 4), moléculas contra el cáncer para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y del linfoma no Hodgkin's (Bodey et al., 1969) (figura 1).

Una clase importante de macromoléculas de origen marino, que pertenecen principalmente a la clase estructural de los poliéteres, es un gran grupo de toxinas marinas entre las que podemos mencionar: la brevetoxina (5), aislada del dinoflagelado *Gymnodinium breve* (Risk et al., 1978), la ciguatoxina (6), un constituyente tóxico implicado en ciguatera (Yokoyama et al., 1988), la maitotoxina (7) aislada de *Gambierdiscus toxicus* (Domínguez et al., 2010) y el ácido okadáico (8), un agente que causa diarrea, presente en frutos de mar infectados, producido por especies de dinoflagelados, como *Prorocentrum lima* y *Dinophysis sp.* (Fusetani y Kem, 2009, Wang D.Z., 2008), y finalmente la palitoxina (9), un complejo polialcohol aislado del zoantide *Palythoa toxicus* (Baden et al., 2005) (figura 2).

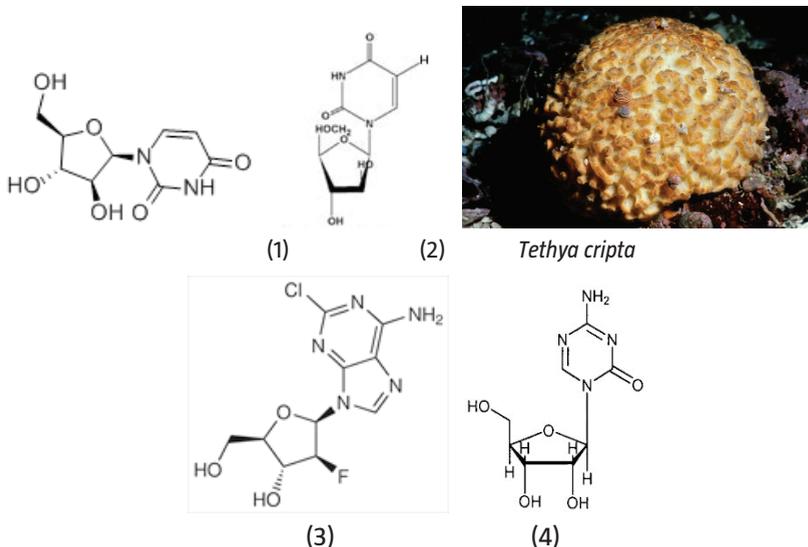


Figura 1. Estructura química de spongouridina (1) y spongotimidina (2) aislados de la esponja *Tethya cripta* y de los análogos sintéticos Ara-A (3) y Ara-C (4). Cortesía del Dr Austin (Canadá).

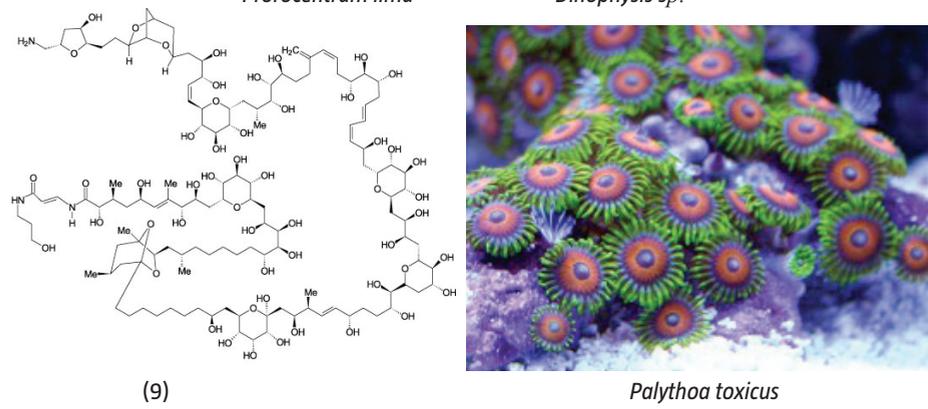
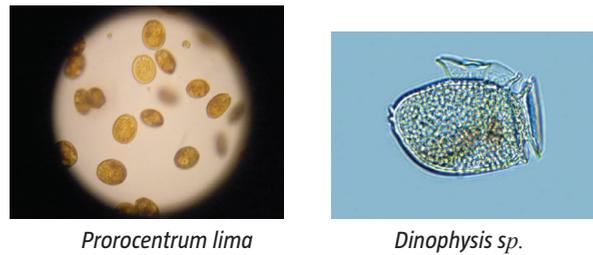
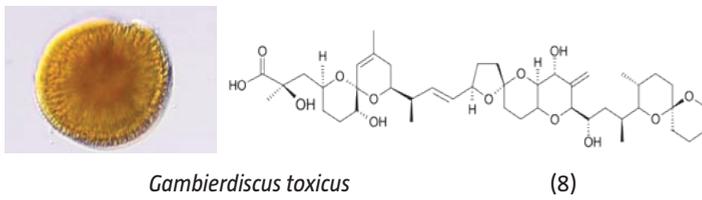
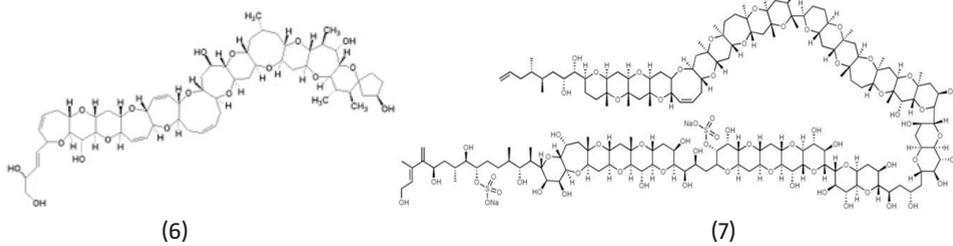
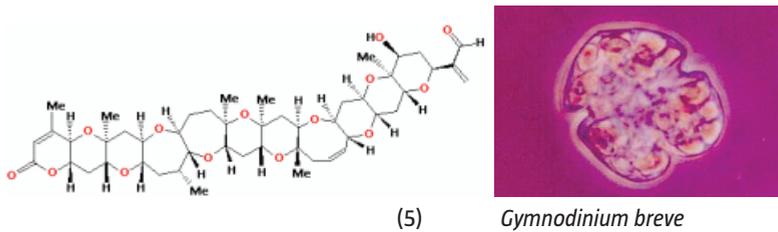
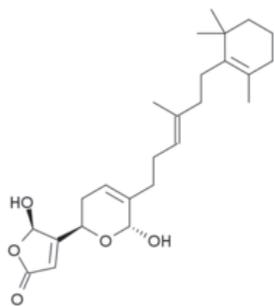


Figura 2. Estructuras químicas de brevetoxina (5) y ciguatoxina (6) aislados de *Gymnodinium breve*, mattoxina (7) aislada de *Gambierdiscus toxicus*, ácido okadáico (8) producidos por especies de dinoflagelados, como *Prorocentrum lima* y *Dinophysis sp.*, y palitoxina (9) aislado del zoantide *Palythoa toxicus*. Cortesía de Maurice Loir y Glass Reef



(10)

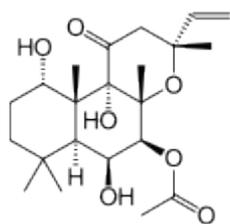
*Luffariella variabilis*

Figura 3. Estructura química de manolide (10) aislado de la esponja *Luffariella variabilis*.

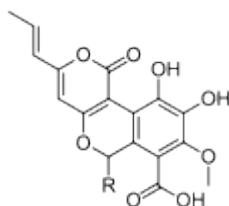
Otra clase estructural interesante es la de los terpenos y entre éstos hay que mencionar la manoalida (10). Este compuesto fue aislado a partir de la esponja *Luffariella variabilis* por el grupo de Scheuer y se le atribuyó una actividad antibiótica (Ebada et al., 2010, Gauvin-Biallecki et al., 2008, Zhou y Molinski, 2006) (figura 3).

Posteriormente, otros grupos (Perumal Samy et al., 2012, Monti et al., 2007) han determinado que este compuesto actúa como un potente inhibidor de la enzima fosfolipasa A2. Además, dos diterpenos glicosilados, la pseudopterosina A (11) y E (12) aislados de la gorgonia del Caribe *Pseudopteroorgia elisabethae*, han demostrado una prometedora actividad *in vitro* e *in vivo* como agentes antiinflamatorios (Correa et al., 2009, Coleman et al., 1999) (figura 4).

Las manzaminas pertenecen a una nueva clase de alcaloides aislados de esponjas y han atraído la atención como agentes antimaláricos. Cuatro compuestos de esta serie, la manzamina A (13), la 8-A hydroxymanzamina (14), su enantiómero (15), y el dímero de manzamina, la neo-kauluamina (16) tienen resultados alentadores en pruebas preliminares *in vivo* (Eguchi et al., 2013, Radwan et al., 2012, Peng et al., 2010) (figura 5).



(11)



(12)

*Pseudopteroorgia elisabethae*

Figura 4. Estructuras químicas de pseudopterosina A (11) y E (12) aislados de la Gorgona *Pseudopteroorgia elisabethae*.

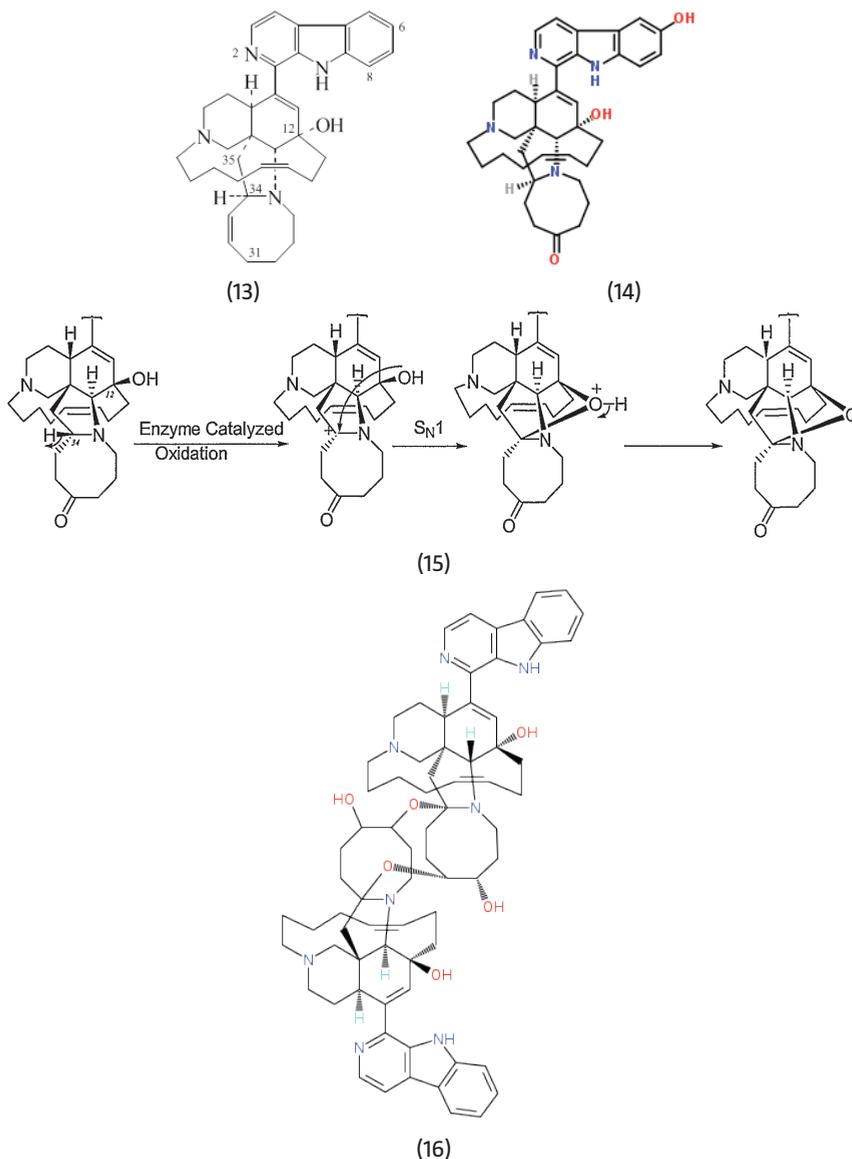


Figura 5. Estructuras químicas de manzamina A (13), 8-A hydroxymanzamina (14), su enantiómero (15), y de neo-kauluamina (16).

Otros metabolitos secundarios, que se han vuelto importantes como moléculas guía en el desarrollo de nuevos fármacos, son el macrólido swinholda A (Klenchin et al., 2005) (17), y su análogo (18) (Spector et al., 1999), capaces de unirse específicamente al sistema de la actina intracelular, que es una herramienta útil en el estudio de la función, organización y dinámica de la actina (figura 6).

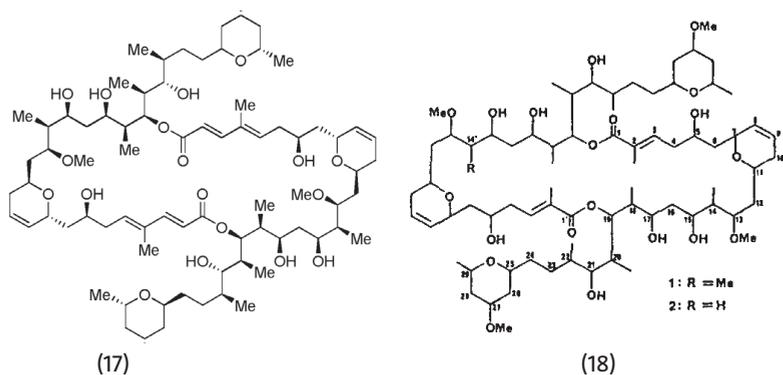


Figura 6. Estructuras químicas de swinholida A (17) y su análogo (18).

1.1. Productos naturales marinos con actividad antitumoral

Uno de los objetivos principales de la investigación en el campo de las sustancias naturales de origen marino ha sido el descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer; en la actualidad, un gran número de metabolitos derivados de organismos marinos están en fase de estudio preclínico y clínico para el tratamiento de tumores. Recientemente han sido publicado estudios sobre el uso de anticancerígenos derivados de diferentes productos marinos naturales, una aportación que informa, entre otras cosas, de la diversidad química que ofrece el hábitat marino (Kalimuthu y Se-kwon, 2013, Sarwedogo et al., 2013, Lourenço et al., 2012, Suárez-Jiménez et al., 2012, Kim et al., 2011, Lordan et al., 2011) (ver tabla 1).

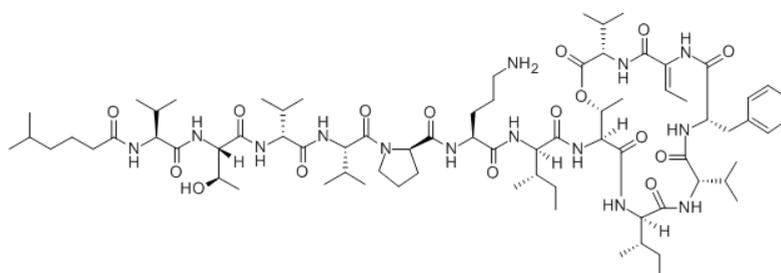
Organismo	Grupo	Metabolito	Localización
<i>Trididemnum soldium</i>	Tunicate	Didemnin B	Caribbean
<i>Bugula neritina</i>	Bryozoa	Bryostatin 1	Gulf of California
<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Tunicate	Ecteinascidin-743	Caribbean
<i>Halichondria okadai</i>	Sponge	Halichondrin B	Okinawa
<i>Dolabella auricularia</i>	Sea hare	Dolastatin 10	Indian Ocean
<i>Portieria hornemannii</i>	Red alga	Halomon	Phillipines
<i>Aplidium albicans</i>	Tunicate	Aplidine	Mediterranean
<i>Aplysia kurodai</i>	Sea hare	Aplyronine A	Japan
<i>Elysia rubefescens</i>	Mollusc	Kahalalide F	Hawaii
<i>Mycale sp.</i>	Sponge	Mycaperoxide B	Thailand
<i>Micromonospora marina</i>	Actinomycete	Thiocoraline	Mozambique Strait
<i>Ascidian didemnum Granulatum</i>	Tunicate	Granulatimide	Brazil

Tabla 1. Agentes antitumorales de origen marino

1.1.1. Kahalalida F

Las kahalalidas son una serie de péptidos citotóxicos aislados de la *Elysia rufescens*, un molusco de Hawaii (Salazar et al., 2013). Durante la recolección de estos moluscos herbívoros para una evaluación química, se observó que la *E. rufescens* se alimenta de unas algas verdes, perteneciente a la especie *Bryopsis*. La posterior recogida del alga y la purificación de sus componentes activos mostraron que la *Bryopsis* poseía una sustancia química idéntica a la aislada por la *E. rufescens*, incluyendo el Kahalalide F (19) (figura 7).

Los estudios preclínicos han demostrado que la Kahalalida F (19) posee una selectividad hacia diferentes líneas celulares de tumores sólidos. Los datos de toxicidad han indicado también que las altas concentraciones de este compuesto son tóxicos para las neuronas del sistema nervioso central, lo que sugiere un uso potencial para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer como el neuroblastoma.



(19)

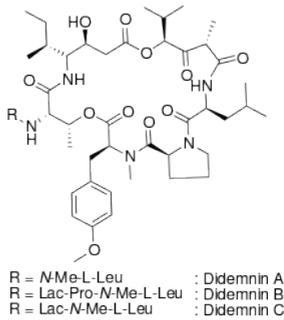


Elysia rufescens

Figura 7. Estructura química de Kahalalida F(19), aislada del molusco *Elysia rufescens*. Cortesía de Philibert Bidgrain (Vie Océane).

1.1.2. Didemnina B

La didemnina B (20), un depsipéptido cíclico aislado del tunicado caribeño *Trididemnum solidum* (Lee et al., 2012), fue el primer producto marino en entrar en los estudios clínicos como agente antitumoral (Tsukimoto et al., 2011) (figura 8).



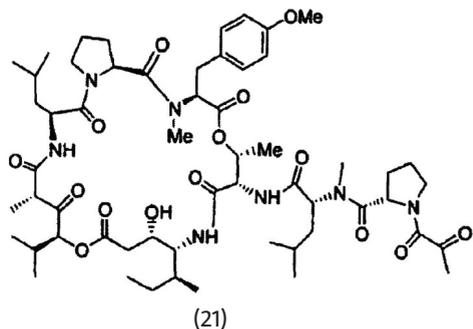
(20)

Trididemnum solidum

Figura 8. Estructura química de didemnina B (20), aislado del tunicado *Trididemnum solidum*.

Partiendo de la base de un fuerte parecido estructural de las didemninas a los metabolitos pertenecientes al grupo de las cianobacterias, Rinehart ha teorizado que estas potentes citotoxinas derivan probablemente de cianobacterias simbióticas que viven en asociación con el tunicado (Rinehart K.L., 2000). La didemnina B (20) ha demostrado actividad antitumoral contra varios modelos de tumores y se ha estudiado en ensayos clínicos Fase II para el tratamiento del cáncer de mama, ovarios, cuello uterino, así como el mieloma, glioblastoma, astrocitoma, y cáncer de pulmón. Además, la didemnina B (20) posee diversas actividades *in vitro*, aunque con potencias que varían ampliamente (>5 órdenes de magnitud) (Vera y Joullié, 2002), lo que sugiere que las actividades están reguladas por diferentes mecanismos. La didemnina B (20) inhibe la síntesis de ARN, ADN y proteínas y se une de una manera no competitiva a la palmitoil-proteína tioesterasa. Además, la rapamicina inhibe la apoptosis inducida por didemnina en células humanas HL60, sugiriendo la activación de la vía apoptótica FK-506; probablemente la didemnina B modula la actividad del FK-506 en la unión con las proteínas como parte de su proceso inmunomodulador y por lo tanto conduce a la muerte celular a través de apoptosis. A pesar de la variedad de protocolos de tratamiento y la evaluación contra diferentes tipos de cáncer, el compuesto 20 ha resultado ser demasiado tóxico para su uso, con la interrupción de los estudios clínicos por parte del "National Cancer Institute" en 1990. La experiencia obtenida con estos estudios condujo a la síntesis de moléculas similares estrechamente relacionados, como la aplidina (21) (Barboza et al., 2012).

De manera similar a la didemnina B (20), la aplidina (21) interfiere con la síntesis de ADN y las proteínas e induce la detención del ciclo celular (Morande et al., 2012) (figura 9).



(21)
Figura 9. Estructura química de aplidina (21).

La apilidina (21) posee un único mecanismo de citotoxicidad que implica la inhibición de la ornitina descarboxilasa, una enzima crítica en el proceso del crecimiento del tumor y la angiogénesis. Además, la apilidina (21) bloquea la síntesis proteica en la etapa de elongación polipeptídica (Rockwell y Lin, 2010). Este derivado sintético ha demostrado ser, en la fase preclínica, más activo de la didemnina B (20) y ha resultado ser activo frente a diversos modelos de tumores sólidos (Salazar et al., 2011, Mateos et al., 2010), incluyendo cánceres que eran resistentes a la didemnina B (20).

1.1.3. Psammaplina A

El aislamiento inicial de la psammaplina A (22) de varias esponjas verongidas pertenecientes al género *Psammaplysilla* se ha reportado simultáneamente por parte de varios grupos de investigación (Laport et al., 2009, Pham et al., 2000, Jung et al., 1995). La psammaplina A (22), una bromotirosina disulfuro simétrico que presenta grupos de oximas, tiene una potente citotoxicidad contra las células P388 (IC₅₀ de 0,3 Qg/ml) y coexiste con un metabolito dimérico, la biprasina (23) (Bend et al., 2013, Pereira et al., 2012, Ahn et al., 2008) (figura 10).

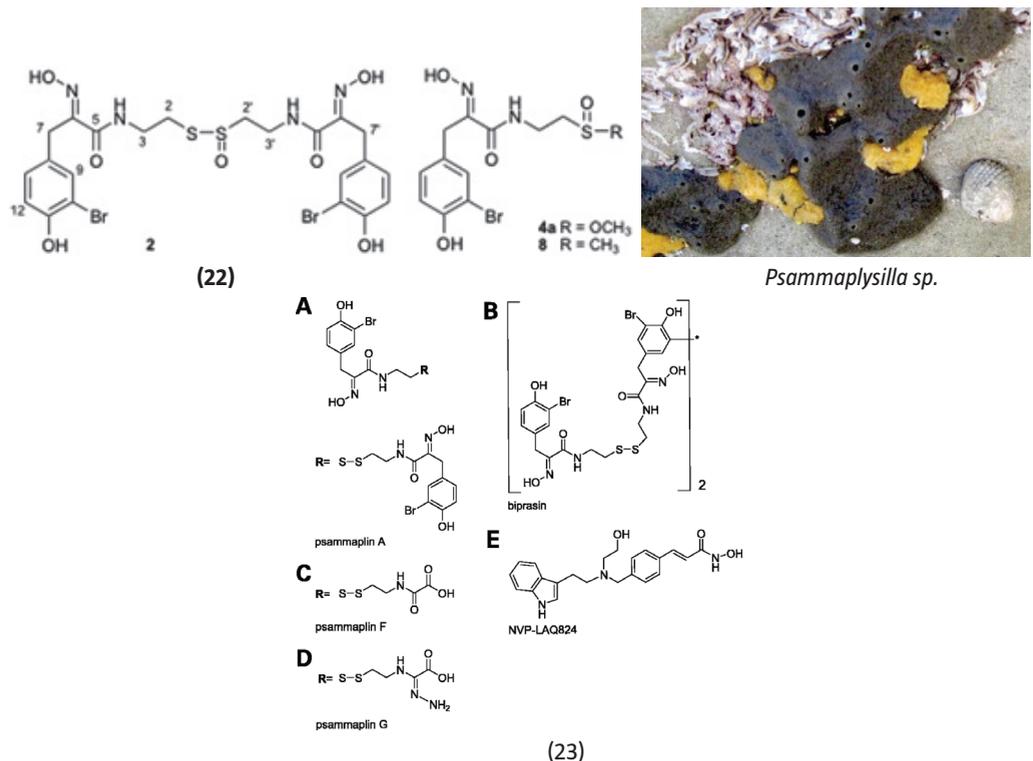


Figura 10. Estructura química de psammaplina A (22) aislada de varias esponjas perteneciente al género *Psammaplysilla* y de biprasina (23).

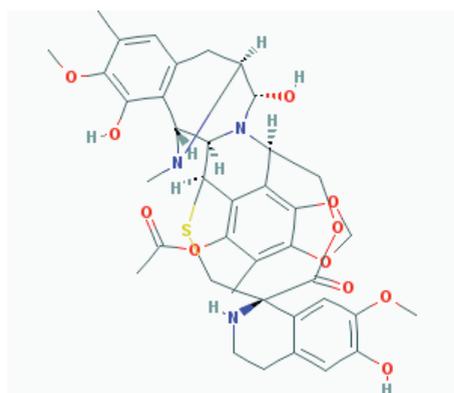
Se han aislado posteriormente psammaplinas adicionales, incluyendo varios derivados sulfatados y salificados (psammmmaplinas B-L) y la prepsammaplina A. Muchos de estos compuestos tienen una potente actividad antibacteriana. El hecho de que las psammaplinas hayan sido aisladas de diversas esponjas y que los aminoácidos aromáticos bromados derivados sean comunes en las bacterias marinas, sugiere que estos metabolitos realmente pueden proceder de las vías biosintéticas de los microorganismos que viven en asociación con las esponjas.

Las psammaplinas han sido probadas recientemente como inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT) y la histona deacetilasa (HDAC) (Baud et al., 2013) y se ha comprobado que son inhibidores de ambas enzimas probadas, resultado que representa un logro significativo a la luz de la posible relación entre DNMT y HDAC como modificadores epigenéticos de la actividad de genes supresores de tumores. Además, la psammaplina F (23) es un inhibidor selectivo de HDAC, mientras que la psammaplina G (23) es un inhibidor selectivo de la DNMT. La psammaplina A (22) es capaz de inhibir la topoisomerasa II y la N- aminopeptidasa, con supresión de la angiogénesis *in vitro* (Kim H.J. et al., 2012). Sin embargo, la inestabilidad fisiológica de la clase de la psammaplinas ha impedido el desarrollo clínico directo.

1.1.4. Ecteinascidina-743

Recientes estudios realizados con organismos marinos para la búsqueda de propiedades antitumorales han demostrado una potente actividad citotóxica en extractos acuosos del tunicado caribeño *Ecteinascidia turbinata*. Las estructuras moleculares de los alcaloides contenidos en los extractos y posteriormente aislados y caracterizados, se han encontrado en los complejos tetrahidroisoquinolonas (Izbicka et al., 1999, Lansiaux y Bailly, 1999). La Ecteinascidina-743 (24) es el metabolito principal y, aunque *in vivo* es menos potente de su análogo N-desmetilado (JET-729), su citotoxicidad (IC₅₀ = 0,5 ng / ml vs células L1210 de leucemia), su estabilidad y su abundancia relativamente alta en la naturaleza la han hecho más adecuada para el desarrollo clínico (figura 11).

La recogida a gran escala, la acuicultura y los esfuerzos sintéticos (Cuevas y Francesch, 2009) han conducido al desarrollo de una semi síntesis de ET-743 a partir de cianosafracina B, el compuesto obtenido en cantidades significativas por fermentación de la bacteria marina *Pseudomonas fluorescens*. La estructura de la ecteinascidina (26) coincide con la de una fuente microbiana natural, y, de hecho, hay dos patentes para bacterias simbióticas del tunicado *E. turbinata*.



(24)



Ecteinascidia turbinata

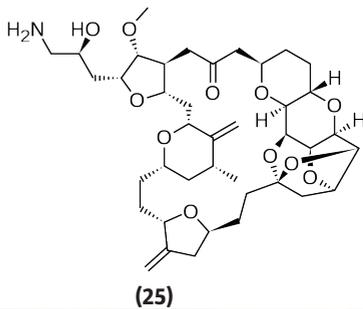
Figura 11. Estructura química de Ecteinascidina-743 (24) metabolito principal aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata*.

1.1.5. Halicondrina B

Las halicondrinas se aislaron por primera vez a partir de la esponja japonesa *Halichondria okadai* por Ohno y colaboradores y su estructura ha sido determinada por cristalografía de rayos X (Ohno et al., 2011). Sucesivamente fueron aislados la halicondrina B (25) y algunos análogos naturales a partir de una serie de esponjas, incluyendo *Lissodendoryx carteri* sp. *Phakellia* sp. y *Axinella* sp. y esto sugiere que este tipo de esqueleto puede construirse en asociación con microorganismos. Diferentes estudios han examinado después el mecanismo de la toxicidad celular, y se ha descubierto que las halicondrinas son potentes inhibidores de la tubulina, que se unen de forma no competitiva al sitio de la unión del dominio de la Vinca y causan una característica detención del ciclo celular en la fase G2-M con una destrucción concomitante del proceso de la mitosis (Matsumoto et al., 2012, McBride y Butler, 2012). Debido a su excelente actividad biológica en matar las células tumorales y de su gran complejidad estructural, las halicondrinas se han convertido rápidamente en uno de los objetivos principales de la síntesis química. La primera síntesis total se completó en 1990. El grupo de Kishi (Kaburaji y Kishi, 2007) se ha centrado en la síntesis de estructuras similares más sencillas de la halicondrina capaces de mantener o aumentar sus actividades biológicas, y esto ha llevado al descubrimiento de la molécula de E7389 (26) (figura 12).

1.1.6. Dolastatina 10

A principio de 1990 Bai y sus colaboradores han descubierto las propiedades extremadamente potentes de extractos obtenidos de la liebre de mar *Dolabella auricularia* (Bai et al., 1990). Sin embargo, debido a las pequeñas cantidades del principio activo (~ 1,0mg/100 kg de



Halichondria okadai



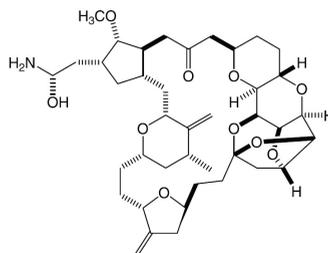
Lissodendoryx carteri sp.



Phakellia sp.



Axinella sp.



E7389

(26)

Figura 12. Estructura química de Halicondrina B (25) aislado de diferentes especies de esponjas: *Halichondria okadai*, *Lissodendoryx carteri* sp., *Phakellia* sp. y *Axinella* sp y da la molécula E7389 sintetizada a partir de la estructura de la halicondrina.

organismos recolectados), la identificación estructural de dolastatina 10 (27) ha requerido unos quince años en completarse. Las escasas concentración de estos compuestos en la liebre de mar indican las cianobacterias como origen de este metabolito secundario bioactivo (Adams et al., 2008), y de hecho esto ha sido confirmado por el aislamiento de la dolastatina directamente de la cianobacteria marina *Symploca* (figura 13).

La dolastatina 10 (27) es un pentapéptido con cuatro residuos aminoácidos hasta ahora estructuralmente únicos (dolavalina, dolaisoleucina, dolaprolina y dolafenilalanina), además de valina. En el momento de su descubrimiento, se identificó como el agente antiproliferativo más activo conocido con ED50 = 4,6 x 10-5Qg / mL contra las células leucémicas PS de ratón (Luesch et al., 2002). Posteriormente, la dolastatina 10 (27) ha demostrado ser un inhibidor

no competitivo del alcaloide de la vinca que se une a la tubulina (Ki 1,4 QM), y que influye fuertemente en el ensamblaje de microtúbulos y de la hidrólisis de GTP tubulina-dependiente (Bai et al., 1990). Estudios posteriores han revelado que la dolastatina 10 (27) se une a sitios que se unen a la rhizoxina y a la maytansina (Iwasaki, 1998) (adyacente al sitio de unión del alcaloide de la vinca), así como el sitio de intercambio de GTP sobre la tubulina, causando detención del ciclo celular en metafase. La dolastatina 10 (27) entró en ensayos clínicos de Fase I en 1990 por el "National Cancer Institute" (Pitot et al., 1999) y sucesivamente en estudios de fase II. Desafortunadamente, se eliminó de los ensayos clínicos como agente único, debido al desarrollo de una moderada neuropatía periférica observada en el 40% de los pacientes (Margolin et al., 2001) y por actividades insignificantes en pacientes con adenocarcinoma (Vaishampayan et al., 2000) refractario a las hormonas y a un carcinoma recurrente de ovarios sensible platino. Sin embargo, la dolastatina 10 (27) representa un punto válido de partida para los estudios SAR y el diseño de nuevas drogas sintéticas, las cuales en última instancia han llevado a la síntesis del análogo TZT-1027 (28) (figura 13).

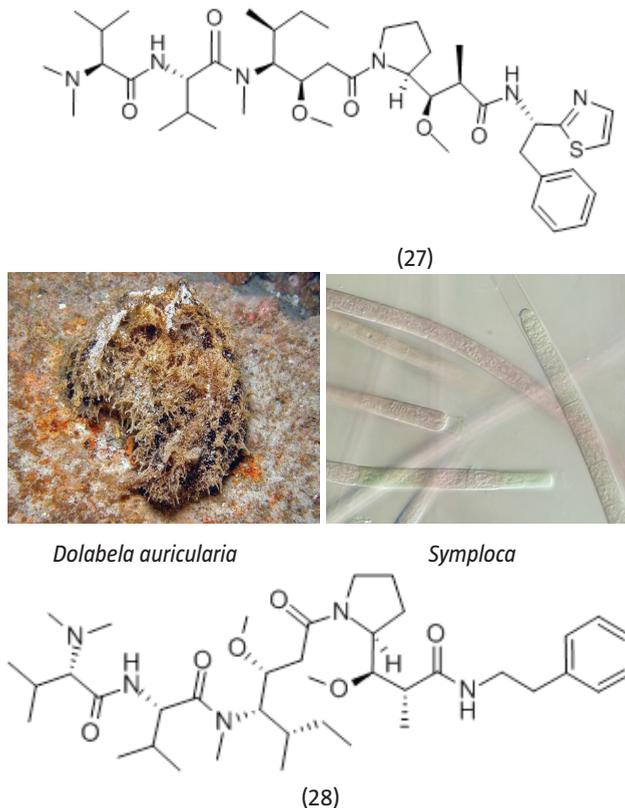


Figura 13. Estructura química de Dolastatina 10 (27) aislada de *Dolabela auricularia* y de la cianobacteria *Symploca* y de su análogo sintético TZT-1027 (28). Cortesía de David Harasti (www.daveharasti.com)

1.1.7 Dolastatina 15

La dolastatina 15 (29), ha sido aislada a partir de extractos de liebre de mar *Dolabella auricularia* del Océano Índico (Bai et al., 1992) (6,2 mg a partir de 1600 kg del organismo), lo que claramente implica un origen, para este metabolito, de cianobacterias. De hecho, muchos péptidos relacionados con la dolastatina 15 (29), se aislaron a partir de cianobacterias marinas. La secuencia lineal del depsipéptido se compone de siete residuos hidroxilos o amínicos. Las pruebas han demostrado que, en contraste con la dolastatina 10 (28), la dolastatina 15 (29) se une directamente al dominio de la vinca de la tubulina. Las dificultades para la posterior evaluación clínica de dolastatina 15 (29), incluyen la complejidad y el bajo rendimiento de sus derivados sintéticos, así como su baja solubilidad en agua. Sin embargo, varios intentos han llevado al desarrollo de ciertos análogos sintéticos con propiedades químicas más acentuadas, entre los que cabe mencionar la cematodina y el sintatodina (Pettit et al., 1998) (figura 14).

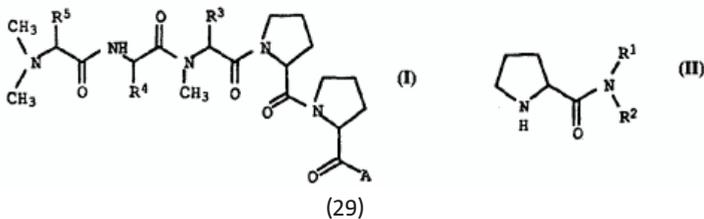
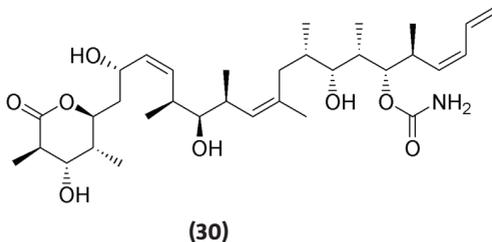


Figura 14. Estructura química de Dolastatina 15 (29) aislada de *Dolabella auricularia*.

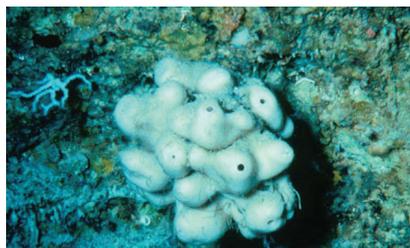
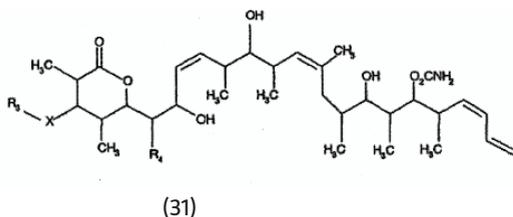
1.1.8. (+)-Discodermolida

Espojas del género *Theonella* son una fuente rica de péptidos inusuales que poseen actividades biológicas interesantes tales como antibacteriana, de inhibición enzimática, antifúngica y anti-HIV (Kingston, 2011). El Nagahamide A (30), un metabolito con propiedades antibacterianas aisladas de la esponja *Theonella swinhoei* es un depsipéptido con siete residuos que contienen tres aminoácidos poco comunes y una parte poliquetídica (Okada et al., 2002) (figura 15).



Theonella swinhoei

Figura 15. Estructura química de Discodermolida (30) aislada de la esponja *Theonella swinhoei*.



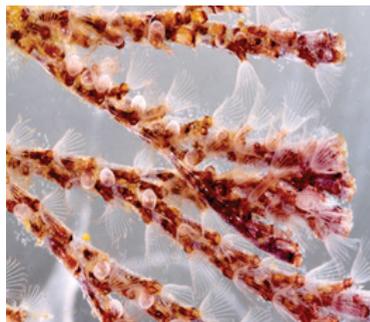
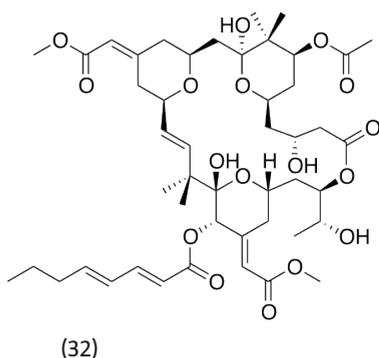
Discodermia dissoluta

Figura 16. Estructura química de (+)-Discodermolida (31) aislada de la esponja *Discodermia dissoluta*.

Otro ejemplo de metabolito es la citotoxina (+)-discodermolida (31) aislada de la esponja *Discodermia dissoluta* que ha resultado ser un poderoso agente inmunosupresor y un inductor de la polimerización de la tubulina (Klein et al., 2005). El descubrimiento fue realizado por investigadores del Harbor Branch Oceanographic Institute, y la licencia de la molécula ha sido vendida a Novartis Pharmaceutical Corporation en 1998 para ulteriores investigaciones. La investigación posterior se ha centrado en la preparación y la evaluación de los análogos naturales y sintéticos para obtener síntesis más eficientes y una mejor comprensión de las relaciones estructura-actividad dentro de esta clase estructuralmente nueva de antimitóticos (figura 16).

1.1.9. Briostatina

Entre los más prometedores productos naturales bioactivos debe mencionarse la briostatina 1 (32), un policétido aislado del briozoo *Bugula neritina* en 1970 (Davidson y Haygood, 1999) (figura 17).



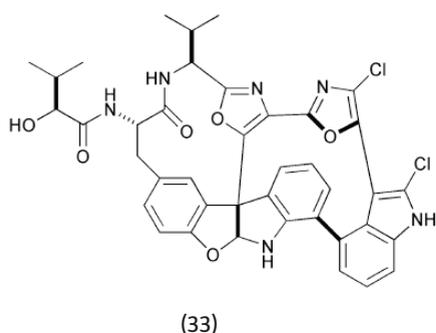
Bugula neritina

Figura 17. Estructura química de briostatina 1 (32) aislado del briozoo *Bugula neritina*. Cortesía de Lovell and Libby Langstroth © California Academy of Sciences

La briostatina 1 (32) se encuentra actualmente en la fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de diversas leucemias, linfomas, melanomas, y algunos tumores sólidos (Abraham et al., 2012, Boger, 2012). La investigación reciente ha demostrado que este macrólido citotóxico puede tener un uso potencial en el tratamiento de cáncer de ovario y de mama y también es capaz de aumentar la supervivencia de los linfocitos en pacientes sometidos a radioterapia.

1.1.10. Diazonamida A

Incluso las ascidias han sido una gran fuente de nuevos productos naturales bioactivos. Estudios recientes sobre la diazonamida A (33) (Knowles et al., 2011), aislado de la ascidia marina *Diazona angulata*, han puesto de manifiesto que el compuesto (33) provoca la detención del crecimiento celular en la fase de la mitosis (figura 18).



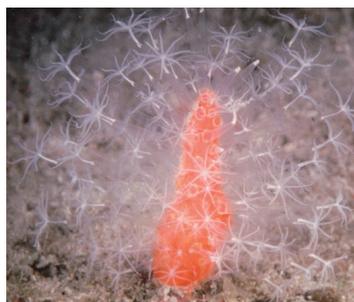
Diazona angulata

Figura 18. Estructura química de diazonamida A (33) aislado de *Diazona angulata*.

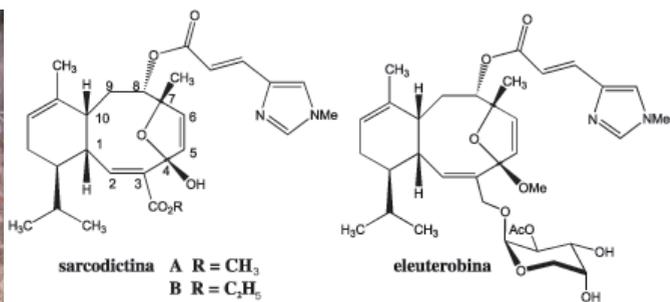
Tanto la diazonamida A (33) como el análogo oxigenado son potentes inhibidores de ensamblaje de los microtúbulos, de una manera equivalente a la dolastatina 10 y de manera más potente a la dolastatina 15.

1.1.11. Eleuterobina

En 1993, frente a la costa noreste de Australia, fue identificado un nuevo coral blando, *Eleutherobia albicans*, el producto bioactivo aislado de este organismo, el eleuterobina (34), ha demostrado ser una de las citotoxinas más potentes descubiertas hasta ahora, con la capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de células tumorales con una IC₅₀ en el orden de 10-15 nM (Long et al., 1998) (figura 19).



Eleutherobia albicans



(34)

Figura 19. Estructura química de eleuterobina (34) aislado de *Eleutherobia albicans*.

2. Tunicados

Los cordados (Chordata, Bateson 1885) son un phylum de animales que comprenden organismos de diversa forma y complejidad (figura 20).

El phylum Chordados se divide en tres subphyla:

- Urocordados (o Tunicados)
- Cefalocordados
- Vertebrados

Entre los invertebrados, los Tunicados son el grupo más representativo y se componen de pequeños organismos marinos y filtradores sésiles, con larvas planctónicas, que al fijarse al sustrato, llegan a la etapa adulta, desarrollando una forma de bolsa cubierta por una capa protectora llamada túnica. Esta consistencia gelatinosa o correosa está constituida por una sustancia de naturaleza fibrosa secretada a través de la epidermis, la tunicina, un polisacárido que tiene la misma composición química de la celulosa. La túnica tiene textura y grosor diferente en las distintas clases y órdenes. Debajo de la túnica se encuentra el cuerpo cuyas células se organizan, a diferencia de los poríferos, en los tejidos y órganos diferenciados; De hecho, se destacan un sistema nervioso, digestivo, respiratorio y sistema cardiovascular, aunque bastante primitivos.

Desde un punto de vista evolutivo, los tunicados representan los invertebrados más avanzados y se dividen en tres clases (figura 21):

- Ascidiáceos
- Larváceos
- Taliáceos

Sólo las especies que pertenecen a la clase de las ascidias presentan junto a la fase pelágica también una bentónica. Esto se refleja en una mayor facilidad de recolección y hace que

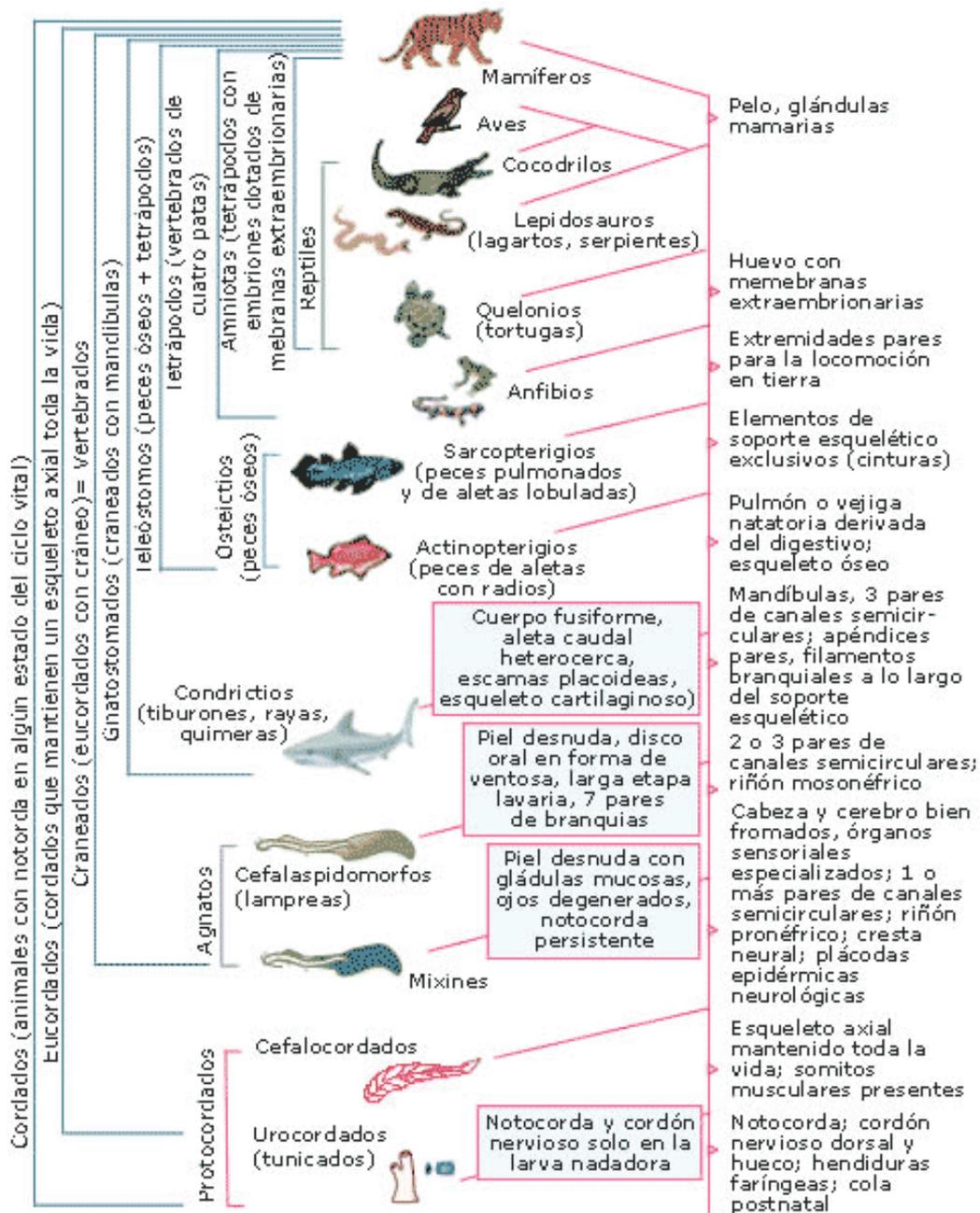


Figura 20. Árbol filogenético de los cordados.

las ascidias sean, con diferencia, los tunicados más estudiados. Se distribuyen entre algunos metros por debajo del nivel del mar hasta los 200-300 metros de profundidad, pero es sobre todo en los primeros 100 m que se encuentra el mayor número de especies e individuos. Al ser típicos organismos filtradores, están presentes sobre todo en ambientes ricos en material suspendido.

2.1. Clavaminoles a partir de *Clavelina phlegraea*

El amplio estudio de algunos ejemplares de la ascidea *Clavelina phlegraea* ha permitido el aislamiento de doce nuevos aminoalcanoles que han sido caracterizados completamente. Los ensayos para evaluar la actividad biológica de los nuevos metabolitos han indicado que algunos de estos compuestos son capaces de modular la proliferación de algunas líneas celulares tumorales (Aiello et al., 2007) (figura 22).

2.1.1. Aminoalcanoles

Los derivados de los 2-amino-alcanoles están comúnmente presentes en la estructura de las esfingosinas anfipáticas, el elemento central de los esfingolípidos; la longitud de su cadena de carbonos varía desde C12 a C30, y también hay variantes poliinsaturadas. Las ascidias del género *Pseudodistoma* y *Clavelina* han demostrado ser una extraordinaria fuente rica de 2-amino-3-hidroxi-hidrocarburos; ejemplos son crucigasterinas 225, 275 y 277 y los obscuraminoles A-F, 2-amino-3 - alcanoles insaturadas y poliinsaturadas aislados, como sus derivados diacetilados, respectivamente, de las ascidias presentes en el mar Mediterráneo *Pseudodistoma crucigaster* y *Pseudodistoma obscurum* (figura 22).



Figura 21. Imágenes de tunicados.



Clavelina phlegraea



Clavelina phlegraea



Pseudodistoma crucigaster



Pseudodistoma obscurum

Figura 22. Ascidas presentes en el mar Mediterráneo.

2.2. Estudios con fracciones de *Clavelina phlegraea*

Una muestra de *Clavelina phlegraea* fue recogida a lo largo de las costas de la región de Campania por un grupo de investigadores de la estación zoológica Anton Dohrn de Nápoles. Esta ascidia, que se puede encontrar hasta 50 m de profundidad, tiene una túnica transparente que revela una faringe bastante grande con 8-12 pares de hendiduras faríngeas soportadas por un esqueleto de quitina. El ejemplar de *Clavelina phlegraea* recogido a lo largo de las costas napolitanas se mantuvo congelado hasta su utilización. El procedimiento de aislamiento se muestra esquemáticamente en la figura 23.

Una vez obtenidas las fracciones de los clavaminoles, estas fueron enviadas liofilizadas al laboratorio Ebiotec para los ensayos *in vitro*.

2.2.1. Cultivo primario de neuronas corticales.

Los métodos de obtención, disociación y mantenimiento en cultivo primario de neuronas corticales utilizados en el trabajo experimental con las fracciones están ampliamente descritos en la bibliografía (Choi et al., 2013, Durafourt et al., 2013, Shi et al., 2013).

2.2.1.1. Obtención de las células.

Antes de comenzar la disociación hubo que tratar las placas de cultivo con poli-lisina para mejorar la adherencia de las células a su superficie (Giordano et al., 2011). Las células se obtuvieron a partir de fetos de rata Sprague-Dawley, de 17 días de gestación. Para ello, se sacrificó la rata por decapitación y se extrajeron los fetos. Se lavaron en el buffer de lavado (NaCl 150mM; Na₂HPO₄·2H₂O 8mM; KCl 2,7mM;

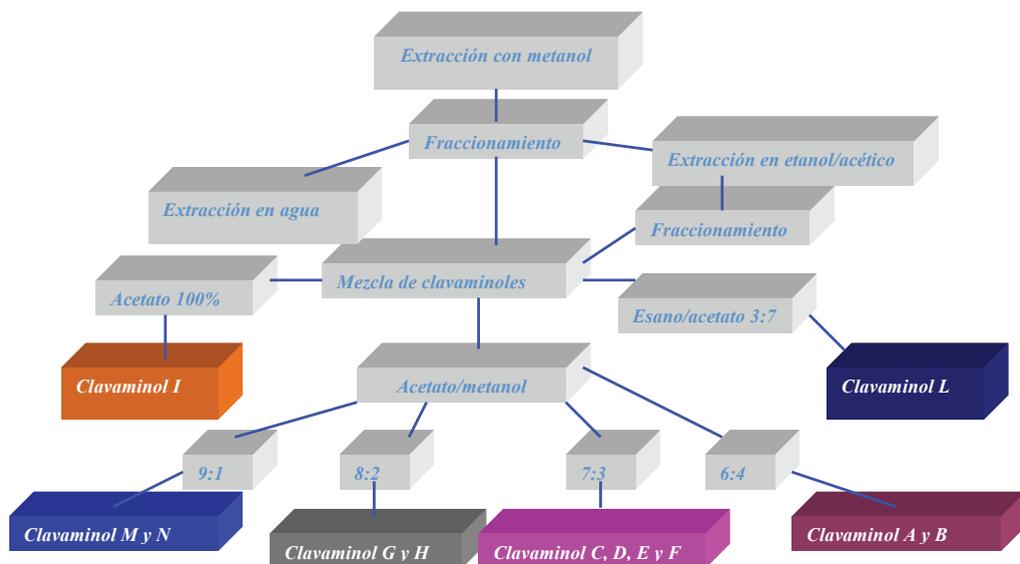


Figura 23. Procedimiento de extracción y aislamiento de clavaminos A-N

KH_2PO_4 1,45mM; NaHCO_3 2,6mM; pH=7,2) y se pasaron a una placa que contiene un medio de disección comercial, L-15, donde se obtuvieron las cortezas cerebrales. Una vez aislado el cortex, es imprescindible retirar las meninges antes de homogeneizar. Las cortezas limpias se trasladaron a la placa que contenía lo que llamamos medio de incubación (80% (v/v) MEM (Minimum Essential Medium), 10% (v/v) suero de caballo, 10% (v/v) suero fetal, 1,98mM glutamina, 3,3mM glucosa y 16mg/L gentamicina sulfato). El tejido se disgregó y homogeneizó mecánicamente.

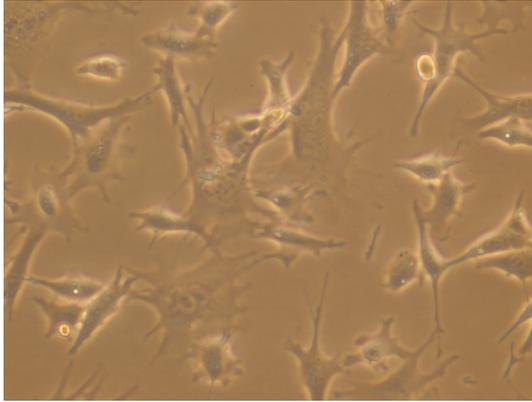
2.2.1.2. Siembra.

Tras la homogeneización, se realizó el recuento del número de células obtenidas. Para ello se empleó el método de exclusión del Azul Tripán en una cámara Neubauer. Una vez conocida la cantidad de células obtenidas, se suspendieron en medio de incubación hasta la densidad requerida, que en nuestro caso fue de 2×10^5 células/cm². Se sembraron en placas multipocillos Petri de 12 unidades (=2,2cm).

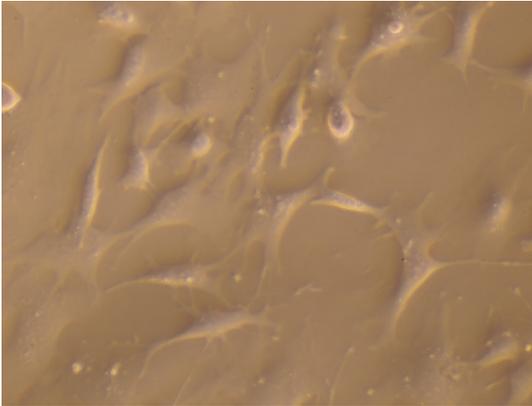
2.2.1.3. Mantenimiento.

Durante los cuatro primeros días, las células se mantuvieron en el medio de incubación. Al cuarto día se cambió por un medio de crecimiento (90% (v/v) MEM, 10% (v/v) suero de caballo, 1,98mM glutamina, 3,3mM glucosa y 16mg/L gentamicina sulfato), que además

A



B



C

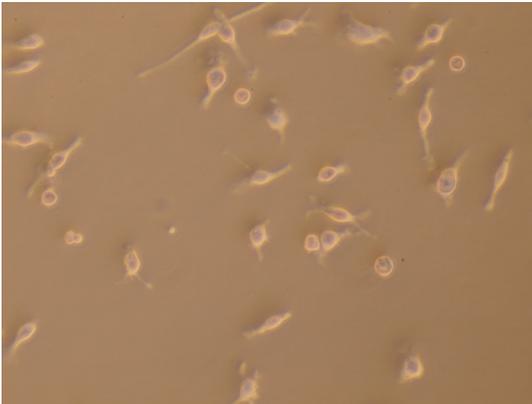


Figura 24. Imágenes cultivos de neuroglia observadas con un microscopio en contraste de fase. Neuroglia aislada de embriones de ratas (A). Cultivo mixto de neuronas y microglia (cultivo de 15 días). Cultivo puro de neuronas (C) en medio de cultivo específico, después de haber bloqueado el crecimiento de microglia y astrocitos (cultivo de 21 días).

llevaba un citostático, la citosina arabinósido (10mM) para impedir el crecimiento de células que proliferan como la glía (Guzmán, 2005). A la semana de haberlas sembrado se volvió a cambiar el medio para poner de nuevo medio de crecimiento, pero esta vez sin citosina. Con este tratamiento se obtuvo un cultivo mayoritariamente neuronal, aunque con un 5% aproximadamente de población glial.

2.2.1.4. Cultivos enriquecidos con glía.

Para la obtención de un cultivo con población mayoritariamente glial, el procedimiento que se siguió fue similar al de la obtención de neuronas con alguna modificación. La densidad de siembra fue de 5×10^4 células/cm² y no se añadió citosina arabinósido al cuarto día de haber sembrado. De esta forma, se permitió la proliferación y crecimiento de la glía. El porcentaje de cada población celular fue de: $15 \pm 3\%$ neuronas, $75 \pm 8\%$ astrocitos y $10 \pm 2\%$ microglía. Además, los experimentos se llevaron a cabo a las dos semanas de la siembra.

2.2.1.5. Caracterización de la población celular de los cultivos.

Se fijaron las células e incubaron con el anticuerpo correspondiente para su posterior identificación. Para la identificación de los astrocitos se empleó el anticuerpo monoclonal anti- GFAP (glial fibrillary acidic protein o proteína fibrilar glial ácida) diluido 1:100 en PBS (buffer salino tamponado con fosfato a pH 7,4), mientras que para la localización de microglía se empleó lectina de tomate (biotina conjugada de aglutinina de *Lycopersicon esculentum* marcada con fluoresceína) diluida 1:200 en PBS. En el caso de los astrocitos hizo falta un fluoróforo como anticuerpo secundario monoclonal, que fue el CyTM2-antiIgG de ratón 1:250 en PBS. La incubación con los anticuerpos se llevó a cabo en atmósfera húmeda y a temperatura ambiente. Las células se mantuvieron con el anticuerpo primario anti-GFAP o con la lectinas durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS y en el caso de los astrocitos se incubaron con el anticuerpo secundario durante otra hora y en las mismas condiciones de humedad y temperatura que el primario. Tras este tiempo, se lavó de nuevo con PBS y se tomaron las fotografías correspondientes. Las neuronas se localizaron, en cuatro campos escogidos al azar, como células GFAP negativas, aglutinina de *Lycopersicon esculentum* negativas y apariencia birrefringente en contraste de fases. Se empleó un microscopio Olympus T041 para la identificación y fotografía de las distintas poblaciones celulares (Figura 24).

2.2.1.6. Privación de oxígeno y glucosa (POG) y exposición a glutamato.

Los experimentos se llevaron a cabo a los nueve o diez días de la siembra. Para simular una isquemia in vitro se realizó una privación de oxígeno y glucosa (POG), en una cámara (Forma Scientific) a 37°C, en ausencia total de glucosa y en una atmósfera anaeróbica de nitrógeno (95%N₂/5%CO₂). Antes de comenzar cualquier tratamiento se lavaron las células dos veces con el buffer que se empleó durante la POG, el "buffer de isquemia" (NaCl 130mM; KCl 5,4mM; CaCl₂ 1,8mM; MgCl₂ 0,8mM; NaH₂PO₄·H₂O 1mM; NaHCO₃ 26mM; pH=7,2) para retirar el medio de crecimiento. Durante la POG se mantuvo constante la presión y temperatura del sistema (0,5 psi en el manómetro de salida del circuito). Los grupos control conservaron durante el mismo tiempo una atmósfera aeróbica con buffer de glucosa (igual que el buffer de isquemia, pero que contiene 33mM de glucosa). Al acabar el tiempo de POG, las células se lavaron con un medio de reperfusión (igual que el medio de crecimiento, pero cambiando la gentamicina por 0,15ng/mL de penicilina) dos veces y se dejan con este medio durante el periodo de "reperfusión" las 24 horas posteriores. Muy importante es destacar que el tiempo de POG en los experimentos de liberación de glutamato fue de 150 minutos. El motivo de escoger 140-160 minutos fue porque se observó que en este tiempo había liberación de glutamato, pero no había liberación de LDH.

Así, los experimentos en los que los valores de LDH de los grupos control y POG diferían significativamente no fueron considerados. De esta forma se estaba descartando que la liberación no deseada de glutamato por rotura celular y sus posteriores consecuencias (excitotoxicidad), interfiriese en el estudio de los mecanismos de liberación y el efecto de clavaminol sobre este proceso.

Alternativamente al tratamiento de POG, hubo células expuestas a glutamato. Se incubaron durante 5 minutos con una concentración de glutamato de 10µM en un medio que carecía de magnesio. Posteriormente se cambió el medio y se mantuvo así 24 horas. Para las medidas de los niveles de ATP, el tiempo de POG escogido fue de 90 minutos. En este tiempo no hubo liberación de glutamato (se comprobó por HPLC), de forma que se evitó que hubiese gasto por exocitosis o por lisis celular (se midió la LDH).

2.2.1.7. Determinación de LDH (Lactato deshidrogenasa).

La lactato deshidrogenasa es un enzima citosólica que se libera al espacio extracelular como consecuencia de la lisis celular (Giordano et al., 2011). Para medirla, tras la POG se retira un volumen de medio y se mezcla con la misma cantidad de buffer fosfato/NADH/piruvato

(concentración final de NADH 350 μ M; piruvato sódico 900 μ M; pH 7,4). Se mide la cinética durante 150 segundos a temperatura ambiente en un espectrofotómetro (Beckman DU7500) a 340nm. En esta longitud de onda registramos la desaparición de NADH al oxidarse por la presencia en el medio de LDH. En concreto la reacción es la siguiente:



La LDH se expresa como porcentaje de LDH total. Para calcular este valor se lisaron las células con Tritón X-100 y se midió a 340nm como se ha explicado antes. Este valor junto a los obtenidos previamente a 0, 3 y 24 horas es el valor total de LDH. Así, el valor de LDH liberado se determina:

$$\text{LDH}(\%) = 100 \times \frac{\text{LDH}_{(\text{medio})}}{\text{LDH}_{(\text{medio})} + \text{LDH}_{(\text{células})}}$$

2.2.1.8. Determinación de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio).

El MTT es un marcador de viabilidad a través de la medida colorimétrica de la actividad mitocondrial. Va a medir la capacidad de las mitocondrias de las células de reducir el MTT al colorante formazán. Las células se incuban tras la POG durante 3 horas con una solución de buffer fosfato/MTT (12mM de MTT en buffer fosfato a pH 7,4). Transcurrido ese tiempo se retira el medio y se mantienen durante 24 horas con un solubilizante compuesto de dimetilformamida al 40% y SDS al 20%, a pH 4,7. Para determinarlo se mide a 570 nm en un lector de microplacas (Biorad Model 680).

2.2.1.9. Tinción con ioduro de propidio (PI).

Estos experimentos se hicieron para determinar la viabilidad celular tras la POG. El ioduro de propidio se une al DNA de células necróticas, lo que hace que emita fluorescencia roja (λ excitación=535nm, λ emisión=617nm), mientras que las células vivas apenas dan señal. Para estos experimentos las células fueron mantenidas en medio PGG durante 30 minutos tras la POG. Después se lavaron con PBS frío y se incubaron en hielo durante 30 minutos con 1 μ g/mL de ioduro de propidio en PBS. Tras este tiempo las células se pudieron ver y fotografiar con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300).

2.2.1.10. Determinaciones

2.2.1.10.1. EFECTO DE CLAVAMINOL SOBRE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR POG.

En estos experimentos el periodo de POG fue de 150 minutos. Tras este tiempo, se midieron distintos parámetros de viabilidad celular como son la LDH, MTT y PI. En el caso de la LDH se

tomó del medio tras los 150 minutos, se retiró y se añadió el buffer de reperfusión mientras se mantuvieron las células en el incubador a 37°C. Esto permitió medir la LDH a las 0, 3 y 24 horas después de la POG. Para el MTT y el PI se retiró el medio y se determinó en las células (Figura 25).

Con estos experimentos se comprobó si había muerte celular tras la POG y si los distintos clavaminoles eran capaces de reducirla. Diferentes concentraciones de clavaminol (0-10.000µM) se añadieron al comenzar la POG. En la reperfusión se retiró cualquier fármaco.

2.2.1.10.2. EFECTO DEL SALICILATO SÓDICO Y LA INDOMETACINA SOBRE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR POG.

Los experimentos se llevaron a cabo igual que los clavaminoles aunque sólo se determinó la LDH a 0, 3 y 24 horas tras la POG. Se probó el salicilato sódico (300µM) y la indometacina (3, 10 y 100µM) como AINE.

2.2.2. Resultados

2.2.2.1. Efecto de los clavaminoles sobre la muerte neuronal inducida por un proceso de privación de oxígeno y glucosa (POG).

El proceso de POG de 150 minutos, produce muerte neuronal en nuestro modelo, como se observa en los tres marcadores de viabilidad celular (LDH, MTT y PI). Hay un aumento en los niveles de LDH liberados al medio a las 3 y 24 horas después de la POG, un mayor porcentaje de MTT reducido tras la POG y un mayor porcentaje de células marcadas

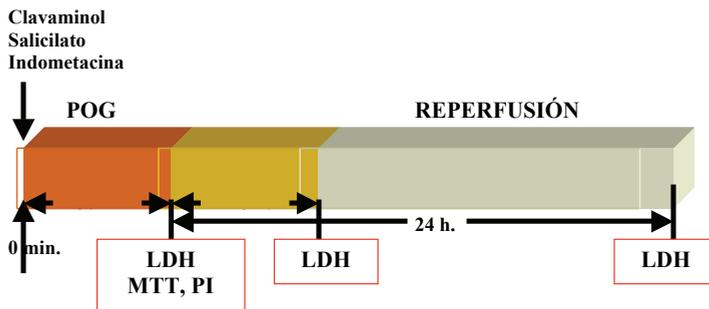
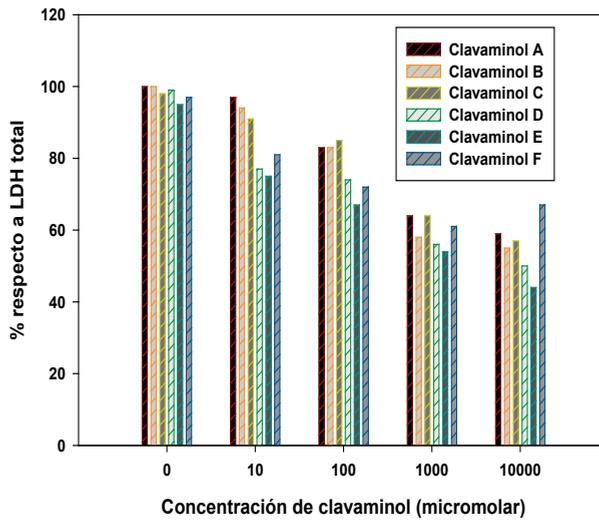


Figura 25. Procedimiento experimental de muerte inducida por POG.

inmediatamente después de la POG con PI. Cuando se incubaron con clavaminoles, se redujeron los niveles de LDH en el medio ($IC_{50} = 0,115 \pm 0,015 \mu M$), disminuyó el porcentaje de células necróticas teñidas con PI y aumentó el de MTT reducido (Figura 26).

**Efecto de clavaminol sobre la liberación de LDH 24 horas después de la POG.
El resultado se expresa como porcentaje de la LDH total**



**Efecto de clavaminol sobre la liberación de LDH 24 horas después de la POG.
El resultado se expresa como porcentaje de la LDH total**

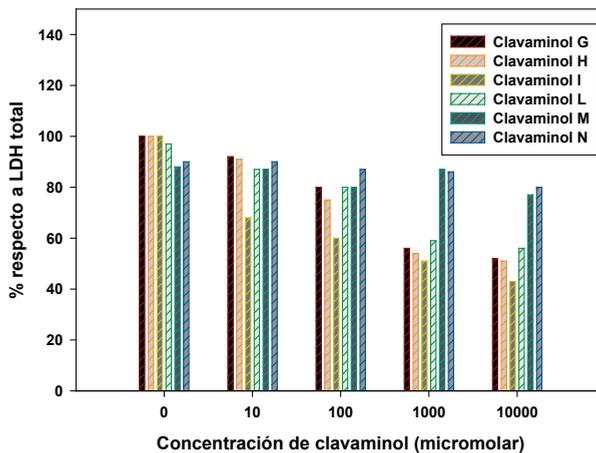


Figura 26. Efecto de distintos clavaminoles sobre La liberación de LDH.

2.2.2.2. Efecto del salicilato sódico y la indometacina sobre la muerte neuronal inducida por POG.

El salicilato sódico fue capaz de reducir la muerte neuronal a la misma concentración a la que los clavaminoles M y N demostraron su máxima eficacia (300 μ M). Por su parte, la indometacina fracasó a las tres concentraciones empleadas como protector frente a la muerte neuronal inducida por POG. En la Figura 27 se muestran los valores de LDH a las 24 horas de la POG.

2.2.3. Conclusiones

Las células sometidas a un periodo de 150 minutos de POG sufren un daño respecto a las controles (células no tratadas), como se observa en los marcadores escogidos para evaluar el daño celular (liberación de LDH, inhibición de la reducción de MTT y tinción con PI). Las distintas dosis de clavaminoles producen una mejoría en los parámetros de viabilidad (reduciendo los niveles de LDH liberada, aumentando el porcentaje de MTT reducido y disminuyendo el número de células teñidas con PI), y la protección es máxima a la concentración de 300 μ M.

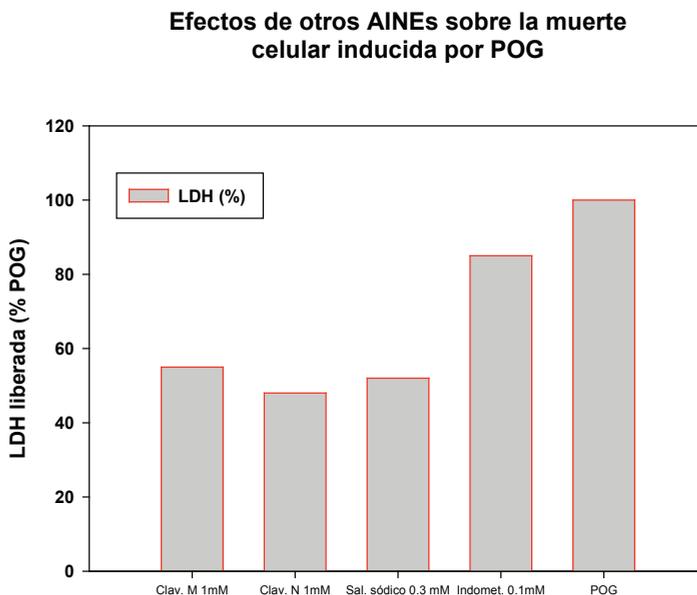


Figura 27. Efecto de distintos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y clavaminoles M y N sobre la muerte celular inducida por POG .

Conclusiones generales

Los compuestos naturales representan un elemento fundamental en las relaciones entre los hombres y otros seres vivos: de ellos dependen la salud, la nutrición, las sensaciones, en una palabra, sus propias vidas. Por esta razón, el estudio de los compuestos naturales juega un papel científico central y siempre se ha caracterizado por sus importantes aplicaciones, como producto normal de una actividad cultural con inmediatos resultados comerciales y como un espejo de las características de la época donde se encuentra. En este sentido, los estudios realizados en el Departamento de Biotecnología marina de Euroespes Biotecnología, a lo largo de casi veinte años de actividad, constituyen una línea de investigación coherente e indicativa de la evolución del conocimiento mismo en compuestos naturales. La historia de más de veinte años de actividad del Departamento de Biotecnología marina no es sólo una historia de progreso y logros científicos, sino más bien de la adaptación de nuevas tecnologías a las diferentes formas de transformación de los productos naturales, desde el fármaco clásico hasta el desarrollo de nuevos alimentos funcionales para su posible uso profiláctico y/o terapéutico.

Referencias

- Abraham I, El Sayed K, Chen ZS, Guo H., (2012) Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Marine Drugs*, 10:2312-2321.
- Adams B, Pörzgen P, Pittman E, Yoshida WY, Westenburg HE, Horgen FD., (2008) Isolation and structure determination of malevamide E, a dolastatin 14 analogue, from the marine cyanobacterium *Symploca laete-viridis*. *Journal of Natural Products*, 71:750-754.
- Ahn M.Y., Jung J.H., Na Y.J., Kim H.S., (2008) A natural histone deacetylase inhibitor, Psammaplina A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 108:27-33.
- Aiello A, Fattorusso E, Giordano A, Menna M, Navarrete C, Muñoz E., (2007) Clavaminols A-F, novel cytotoxic 2-amino-3-alkanols from the ascidian *Clavelina phlegraea*. *Bioorganic Medical Chemistry*, 15:2920-2926.
- Baden D.G., Bourdelais A.J., Jacocks H., Michelliza S., Naar J., (2005) Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects. *Environmental Health Perspectives*, 113:621-625.
- Bai R, Pettit GR, Hamel E., (1990) Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. *Biochemical Pharmacology*, 39:1941-1949.
- Bai R, Friedman SJ, Pettit GR, Hamel E., (1992) Dolastatin 15, a potent antimitotic depsipeptide derived from *Dolabella auricularia*. Interaction with tubulin and effects of cellular microtubules. *Biochemical Pharmacology*, 43:2637-2645.

- Barboza N.M., Medina D.J., Budak-Alpdogan T., Aracil M., Jimeno J.M., Bertino J.R., Banerjee D., (2012) Plitidepsin (Aplidin) is a potent inhibitor of diffuse large cell and Burkitt lymphoma and is synergistic with rituximab. *Cancer Biological Therapy*, 13:114-122.
- Baud M.G., Leiser T., Petrucci V., Gunaratnam M., Neidle S., Meyer-Almes F.J., Fuchter M.J., (2013) Thioester derivatives of the natural product psammaphin A as potent histone deacetylase inhibitors. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9:81-88.
- Bodey G.P., Freireich E.J., Monto R.W., Hewlett J.S., (1969) Cytosine arabinoside (NSC-63878) therapy for acute leukemia in adults. *Cancer Chemother Rep.*, 53:59-66.
- Boger D., (2012) Bryostatin analog: improving on Nature's design. *Oncotarget*, 3:116-117.
- Cabrita M.T., Vale C., Rauter A.P., (2010) Halogenated compounds from marine algae. *Marine Drugs*, 8:2301-2317.
- Choi WS, Kim HW, Xia Z. (2013) Preparation of primary cultured dopaminergic neurons from mouse brain. *Methods in Molecular Biology*, 1018:61-69.
- Coleman A.C., Mydlarz L.D., Kerr R.G., (1999) In vivo and in vitro investigations into the biosynthetic relatedness of the pseudopterosins. *Organic Letters*, 1:2173-2175.
- Correa H., Valenzuela A.L., Ospina L.F., Duque C., (2009) Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopteroorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *Journal of Inflammation (London)*, 6:5.
- Cuevas C., Francesch A., (2009) Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Products Report*, 26:322-337.
- Davidson SK, Haygood MG., (1999) Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*". *Biological Bulletin*, 196:273-280.
- Derby C.D., Aggio J.F., (2011) The neuroecology of chemical defenses. *Integrative and Comparative Biology*, 51:771-780.
- Dominguez H.J., Paz B., Daranas A.H., Norte M., Franco J.M., Fernández J.J., (2010) Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*, 56:191-217.
- Durafour BA, Moore CS, Blain M, Antel JP. (2013) Isolating, culturing, and polarizing primary human adult and fetal microglia. *Methods in Molecular Biology*, 1041: 199-211.
- Ebada S.S., Lin W., Proksch P., (2010) Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: occurrence and pharmacological significance. *Marine Drugs*, 8:313-346.
- Eguchi K., Fujiwara Y., Hayashida A., Horlad H., Kato H., Rotinsulu H., Losung F., Mangindaan R.E., de Voogd N.J., Takeya M., Tsukamoto S., (2013) Manzamine A, a marine-derived alkaloid, inhibits accumulation of cholesterol ester in macrophages and suppresses hyperlipidemia and atherosclerosis in vivo. *Bioorganic Medical Chemistry*, 21:3831-3838.
- Faulkner D.J. (2002) Marine natural products. *Natural Products Report*, 19:1-48.
- Fusetani N., Kem W., (2009) Marine toxins: an overview. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 46:1-44.

- Gauvin-Bialecki A., Aknin M., Smadja J., (2008) 24-O-ethylmanoalide, a manoalide-related sesterterpene from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Molecules*,13:3184-3191.
- Gerwick W.H., Moore B.S., (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol.*, 19(1):85-98.
- Giordano G, Hong S, Faustman EM, Costa LG. (2011) Measurements of cell death in neuronal and glial cells. *Methods in Molecular Biology*, 758:171-178.
- Guzmán M. (2005) Effects on cell viability. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168: 627-642.
- Hamann M.T., Otto C.S., Scheuer P.J., Dunbar D.C., (1996) Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis sp.*(1). *Journal of Organic Chemistry*, 61:6594-6600.
- Iwasaki S., (1998) Natural organic compounds that affect to microtubule functions. *Yakugaku Zasshi.*, 118:112-126
- Izbicka E., Lawrence R., Raymond E., Eckhardt G., Faircloth G., Jimeno J., Clark G., Von Hoff D.D., (1999) In vitro antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Annals of Oncology*, 9:981-987.
- Jung J.H., Sim C.J., Lee C.O., (1995) Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *Journal of Natural Products*, 58:1722-1726.
- Kaburagi Y, Kishi Y., (2007) Effective Procedure for Selective Ammonolysis of Monosubstituted Oxiranes: Application to E7389 Synthesis. *Tetrahedron Letters*, 48:8967-8971.
- Kalimuthu S., Se-Kwon K., (2013) Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: marine bioactive compounds. *International Journal of Molecular Science*, 14:2334-2354.
- Kim S.K., Thomas N.V., Li X., (2011) Anticancer compounds from marine macroalgae and their application as medicinal foods. *Advances in Food Nutrition Research*, 64:213-224.
- Kim S.K., Li Y.X., (2012) Biological activities and health effects of terpenoids from marine fungi. *Advances in Food Nutrition Research*, 65:409-413.
- Kim H.J., Kim J.H., Chie E.K., Young P.D., Kim I.A., Kim I.H., (2012) DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiation Oncology*, 20;7:39.
- Kingston DG., (2011) Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *Journal of Natural Products.*, 72:507-515.
- Klein LE, Freeze BS, Smith AB 3rd, Horwitz SB., (2005) The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle* 4:501-507.
- Klenchin V.A., King R., Tanaka J., Marriott G., Rayment I., (2005) Structural basis of swinholide A binding to actin. *Chemical Biology*, 12:287-291.
- Knowles RR, Carpenter J, Blakey SB, Kayano A, Mangion IK, Sinz CJ, Macmillan DW., (2011) Total synthesis of diazonamide A. *Chemical Science*, 2011:308-311.
- Lansiaux A., Bailly C., (1999) [Ecteinascidin 743]. *Bulletin of Cancer*, 86:139-141.

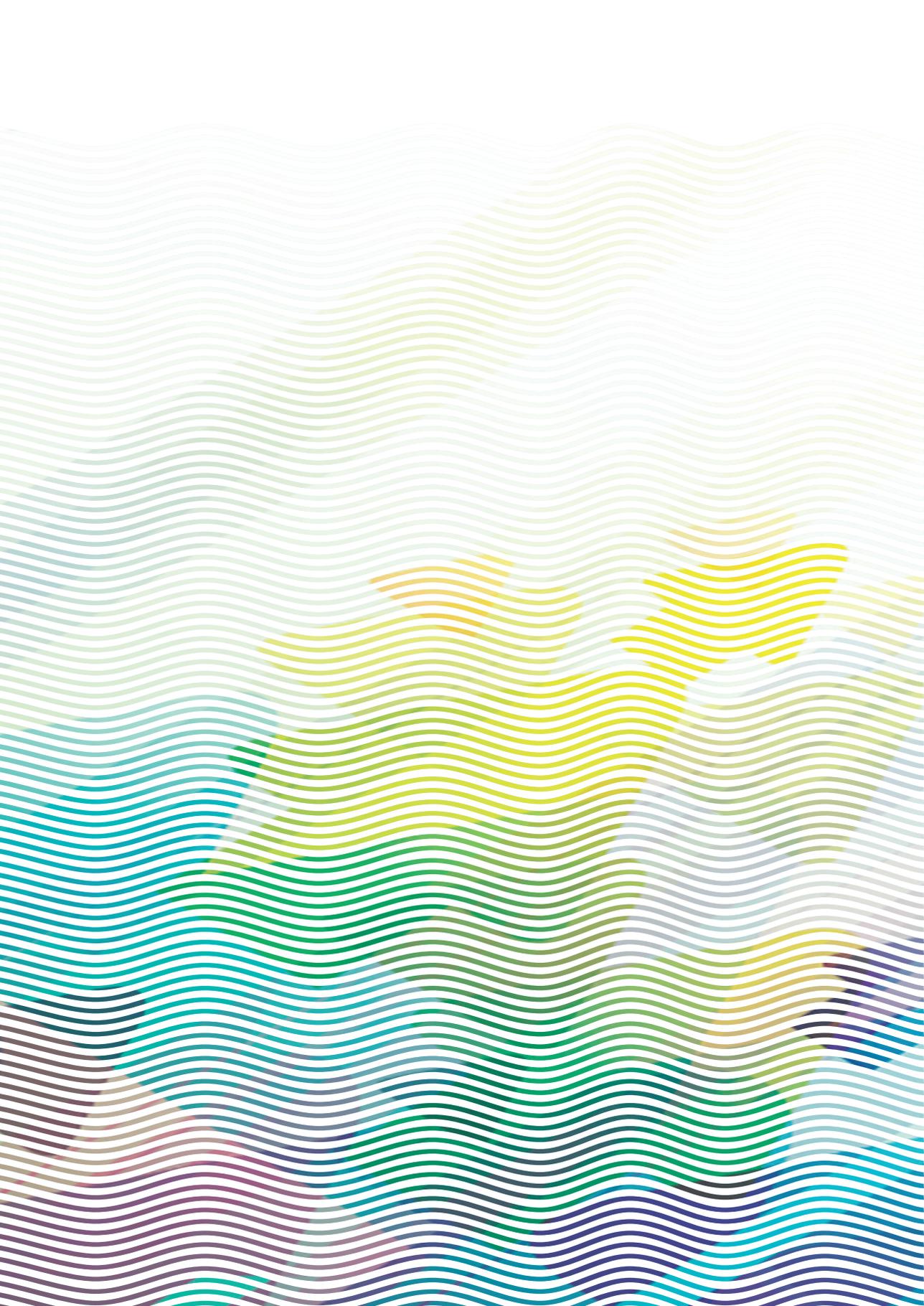
- Laport M.S., Santos O.C., Muricy G., (2009) Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current Pharmacological Biotechnology.*, ;10:86-105.
- Lee J., Currano J.N., Carroll P.J., Joullié M.M., (2012) Didemnins, tamandarins and related natural products. *Natural Products Report*, 29:404-424.
- Long BH, Carboni JM, Wasserman AJ, Cornell LA, Casazza AM, Jensen PR, Lindel T, Fenical W, Fairchild CR., (1998) Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Research*, 58:1111-1115.
- Lourenção A.M., Ferreira L.M., Branco P.S., (2012) Molecules of natural origin, semi-synthesis and synthesis with anti-inflammatory and anticancer utilities. *Current Pharmacology Design*, 18:3979-4046.
- Lordan S., Ross R.P., Stanton C., (2011) Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9:1056-1100.
- Luesch H, Harrigan GG, Goetz G, Horgen FD., (2002) The cyanobacterial origin of potent anticancer agents originally isolated from sea hares. *Current Medical Chemistry*, 9:1791-1806.
- Margolin K, Longmate J, Synold TW, Gandara DR, Weber J, Gonzalez R, Johansen MJ, Newman R, Baratta T, Doroshow JH., (2001) Dolastatin-10 in metastatic melanoma: a phase II and pharmacokinetic trial of the California Cancer Consortium. *Investigation in New Drugs*, 19:335-340.
- Matsumoto R, Fujii Y, Kawsar SM, Kanaly RA, Yasumitsu H, Koide Y, Hasan I, Iwahara C, Ogawa Y, Im CH, Sugawara S, Hosono M, Nitta K, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y., (2012) Cytotoxicity and glycan-binding properties of an 18 kDa lectin isolated from the marine sponge *Halichondria okadaei*. *Toxins*, 4:323-338.
- Mateos M.V., Cibeira M.T., Richardson P.G., Prosper F., Oriol A., de la Rubia J., Lahuerta J.J., García-Sanz R., Extremera S., Szyldergemajn S., Corrado C., Singer H., Mitsiades C.S., Anderson K.C., Bladé J., San Miguel J., (2010) Phase II clinical and pharmacokinetic study of plitidepsin 3-hour infusion every two weeks alone or with dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 16:3260-3269.
- McBride A, Butler SK., (2012) Eribulin mesylate: a novel halichondrin B analogue for the treatment of metastatic breast cancer. *American Journal of Health System Pharmacy*, 69:745-755.
- Mimouni V., Ulmann L., Pasquet V., Mathieu M., Picot L., Bougaran G., Cadoret J.P., Morant-Manceau A., Schoefs B., (2012) The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmacological Biotechnology*, 13:2733-2750.
- Monti M.C., Casapullo A., Cavasotto C.N., Napolitano A., Riccio R., (2007) Scalaradial, a dialdehyde-containing marine metabolite that causes an unexpected noncovalent PLA2 Inactivation. *Chembiochem*, 8:1585-1591.
- Morande P.E., Zanetti S.R., Borge M., Nannini P., Jancic C., Bezares R.F., Bitsmans A., González M., Rodríguez A.L., Galmarini C.M., Gamberale R., Giordano M., (2012) The cytotoxic activity of Aplidin in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is mediated by a direct effect on leukemic cells and an indirect effect on monocyte-derived cells. *Investigational New Drugs*, 30:1830-

1840.

- Ngo D.H., Vo T.S., Ngo D.N., Wijesekara I., Kim S.K., (2012) Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51:378-383.
- Nguyen T.T., Shaw P.N., Parat M.O., Hewavitharana A.K. (2013) Anticancer activity of *Carica papaya*: a review. *Molecular Nutrition Food Research*, 57:153-1564.
- Ohno O., Suenaga K., Uemura D., (2012) Secondary metabolites with new medicinal functions from marine organisms. *Advances in Food Nutrition Research*, 65:185-193.
- Ohno O, Chiba T, Todoroki S, Yoshimura H, Maru N, Maekawa K, Imagawa H, Yamada K, Wakamiya A, Suenaga K, Uemura D. (2011) Halichonines A, B, and C, novel sesquiterpene alkaloids from the marine sponge *Halichondria okadai* Kadota. *Chemical Communications (Cambridge)*, 47:12453-12455.
- Okada Y, Matsunaga S, van Soest RW, Fusetani N., (2002) Nagahamide A, an antibacterial depsipeptide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Organic Letters*, 4:3039-3042.
- Peng J., Kudrimoti S., Prasanna S., Odde S., Doerksen R.J., Pennaka H.K., Choo Y.M., Rao K.V., Tekwani B.L., Madgula V., Khan S.I., Wang B., Mayer A.M., Jacob M.R., Tu L.C., Gertsch J., Hamann M.T., (2010) Structure-activity relationship and mechanism of action studies of manzamine analogues for the control of neuroinflammation and cerebral infections. *Journal of Medical Chemistry*, 53:61-76.
- Pereira R., Benedetti R., Pérez-Rodríguez S., Nebbioso A., García-Rodríguez J., Carafa V., Stuhldreier M., Conte M., Rodríguez-Barrios F., Stunnenberg H.G., Gronemeyer H., Altucci L., de Lera A.R., Indole-derived psammoplin A analogues as epigenetic modulators with multiple inhibitory activities. *Journal of Medical Chemistry*, 55:9467-9491.
- Perumal Samy R., Gopalakrishnakone P., Chow V.T., (2012) Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A(2). *Bioinformation*, 8:48-57.
- Pettit GR, Flahive EJ, Boyd MR, Bai R, Hamel E, Pettit RK, Schmidt JM., (1998) Antineoplastic agents 360. Synthesis and cancer cell growth inhibitory studies of dolastatin 15 structural modifications. *Anticancer Drug Design*, 13:47-66.
- Pham N.B., Butler M.S., Quinn R.J., (2000) Isolation of psammoplin A 11'-sulfate and bisaprasin 11'-sulfate from the marine sponge *Aplysinella rhax*. *Journal of Natural Products*, 63:393-395.
- Pitot HC, McElroy EA Jr, Reid JM, Windebank AJ, Sloan JA, Erlichman C, Bagniewski PG, Walker DL, Rubin J, Goldberg RM, Adjei AA, Ames MM., (1999) Phase I trial of dolastatin-10 (NSC 376128) in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 5:525-531.
- Radwan M., Hanora A., Khalifa S., Abou-El-Ela S.H., (2012) Manzamines: a potential for novel cures. *Cell Cycle*, 11:1765-1772.
- Rinehart K.L., (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Medical Research Reviews*, 20:1-27.
- Risk M., Lin Y.Y., Sadagopa Ramanujam V.M., Smith L.L., Ray S.M., Trieff N.M., (1979) High pressure liquid chromatographic separation of two major toxic compounds from *Gymnodinium breve davis*. *Journal of Chromatographic Science*, 17:400-405.

- Rockwell S., Liu Y., Aplidin as a potential adjunct to radiation therapy: in vitro studies. *International Journal of Radiation Biology*, 86:63-70.
- Russo P., Nastrucci C., Cesario A., (2011) From the sea to anticancer therapy. *Current Medical Chemistry*, 18:3551-3562.
- Sagar S., Kaur M., Minneman K.P., (2010) Antiviral lead compounds from marine sponges. *Marine Drugs*, 8:2619-2638.
- Salazar R., Cortés-Funes H., Casado E., Pardo B., López-Martín A., Cuadra C., Tabernero J., Coronado C., García M., Soto Matos-Pita A., Miguel-Lillo B., Cullerell-Young M., Iglesias Dios J.L., Paz-Ares L., (2013) Phase I study of weekly kahalalide F as prolonged infusion in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 72:75-83.
- Salazar R., Plummer R., Oaknin A., Robinson A., Pardo B., Soto-Matos A., Yovine A., Szyldergemajn S., Calvert AH. (2011) Phase I study of weekly plitidepsin as 1-hour infusion combined with carboplatin in patients with advanced solid tumors or lymphomas. *Investigational New Drugs*, 29:1406-1413.
- Savoia D., (2012) Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7:979-990.
- Sawadogo W.R., Schumacher M., Teiten M.H., Cerella C., Dicato M., Diederich M., (2013) A survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2011. *Molecules*, 18:3641-3673.
- Shi Y, Zhou M, Jiang M. (2013) A protocol for primary dissociated astrocyte and neuron co-culture. *Sheng Li Xue Bao.*, 25:72-76.
- Spector I., Braet F., Shochet N.R., Bubb M.R., (1999) New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopic Research Technology*, 47:18-37.
- Suarez-Jimenez G.M., Burgos-Hernandez A., Ezquerra-Brauer J.M., (2012) Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Marine Drugs*, 10:963-986.
- Swift A.M., Feeny R.J., (1948) A description of some methods employed in the chemical investigation of certain marine invertebrates. *Yale Science Magazine*, 22:9.
- Tsukimoto M., Nagaoka M., Shishido Y., Fujimoto J., Nishisaka F., Matsumoto S., Harunari E., Imada C., Matsuzaki T., (2011) Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B. *Journal of Natural Products*, 74:2329-2331.
- Vaishampayan U, Glode M, Du W, Kraft A, Hudes G, Wright J, Hussain M., (2000) Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 6:4205-4208.
- Vera M.D., Joullié M.M., (2002) Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. *Medical Research Reviews*, 22:102-145.
- Wang D.Z., (2008) Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Marine Drugs*, 11:349-371.

- Wink M., (2012) Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules*, 17:12771-12791.
- Yokoyama A., Murata M., Oshima Y., Iwashita T., Yasumoto T., (1988) Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. *Journal of Biochemistry*, 104:184-187.
- Zhou G.X., Molinski T.F., (2006) Manoalide derivatives from a sponge, *Luffariella sp.* *Journal of Asian Natural Products Research*, 8:15-20.



Neuro-protección y organismos marinos

Iván M. Carrera

Dept. de Neurociencias, Área de Biotecnología,
EuroEspes Biotecnología, Ebiotec S.A.
15165 Bergondo, A Coruña
neuromorfologia@ebiotec.com

Resumen

Actualmente, no existen medicamentos que pueden prevenir o tratar de manera efectiva los procesos de neurodegeneración característicos de las enfermedades o lesiones cerebrales, por lo que el desarrollo de dichos fármacos es una prioridad en nuestro sistema de salud. En las últimas décadas, la comunidad científica se ha volcado en la obtención y caracterización de nuevos compuestos que puedan dar respuesta a dicha demanda, siendo los organismos marinos una rica fuente de nuevos fármacos con potencial terapéutico. En el presente estudio, hemos examinado el papel neuroprotector de los compuestos de origen marino y así aclarar los mecanismos celulares por los que actúan.

Introducción

El medio marino posee una gran diversidad bioquímica y en él encontramos una creciente cantidad de organismos marinos que representan fuentes ricas de compuestos naturales que son estructuralmente nuevos y biológicamente activos. Estos compuestos naturales de origen marino pueden ser de gran utilidad en el tratamiento de diversas enfermedades humanas y servir como modelos para el descubrimiento de nuevos fármacos. En 2001, los investigadores estimaron que más de 10.000 compuestos de origen marino habían sido aislados e identificados a partir de organismos marinos (Proksch et al., 2002), y muchas de estas sustancias han demostrado ejercer efectos terapéuticos significativos (Blunden, 2001; Chakraborty et al., 2009). Algunos de estos compuestos han sido exhaustivamente estudiados por su potencial en la creación de nuevos fármacos aplicados a enfermedades humanas (Martínez, 2007).

Ahora más que nunca, existe un consenso generalizado del importante papel que desempeñan los radicales libres en la patogénesis de varias enfermedades, como los

procesos neurodegenerativos, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y daño hepático, e incluso en procesos naturales como el envejecimiento (Hekimi et al., 2011), lo que justifica la búsqueda de antioxidantes novedosos capaces de exhibir neuroprotección. Uno de los efectos tóxicos más documentados es el proceso de oxidación de los ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas, generando la formación y propagación de radicales lipídicos, así como al reordenamiento de dobles enlaces en lípidos insaturados, y desencadenando en la destrucción de los lípidos de membrana y la consecuente formación de productos como el malondialdehído (MDA). Por ello, los compuestos antioxidantes utilizados como suplementos alimentarios o farmacéuticos pueden neutralizar el efecto dañino de estos radicales libres en las células del organismo antes de que causen dichos procesos de oxidación, ayudando a la prevención de muchas de las enfermedades asociadas a las especies reactivas del oxígeno (Matés et al., 2012).

El objetivo de la neuroprotección es limitar la disfunción o muerte neuronal después de una lesión del sistema nervioso central en un intento de mantener la integridad de las interacciones celulares en el cerebro, por lo tanto reducir al mínimo las perturbaciones en la función neural (Tucci y Bagetta, 2008). De acuerdo con su mecanismo, la neuroprotección puede ser clasificada en varios mecanismos como: antioxidante (inhibidor de radicales libres) (Pellicciari et al., 1998, Behl y Moosmann, 2002), anti-inflamatorio (Agnello et al., 2002, Gao et al., 2003), anti-apoptótico (Volbracht et al., 2006); inhibidor de la apoptosis (Yu et al., 2003), expresión del gen modulador (Kietzmann et al., 2001); modulador de canales de iones (Heurteaux et al., 2004, Schwartz y Fehlings, 2001); quelante de iones metálicos (Youdim et al., 2004; Gaeta y Hider, 2005) y factor neurotrófico (Tremblay et al., 1999, Moalem et al., 2000, Akerud et al., 2001).

El potencial efecto neuroprotector de los compuestos antioxidantes tanto en el campo pre-clínico como en el clínico ha sido ampliamente demostrado (Calabrese et al., 2003) y actualmente los avances en investigación se orientan a caracterizar el papel que ejercen dichos compuestos antioxidantes en los procesos celulares universales, tales como la quiescencia, proliferación, división y muerte, así como en los mecanismos redox y los cambios derivados de ello, tales como especificidad celular, respuesta bioquímica, inflamatoria y expresión génica (Vamecq et al., 2003).

En la última década, se han desarrollado importantes antioxidantes sintéticos para su aplicación directa en la medicina e industria alimentaria, teniendo como finalidad la inhibición o el retardo de la oxidación constante de biomoléculas en el cuerpo humano.

Sin embargo, a pesar de la eficacia y bajo costo de algunos de estos compuestos se ha observado también una actividad carcinogénica y potencialmente tóxica, por lo que se ha reactivado la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales para su reemplazo. Para dar respuesta a esta imperiosa demanda, se han perfilado una serie de organismos marinos con gran carga antioxidante y neuroprotectora en su composición intrínseca, de entre los cuales cabe destacar las algas marinas, los corales blandos, protozoos y derivados de otros organismos marinos. A continuación describiremos las características y el potencial neuroprotector de los compuestos derivados de cada uno de estos organismos marinos.

1. Algas marinas

Entre los organismos marinos, las algas han sido identificadas como un recurso vegetal poco explotado, a pesar de que han sido reconocidas como una valiosa fuente de compuestos bioactivos estructuralmente diversos. En la actualidad, varias líneas de estudios han proporcionado una idea de las actividades biológicas y efectos neuroprotectores de las algas como antioxidantes, anti-neuroinflamatorio, inhibidor de la actividad colinesterasa y de muerte neuronal. Por lo tanto, las algas se presentan como excelentes candidatas, porque han desarrollado fuertes sistemas antioxidantes en respuesta a las condiciones altamente oxidativas en las que viven. Como organismos fotosintéticos, las algas están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, que permiten la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes (Pangestuti y Kim, 2011). Varios autores han comprobado que algunos extractos de diferentes especies de algas con actividad antioxidante también presentan a su vez propiedades neuroprotectoras en el sistema nervioso central.

Bryothamnion triquetrum. La capacidad neuroprotectora del extracto acuoso del alga roja *Bryothamnion triquetrum* (Fig.1a) ha sido analizada por Fallarero y colaboradores (2006) en el cual se determinó que dicho extracto tiene la capacidad de proteger las células hipotalámicas inmortalizadas de ratones (GT1-7) frente a procesos de muerte celular inducida, en condiciones de hipoxia química/aglicémica (condiciones similares a un evento de isquemia cerebral). Los resultados obtenidos indicaron que las propiedades neuroprotectoras del extracto se debían, en parte, a la presencia del ácido ferúlico, uno de los 3 ácidos cinámicos encontrados en el alga. Esta actividad neuroprotectora parece estar vinculada con su capacidad de disminuir la generación de radicales libres, mediante diferentes mecanismos de acoplamiento e inactivación de estos radicales a nivel celular en el organismo (Lipton, 2007).

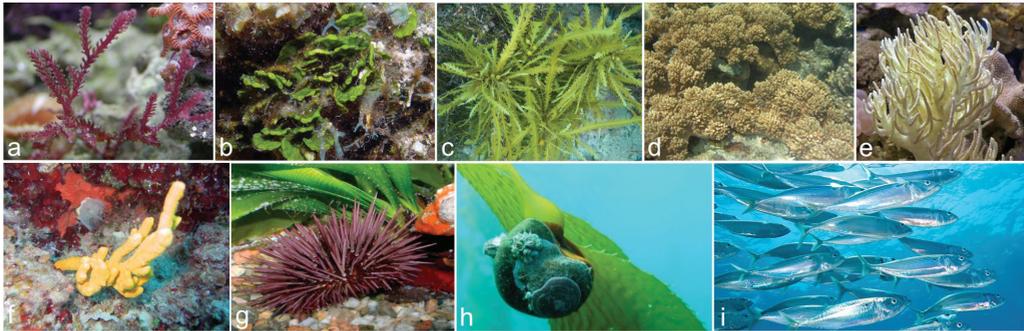


Figura 1 (a-i), Organismos marinos con implicación en productos derivados neuroprotectores. (a-c), Algas marinas: *Bryothamnion triquetrum* (a), *Halimeda incrassate* (b), *Sargassum macrocarpum* (c); (d-f), Corales marinos: *Sinularia querciformis* (d), *Sinularia flexibilis* (e), *Petrosia corticata* (f); (g), Invertebrados marinos: erizo de mar; (h), Pescado azul. (Referencia de imágenes: (a) w.open-ref.com; (b) w.natuurlijkmooi.net; (c) w.nagarem.blogspot.com; (d) w.science.naturalis.nl; (e) w.nanoreef.es; (f) w.easydive24.de; (g) w.pecesdelmarmediterraneo.com; (h) w.tecnoupdate.com.ar; (i) w.laiveesvida.com.

***Halimeda incrassate*, *Padina tetrastromatic* y otras algas.** Wijesekara y colaboradores (2010) han demostrado que la mayoría de los compuestos fenólicos que se purifican a partir de algas (Fig.1a-c) son responsables por los efectos de protección contra el estrés oxidativo que resulta del daño celular (Ngo et al., 2012). Los compuestos fenólicos actúan en la eliminación y degradación de los radicales libres resultantes, ya que son agentes quelantes de metales y de los productos redox, y por lo tanto inhiben eficazmente la oxidación de lípidos. Además, se ha demostrado que los carotenoides son fundamentales en la captación de radicales libres y también presentan un efecto antioxidante en la composición de las algas (Nomura et al., 1997, Yan et al., 1999). Young y Lowe (2001), demostraron posteriormente que la estructura, forma física, ubicación o sitio de acción, potencial de interacción con otro antioxidante, la concentración y la presión parcial de oxígeno pueden afectar a las actividades antioxidantes de los carotenoides en los sistemas biológicos. Otro componente, la fucoxantina, obtenida a partir de la *Padina tetrastromatic* ha demostrado un mayor potencial como antioxidante que el β -caroteno en la modulación de enzimas antioxidantes en el plasma y el hígado de ratas con deficiencias en niveles de retinol (Kumar et al., 2008, Sangeetha et al 2009). Sin embargo, el mecanismo exacto de acción por el cual la fucoxantina ejerce un efecto antioxidante todavía no se conoce con exactitud. Por otra parte, se ha documentado el efecto citoprotector de la fucoxantina contra la formación de compuestos oxidativos (ROS) inducida por el peróxido de hidrógeno en células fibroblásticas de mono (Heo et al, 2008). Se cree que la presencia de dos

grupos hidroxilo en la estructura del anillo de la fucoxantina pueden ser los responsables de inhibir la formación de ROS.

Recientemente, se ha descrito un compuesto fenólico aislado a partir de algas pardas, el dieckol, que parece inhibir la producción de ROS en las células de la microglía murina (BV2) (Jung et al., 2009). Por otra parte, también se ha demostrado que algunos polisacáridos sulfatados (SP) de algas se pueden utilizar como potentes antioxidantes (Wijesekara et al., 2010, Jiao et al., 2011). La actividad antioxidante de estos componentes de las algas depende directamente de sus características estructurales, tales como el grado de sulfatación, peso molecular, el principal tipo de azúcar y su ramificación glicosídica (Qi et al., 2005, Zhang et al., 2003).

Sargassum macrocarpum. Dos de sus componentes activos, ácido sargaquinoico y sargachromeanol, han demostrado que activa el crecimiento de neuritas en dendritas y axones neuronales, siendo ésta una de las características fundamentales en el desarrollo neuronal durante la embriogénesis y en el cerebro adulto (Khodosevich y Monyer, 2010). En particular, el grupo hidroxilo unido a la quinona presenta un efecto inductor sobre la actividad neurítica. Además, la feofitina, un compuesto relacionado con la clorofila, vitamina B12 y derivada del *Sargassum fulvellum* (Fig.1c) también tiene un gran potencial demostrado en la potenciación del crecimiento de neuritas (Ina et al., 2007, Ina y Kamei, 2006), y por lo tanto con carácter neuroprotector.

En general, se sabe que una gran parte de las algas presentan en su composición bioquímica ciertos compuestos apolares, como los derivados clorofílicos, terpenoides y carotenoides así como también aminoácidos característicos como las micosporinas capaces de absorber cantidades apreciables de radiaciones UV y evitar así el daño celular pre-oxidativo. Además, el alto contenido en vitaminas liposolubles (vitamina E) e hidrosolubles (vitamina C), compuestos que presentan actividad antioxidante, también contribuyen a las propiedades antioxidantes de estos organismos.

Por otro lado, las algas tienen compuestos polares (polifenólicos) como los flavonoides, ácidos fenólicos y cinámicos, y polisacáridos y compuestos simples sulfatados, así como florotaninos y bromofenoles y su relevancia radica en su participación en diferentes eventos antioxidantes tanto fisiológicos como metabólicos. Adicionalmente contienen metales como Se, Zn, Mn y Cu que aunque por si solos no son antioxidantes, al ser componentes fundamentales de enzimas antioxidantes también pudieran contribuir a sus propiedades antioxidantes al ser consumidos por el hombre (Pangestuti y Kim, 2011).

2. Corales marinos

En los últimos años, un número significativo de metabolitos con potentes propiedades anti-inflamatorias, neuroprotectoras y antioxidantes se han descubierto a partir de organismos marinos, y varios de estos compuestos ahora están en proceso preclínico, especialmente los compuestos derivados del coral blando, *Sinularia sp* (Lakshmi et al., 2009).

***Sinularia querciformis*, coral blando.** Los corales blandos de Formosa son una gran fuente de compuestos naturales marinos (Chakraborty et al., 2009). Compuestos bioactivos se aislaron por primera vez en 1985 a partir de *Sinularia querciformis* (Fig.1d) y desde entonces 8 tipos de compuestos de tipo “cembrane” con actividad anti-inflamatoria han sido aislados de esta especie de coral blando por Lu y colaboradores (2010).

Recientemente, se ha aislado un compuesto de tipo “cembrane” con efectos anti-inflamatorios, 11-epi-sinulariolide etilo (Ya-s11), a partir del coral blando *Sinularia querciformis* (Lin et al., 2013). Se observó que Ya-s11 inhibió significativamente la expresión de las proteínas proinflamatorias inducidas por la sintasa de óxido nítrico y la ciclooxigenasa-2 en macrófagos marinos estimulados con lipopolisacárido. También se examinaron los efectos terapéuticos de Ya-s11 sobre la artritis inducida por adyuvante (AIA) en ratas, que demuestran características similares a la artritis reumatoide humana, por lo que el compuesto de origen marino Ya-s11 puede desempeñar en el futuro un importante papel terapéutico en el tratamiento de la artritis reumatoide.

***Sinularia flexibilis*, coral blando.** Numerosos estudios han demostrado que los procesos inflamatorios juegan un papel crítico en la enfermedad de Parkinson, por lo que nuevos agentes anti-inflamatorios derivados de organismos marinos y que demuestren gran potencial pueden suprimir la progresión de dicha enfermedad. En este marco, el compuesto 11-Dehydrosinulariolide fue aislado de esta especie de corales blandos (Fig.1e) y ha demostrado un importante efecto anti-inflamatorio a través de la supresión de la expresión de dos principales proteínas pro-inflamatorias: óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa-2 en las células inmunitarias activadas. También se observó que el 11-dehydrosinulariolide reduce significativamente la citotoxicidad del compuesto 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)- en líneas celulares humanas de neuroblastoma (SH-SY5Y), por lo que se asocia su actividad farmacológica con la inhibición de la activación de 6-OHDA-inducida por la caspasa-3 y la translocación del factor nuclear kappa B. Además, el efecto neuroprotector de 11-dehydrosinulariolide también se evaluó utilizando células SH-SY5Y 6-OHDA-tratadas, en el que el factor de neuroprotección es mediado a través de la regulación de fosfatidilinositol

3-quinasa (PI3K) y de la disminución significativa en caspase-3/7, lo que indica que el compuesto 11-dehydrosinulariolide tiene propiedades neuroprotectoras.

Estos estudios refuerzan la idea de que este tipo de compuestos derivados de los organismos marinos con gran potencial inmunológico y neuroprotector son candidatos prometedores en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson a través de su acción anti-apoptótica y anti-inflamatoria mediada por la vía de señalización metabólica neuronal PI3K (Chen et al., 2012).

***Petrosia corticata*, esponja de coral.** Los organismos marinos con frecuencia producen una variedad de compuestos denominados electrofílicos, y que representan una clase recientemente reconocida de compuestos neuroprotectores que proporcionan protección neuronal a través de la activación de la vía de Nrf2/ARE. La activación de esta vía protege a las células de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo, ya que el estrés oxidativo está directamente asociado con la muerte celular neuronal durante la patogénesis de múltiples enfermedades neurodegenerativas crónicas, incluida la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica.

Varios estudios demuestran que la activación de la vía Nrf2-ARE en el sistema nervioso central es una nueva vía de neuroprotección que confiere resistencia a una variedad de compuestos oxidantes y macromoléculas con carácter neurodegenerativo relacionadas con el estrés neuronal (Johnson et al., 2008). En uno de estos estudios, cultivos neuronales primarios tratados con activadores químicos de la vía de Nrf2-SE muestran un incremento significativo de la resistencia neuronal a la oxidación neurotóxica inducida por el estrés metabólico celular.

Teniendo en cuenta estos avances, investigaciones marinas posteriores han encontrado en la esponja *Petrosia (Strongylophora) corticata* (Fig.1f) un compuesto pro-electrófilo de tipo hidroquinona denominado strongylophorine-8 (STR8), de particular interés debido a su capacidad de convertirse en quinonas electrofílicas sobre auto-oxidación, ejerciendo por lo tanto un potente efecto neuroprotector (Sasaki et al., 2011). Se ha demostrado que la STR8 activa la vía Nrf2/ARE, induciendo la actividad enzimática de fase 2 y el aumento del glutatión, protegiendo así las células neuronales del estrés oxidativo. La STR8 es uno de los primeros ejemplos de un compuesto pro-electrófilo neuroprotector generado a partir de organismos marinos.

3. Invertebrados marinos

Erizo de mar. Los huevos de los metazoos alteran biológicamente sus envueltas después de la fertilización para proteger el embrión temprano. En el caso de los huevos del erizo de

mar (Fig.1g), esta modificación consiste en un conjunto rápido y coordinado de pasos que resulta en un almacén macromolecular que se estabiliza mediante el entrecruzamiento de proteínas específicas. El huevo de erizo de mar utiliza una reacción de reticulación oxidativa que requiere peróxido de hidrógeno y una peroxidasa endógenamente secretada para que pueda enfrentarse al efecto del estrés oxidativo desde el comienzo de su desarrollo.

Actualmente se sabe que la protección contra los efectos nocivos de este mecanismo oxidativo es debida a la proteín-quinasa C y al ovothiol, un antioxidante intracelular, y que son claves para la regulación y protección frente a la reactividad de ciertas especies oxidativas. El uso de ovothiol en ensayos in vivo en pequeños mamíferos ha demostrado ser efectivo en cuanto a su potencial neuroprotector. Tanto la conformación oxidada como la reducida del análogo de ovothiol, han demostrado ser activas a niveles bajos en dos modelos neuropatológicos experimentales e independientes y mostrando mínimos índices de toxicidad en el cerebro adulto. Además, también se ha comprobado que su aplicación carece de efectos nocivos para las células neuronales en el cerebro inmaduro o en desarrollo, ya que no interfieren ni modifican ningún mecanismo del ciclo celular normal, al contrario de otros productos similares anteriormente testados (Olney, 2002).

Las propiedades antioxidantes que exhibe el MFP-4MI reducen o inactivan los compuestos oxidantes reactivos del medio intracelular tales como el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el peroxinitrito, el ácido hipoclorico y el LDL peroxidado. Además, los investigadores han demostrado que presenta una actividad similar a la enzima superóxido dismutasa así como la capacidad de constituir sustrato de la glutatión peroxidasa (Vamecq et al., 2003). Por todo ello, este componente derivado de invertebrados marinos presenta un enorme espectro de interacción antioxidante y que representa un gran valor añadido a su potencial en la aplicación clínico-terapéutica en un futuro cercano.

Los próximos avances en esta línea consistirán en combinar este compuesto derivado de invertebrados marinos, ovothiol, con la glutatión peroxidasa de mamíferos, en paralelo con el desarrollo de compuestos sintéticos como el 4-selenoimidazolico y así potencial exponencialmente sus efectos en la neuroprotección tanto de células neuronales inmaduras como en adultas, abriendo nuevos enfoques y posibilidades en el campo de la intervención clínica preventiva.

3.1. Caracoles marinos

La conantokina-G (Con-G), un péptido de 17 aminoácidos derivado del caracol marino (Fig.1h) ha demostrado ser un compuesto importante frente a procesos neurodegenerativos

puesto que presenta propiedades neuroprotectoras tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. Williams y colaboradores (2000) demostraron que en neuronas cerebelares primarias, Con-G muestra una inhibición en las respuestas de calcio intracelulares frente a la excitotoxicidad del NMDA y exhibe neuroprotección diferencial contra la hipoxia/hypoglycemia-, NMDA o lesión glutamatérgica.

Estos investigadores han documentado una reducción del 89% en el infarto cerebral inducido en un núcleo cerebral de modelos animales de experimentación. Los efectos neuroprotectores de Con-G también se evaluaron a las 72 horas de la lesión, donde se observó una reducción del 54% en el núcleo del infarto cerebral, por lo que en ambos modelos de recuperación la reducción en el infarto cerebral se asoció con una mejora significativa en términos de recuperación neurológica y electroencefalográfica. Estos resultados demuestran el potente efecto de Con-G como agente neuroprotector, y refuerza su aplicabilidad clínica con una excelente ventana terapéutica frente a lesiones cerebrales isquémicas / excitotóxicas.

4. Vertebrados marinos

Pescado azul. Las características precisas de los problemas neurológicos dependen de varios factores, que pueden incluir la gravedad de la enfermedad, la edad, el estado nutricional del paciente, etc. Un enfoque integral (Aruoma, 1999, 2002) aboga por la relación funcional de la dieta, los suplementos alimentarios y el control de enfermedades, incidiendo directamente en el mantenimiento de las funciones inmunes y la gestión preventiva de las enfermedades neurodegenerativas entre otras. En esta línea, varios grupos de investigación se han propuesto como principal objetivo definir la eficacia biológica y neuroprotectora de los componentes de la dieta en los alimentos / suplementos del consumo humano cotidiano (Lewis y Bailes, 2011) y en especial del pescado azul (Fig.1i).

Estas investigaciones afloraron resultados sorprendentes en cuanto al valor añadido de algunos componentes de la dieta de pescado azul en el metabolismo humano, de entre los que se destacan los ácidos grasos omega-3 (n-3 FA) favoreciendo la capacidad de recuperación en la actividad cerebral dañada y en el sistema cardiovascular. Estos estudios demuestran que los ácidos grasos omega-3 proporcionan importantes beneficios en la salud mediante mecanismos de protección celular, modulando la cascada inflamatoria después de una lesión cerebral traumática. Además, recientes investigaciones clínicas indican que los ácidos grasos omega-3 son útiles y eficaces en los procesos de recuperación después

de una lesión cerebral, incrementando su eficacia si está disponible en el sistema antes del momento de la lesión traumática.

Conclusión

Los últimos avances en el descubrimiento de nuevos derivados marinos con efectos potencialmente terapéuticos pueden contribuir significativamente a la modulación de los complejos mecanismos de gran parte de las enfermedades humanas, y en particular de las de tipo neurodegenerativas.

Teniendo en cuenta su posible contribución a la modulación inmune, el uso de estos compuestos derivados en la prevención y terapia clínica a corto plazo es de gran interés médico.

Además, a medida que avanza nuestro conocimiento de los complejos mecanismos moleculares de la neuroprotección, el estrés oxidativo y la función inmune, más clara será la caracterización del efecto terapéutico de dichos agentes bioactivos.

La investigación debe avanzar en paralelo con los esfuerzos para demostrar la eficacia clínica de los compuestos neuroprotectores marinos en la medicina tradicional y así impulsar su aplicabilidad en los procesos terapéuticos de las enfermedades humanas neuropatológicas.

Referencias

- Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines M, Ghezzi P. (2002) Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research*, 952: 128-134.
- Akerud P, Canals J, Snyder E, Arenas E. (2001) Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 21: 8108-8118.
- Aruoma I. (1999) Free radicals, antioxidants and international nutrition, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8: 53-63.
- Aruoma I (2002) Neuroprotection by dietary antioxidants: New age of research, *Nahrung Food*, 46:381-382
- Behl C, Moosmann B. (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biological Medicine*, 33: 182-191.
- Blunden G. (2001) Biologically active compounds from marine organisms. *Phytochemical Research*., 15: 89-94.
- Calabrese V, Butterfield D, Stella A. (2003) Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Italian Journal of Biochemistry*., 52: 177-181.

- Chakraborty C, Hsu C, Wen Z, Lin C. (2009) Anticancer drugs discovery and development from marine organism. *Current Topics in Medical Chemistry*, 9: 1536-1545.
- Chen W, Chakraborty C, Sung C, Feng C, Jean Y, Lin Y, Hung H, Huang T, Huang S, Su T, Sung P, Sheu J, Wen Z. (2012) Neuroprotection by marine-derived compound, 11-dehydrosinulariolide, in an in vitro Parkinson's model: a promising candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Naunyn Schmiedebergs Archive Pharmacology*, 385: 265-275.
- Fallarero A, Peltoketo A, Loikkanen J, Tammela P, Vidal A, Vuorela P. (2006) Effects of the aqueous extract of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*, 13: 240-245.
- Gaeta A, Hider R. (2005) The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *British Journal of Pharmacology*, 146: 1041-1059.
- Gao H, Liu B, Zhang W, Hong J. (2003) Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Science*, 24: 395-401.
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. (2011) Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21: 569-576.
- Heo S, Ko S, Kang S, Kang H, Kim J, Kim S, Lee K, Cho M, Jeon Y. (2008) Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. *European Food Research and Technology*, 228: 145-151.
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, Lazdunski M. (2004) TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO Journal*, 23: 2684-2695.
- Ina A, Hayashi K, Nozaki H, Kamei Y. (2007) Pheophytina, a low molecular weight compound found in the marine brown alga *Sargassum fulvellum*, promotes the differentiation of PC12 cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25: 63-68.
- Ina A, Kamei Y. (2006) Vitamin B₁₂, a chlorophyll-related analog to pheophytin a from marine brown algae, promotes neurite outgrowth and stimulates differentiation in PC12 cells. *Cytotechnology*, 52: 181-187.
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart H. (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9: 196-223.
- Johnson J, Johnson D, Kraft A, Calkins M, Jakel R, Vargas M, Chen P. (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Annals of NY Academic Science*, 1147: 61-69.
- Jung W, Heo S, Jeon Y, Lee C, Park Y, Byun H, Choi Y, Park S, Choi I. (2009) Inhibitory effects and molecular mechanism of dieckol isolated from marine brown alga on COX-2 and iNOS in microglial cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57: 4439-4446.
- Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R. (2001) Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *European Archives of Psychiatry Clinical Neuroscience*, 251: 170-178.
- Khodosevich K, Monyer H. (2010) Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro. *BMC Neuroscience*, 18: 11-18.
- Kumar S, Narayan B, Vallikannan B. (2008) Fucoxanthin restrains oxidative stress induced by retinol deficiency through modulation of Na⁺ K⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities in rats. *European Journal of Nutrition*, 47: 432-441.

- Lakshmi V, Kumar R. (2009) Metabolites from *Sinularia* species. *Natural Products Research*, 23: 801-50.
- Lewis M, Bailes J. (2011) Neuroprotection for the warrior: dietary supplementation with omega-3 fatty acids. *Military Medical Journal*, 176:1120-1127.
- Lin Y, Jean Y, Lee H, Chen W, Sun Y, Su J, Lu Y, Huang S, Hung H, Sung P, Sheu J, Wen Z. (2013) A Soft Coral-Derived Compound, 11-epi-Sinulariolide Acetate Suppresses Inflammatory Response and Bone Destruction in Adjuvant-Induced Arthritis. *PLoS ONE*, 8:e62926.
- Lipton S. (2007) Pathologically-activated therapeutics. *Nature Review Neuroscience*, 8: 803-808.
- Lu X, Yao X, Liu Z, Zhang H, Li W, Li Z, Wang G, Pang J, Lin Y, Xu Z, Chen L, Pei Z, Zeng J. (2010) Protective effects of xyloketal B against MPP⁺-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* and PC12 cells. *Brain Research*, 1332:110-119.
- Martinez A. (2007) Marine-derived drugs in neurology. *Current Opinion Investigational Drugs.*, 8: 525-30.
- Matés M, Segura J, Alonso F, Márquez J. (2012) Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives in Toxicology.*, 86: 1649-1665.
- Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen I, Schwartz M. (2000) Production of Neurotrophins by Activated T Cells: Implications for Neuroprotective Autoimmunity. *Journal of Autoimmunity.*, 15: 331-345.
- Ngo D, Vo T, Ngo D, Wijesekara I, Kim S. (2012) Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 51: 378-383.
- Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y. (1997) Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *IUBMB Life*, 42: 361-70.
- Novoa V, Motidome M, Mancini J, Fallarero A, Tanae M, Torres L, Lapa A. (2001) Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelim) *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, 37: 373-382.
- Olney J. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*, 23: 659-668.
- Pangestuti R, Kim S. (2011) Neuroprotective effects of marine algae. *Marine Drugs*, 9: 803-18.
- Pellicciari R, Costantino G, Marinozzi M, Natalini B. (1998) Modulation of glutamate receptor pathways in the search for new neuroprotective agents. *Il Farmaco*, 53: 255-261.
- Proksch P, Edrada A, Ebel R. (2002) Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied Microbiological Biotechnology*, 59: 125-134.
- Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X, Li Z. (2005) Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*) in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37: 195-199.
- Sangeetha R, Bhaskar N, Baskaran V. (2009) Comparative effects of β -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular Cell Biochemistry*, 331:59-67.
- Sasaki S, Tozawa T, Van Wagoner R, Ireland C, Harper M, Satoh T. (2011) Strongylophorine-8, a pro-electrophilic compound from the marine sponge *Petrosia* (*Strongylophora*) *corticata*, provides neuroprotection through Nrf2/ARE pathway. *Biochemistry Biophysic Research Community*, 415: 6-10.

- Schwartz G, Fehlings M. (2001) Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *Journal of Neurosurgery Spine*, 94: 245-256.
- Tremblay R, Hewitt K, Lesiuk H, Mealing G, Morley P, Durkin J. (1999) Evidence that Brain-Derived Neurotrophic Factor Neuroprotection Is Linked to Its Ability to Reverse the NMDA-Induced Inactivation of Protein Kinase C in Cortical Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 72: 102-111.
- Tucci P, Bagetta G. (2008) How to study neuroprotection? *Cell Death & Differentiation*, 15,1084-1085.
- Vamecq J, Maurois P, Bac P, Bailly F, Bernier JL, Stables JP, Husson I, Gressens P. (2003) Potent mammalian cerebroprotection and neuronal cell death inhibition are afforded by a synthetic antioxidant analogue of marine invertebrate cell protectant ovolithols. *European Journal of Neuroscience*, 18: 1110-1120.
- Volbracht C, van Beek J, Zhu C, Blomgren K, Leist M. (2006) Neuroprotective properties of memantine in different *in vitro* and *in vivo* models of excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience*, 23: 2611-2622.
- Wijesekara I, Yoon N, Kim S. (2010) Phlorotannins from *Ecklonia cava* (*Phaeophyceae*): Biological activities and potential health benefits. *BioFactors*, 306: 408-414.
- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S. (2010) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84: 14-21.
- Williams A, Dave J, Phillips J, Lin Y, McCabe R, Tortella F. (2000) Neuroprotective efficacy and therapeutic window of the high-affinity N-methyl-D-aspartate antagonist conantokin-G: in vitro (primary cerebellar neurons) and in vivo (rat model of transient focal brain ischemia) studies. *Journal Pharmacological Experimental Therapeutics*, 294: 378-386.
- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. (1999) Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63: 605-607.
- Youdim M, Fridkin M, Zheng H. (2005) Novel bifunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Neural Transmission*, 111: 1455-1471.
- Young A, Lowe G. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385: 20-27.
- Yu X, An L, Wang Y, Zhao H, Gao C. (2003) Neuroprotective effect of *Alpinia oxyphylla* Miq. fruits against glutamate-induced apoptosis in cortical neurons. *Toxicology Letters*, 144: 205-212.
- Zhang Q, Li N, Zhou G, Lu X, Xu Z, Li Z. (2003) In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (*Rhodophyta*) in aging mice. *Pharmacological Research*, 48: 151-155.



Productos marinos, enfermedades y fármacos: hacia una mejor integración entre ciencias marinas, nutrición y farmacología humana

Juan Carlos Carril

Genómica, EuroEspes Biotecnología, Ebiotec S.A.
15165 Bergondo, A Coruña
genomica@ebiotec.com

Resumen

El hombre, a lo largo de toda su historia evolutiva, ha interactuado y evolucionado con el medio, no sólo en busca de recursos alimenticios para su supervivencia, sino también buscando remedios que le permitan mejorar sus condiciones de vida. La evolución en las técnicas de buceo y los avances en metodología de experimentación molecular permitieron, a partir de la segunda mitad del siglo XX, comenzar a darnos cuenta del enorme potencial que tiene el mar como fuente de extraordinarios recursos nutricionales y terapéuticos. De este modo, desde el descubrimiento de los nucleósidos y prostaglandinas de origen marino en los años 50 y 70, respectivamente, la enorme batería de fármacos de origen marino no ha parado de crecer. Moléculas con actividad antitumoral, anti-inflamatoria y analgésica son las que concentran el mayor interés de la industria farmacéutica en sus esfuerzos de prospección marina.

Introducción

La riqueza y variabilidad de los diferentes ecosistemas marinos representa una inmensa fuente de nuevas y variadas moléculas con muy diversas propiedades químicas. Los metabolitos secundarios producidos por los organismos marinos, son el resultado de millones de años de evolución y selección natural. Cada día conocemos más sobre la capacidad de estas moléculas de origen marino de modular procesos biológicos, interactuando con proteínas involucradas en diferentes patrones fisiológicos y patogénicos

(Suárez-Jiménez et al., 2012). Cada vez hay más fármacos derivados de productos marinos inmersos en ensayos clínicos de fase II y fase III para el tratamiento de patologías tan dispares como cáncer, alergias, enfermedades inflamatorias y demencias (Abraham et al., 2012, D’Orazio et al., 2012).

1. De la farmacia del bosque a la farmacia del mar

En casi todas las culturas y en casi cualquier época, el hombre ha utilizado, por medio de chamanes, hombres-medicina y naturópatas, diferentes especies vegetales por sus propiedades curativas. Cualquier dolencia tiene un remedio en la sabiduría popular basado en la utilización de plantas. Remedios para calmar el dolor intestinal, dolores menstruales, inflamación, para tratar quemaduras, intoxicaciones, etc., siempre han tenido cabida en las recetas a las que podemos acudir en un herbolario. Hasta la llegada de los antibióticos, como la penicilina, la estreptomina y otros, las plantas superiores terrestres tenían, sin duda, el mayor impacto en el descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales. Por extraño que parezca, a pesar de que los océanos cubren más del 70% de la superficie de la tierra, no es hasta mediados del siglo XX que las especies marinas han atraído nuestra atención en la búsqueda de nuevos fármacos, lo que contrasta sobremanera con la importancia de las especies marinas en la nutrición humana.

Actualmente, la cuarta parte de las ventas de fármacos consiste en drogas cuyo principio activo es una molécula derivada de una especie vegetal y, adicionalmente, uno de cada ocho fármacos en el mercado se basa en metabolitos secundarios producidos por microorganismos (Carté, 1996).

La primera evidencia del potencial farmacéutico del mar llegó en 1951, cuando Bergmann y Feeney consiguieron aislar los nucleósidos spongouridina y spongotimidina de la esponja *Cryptotethya crypta* (Bergmann y Feeney, 1951). Este descubrimiento condujo más tarde a la vidarabina o Ara-A, uno de los primeros fármacos antivirales. Casi dos décadas más tarde, en 1969, Weinheimer y Spraggins consiguen aislar prostaglandinas de un coral del caribe, la gorgonia *Plexaura homomalla* (Weinheimer y Spraggins, 1969). Es en esta época cuando más relevancia cobra el estudio de las prostaglandinas como mediadores celulares de especial relevancia en la respuesta inflamatoria, función contráctil del músculo liso, regulación de la temperatura corporal y descenso de la presión arterial. Este descubrimiento sirvió, sin lugar a dudas, como un estímulo adicional en la búsqueda de nuevos fármacos en los ecosistemas marinos.

Desde estos primeros tiempos, se han aislado más de 20000 productos naturales de diferentes especies marinas (Hu et al., 2011), y para ello han debido superarse dos grandes problemas en la prospección farmacológica marina, como son la inaccesibilidad de la muestra y la disponibilidad de la misma. Los avances en las técnicas de buceo nos permiten acceder a hábitats que hasta la segunda mitad del siglo XX eran inalcanzables. Además, los avances en la metodología de análisis espectroscópico y cromatográfico, así como la aparición de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas, nos han permitido bajar a umbrales mínimos las cantidades de muestra necesaria para elucidar la estructura del compuesto estudiado, así como para realizar ensayos farmacológicos en profundidad (Scheuer, 1999).

2. Metodología en prospección farmacológica

La búsqueda de nuevas moléculas de interés farmacológico puede abordarse desde tres enfoques metodológicos bien diferenciados (Harvey, 1999): el tradicional, el empírico y el molecular.

El método tradicional o de ensayo-error se fundamenta en utilizar todo el saber acumulado por diferentes culturas a lo largo del tiempo, en la elaboración de remedios naturales con propiedades curativas. Así por ejemplo, podemos atribuir a este procedimiento metodológico el descubrimiento de la morfina y la codeína, ambas con efecto sedante, obtenidas de la amapola (*Papaver rhoeas*), la digitoxina empleada para problemas cardíacos, obtenida de la *Digitalis latana*, la quinina, que se extrae de la corteza del árbol *Cinchona ledgeriana* y se emplea contra la malaria, y la reserpina, antihipertensivo que se obtiene de la raíz de *Raulwolfia serpentina*, entre otros.

El método empírico se basa en la profunda comprensión del proceso fisiológico sobre el que queremos que el principio activo actúe, y en la función (de inhibición, bloqueo, etc.) que pretendemos que cumpla el fármaco candidato en dicho proceso. Los estudios ecológicos sobre el comportamiento de algunas especies y la utilización de sustancias producidas por ellos en su comportamiento vital, pueden ser de gran utilidad en la búsqueda de moléculas con efectos terapéuticos, como ocurre con el veneno que utilizan los caracoles del género *Conus* para cazar a sus presas y que dio lugar al aislamiento de la zicotinida y toda la batería de conopéptidos. Otros ejemplos ilustrativos podrían ser la d-tubocurarina y otros relajantes musculares, el propanolol y otros antagonistas de los receptores beta-adrenérgicos, y la cimetidina y los antagonistas de los receptores H2.

El enfoque molecular, que es el más extensamente desarrollado en la actualidad, se basa en la predicción de una estructura molecular que cumpla los requisitos funcionales que buscamos para conseguir un determinado efecto a nivel celular. En función del planteamiento inicial de búsqueda, podemos diferenciar entre la estrategia de simulación computacional, la aproximación genética y el “screening” aleatorio.

3. La variabilidad estructural como arsenal de aplicaciones terapéuticas

Los metabolitos secundarios producidos por las especies marinas presentan tanta variabilidad en su estructura molecular como variadas son las condiciones físico-químicas donde habitan dichas especies y heterogénea es la fauna y flora marinas. Muchos de estos productos candidatos son de pequeño tamaño y pueden ser absorbidos, metabolizados y excretados de manera análoga a los fármacos. La diversidad en la capacidad farmacológica está asociada a la capacidad de dichos metabolitos para reconocer productos celulares, alterar su expresión y modular su función. Por lo tanto, la identificación de los patrones celulares en los que dichos productos naturales marinos intervienen, resulta crucial para realizar la caracterización sobre el mecanismo de acción a nivel molecular. Es por ello que la construcción de bibliotecas o bases de datos de bioproductos candidatos organizados en función de la caracterización estructural, se nos antoja imprescindible para guiar la búsqueda hacia la propiedad terapéutica que resulta de interés.

Si atendemos a su estructura molecular, podemos clasificar la gran diversidad de moléculas de origen marino, con un potencial interés terapéutico, en cuatro grandes grupos: policétidos, terpenos, compuestos nitrogenados y polisacáridos.

Los policétidos son una gran familia de metabolitos secundarios producidos por bacterias, hongos, plantas y animales, estructuralmente muy diversos y que presentan variadas actividades biológicas, incluyendo antibióticas, antifúngicas, inmunosupresoras, citostáticas, anticancerígenas, antiparasitarias, anticolesterolémicas, etc. Estos compuestos se sintetizan en la naturaleza mediante un complejo enzimático sintetasa funcional, resultando como polímeros de subunidades acetilo y propionilo, de manera similar a la biosíntesis de ácidos grasos. Algunos ejemplos de policétidos ampliamente conocidos son las estatinas, macrólidos, aflatoxinas y tetraciclinas (Figura 1).

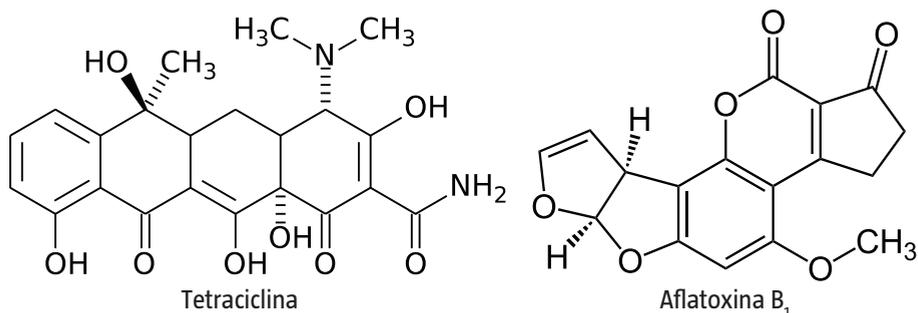


Figura 1. Tetraciclina y Aflatoxina B₁ (policétidos).

Los terpenos e isoprenoides son hidrocarburos complejos derivados del isopreno por polimerización de dos o más moléculas de éste. Algunos ejemplos son los carotenos y el retinol (vitamina A), los tocoferoles (vitamina E), las quinonas (vitamina K), el taxol y los esteroides (Figura 2).

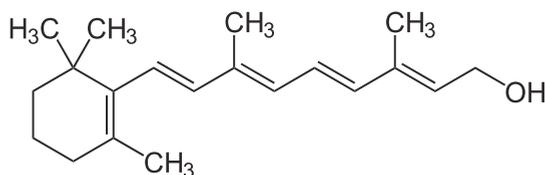


Figura 2. Vitamina A (isoprenoide).

Cuando hablamos de compuestos nitrogenados en este contexto, nos referimos fundamentalmente a péptidos, proteínas, nucleósidos y alcaloides presentes en especies marinas y con efectos fisiológicos de interés terapéutico (Figura 3).

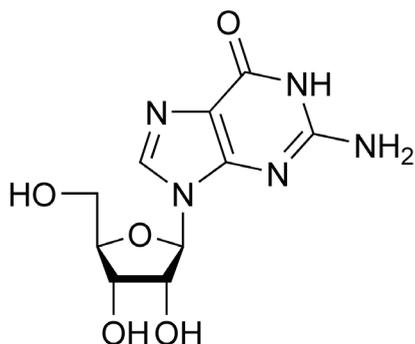


Figura 3. Guanosina (nucleósido).

El cuarto gran grupo de compuestos químicos de origen marino al que nos debemos referir es el de los polisacáridos, y en el caso que nos ocupa, se trata principalmente de elementos

estructurales más que metabolitos secundarios, de diferentes especies de microorganismos endosimbiontes a los que se les atribuyen, por lo general, propiedades antiviricas, antiinflamatorias y de efectos más o menos diversos (Figura 4).

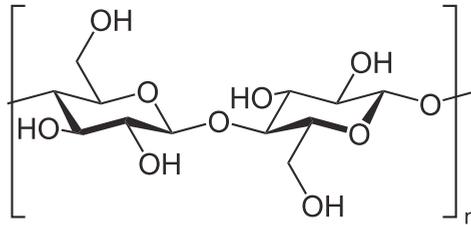


Figura 4. Celulosa (polisacárido).

4. El problema de la disponibilidad de materia prima

En contraste con el medio ambiente terrestre, donde las plantas son las fuentes más prolíficas de productos naturales, en el mar esta posición de liderazgo la ocupan diferentes invertebrados como las esponjas, tunicados, briozoos y moluscos, lo que refleja una adaptación ecológica que ha tenido lugar durante la evolución, permitiendo a estos organismos delicados sobrevivir y prosperar a pesar de la presión selectiva de peces y otros depredadores (Proksch y Ebel, 1998, Proksch, 1999, Schupp et al., 1999, McClintock y Baker, 2001).

A pesar de que el mar cada vez se postula como una mejor fuente de candidatos a fármacos ciertamente prometedores, nos encontramos con la dificultad añadida que supone la disponibilidad de materia prima. Si bien la riqueza existente en los diferentes hábitats marinos resulta incuestionable, su accesibilidad, sobre todo en los volúmenes necesarios para su explotación comercial, hacen de la pesca extractiva una estrategia, en muchos casos, inadecuada.

Una estrategia alternativa sería el cultivo en ambientes controlados de especies de interés, y en algunos casos se está acometiendo con éxito, como ocurre con algunas especies de esponjas y cnidarios (Mendola, 2000, Mutter y Wills, 2000), el caso del tunicado *E. turbinata*, fuente natural de la ET 743, que es el principio activo de Yondelis™, así como con la *Bugula neritina*, que es el briozoo del que se extraen las briostatinas (Mendola, 2000). En cualquier caso, actualmente, la explotación en piscifactorías de estas especies se antoja insuficiente ante una posible demanda de grandes cantidades de materia prima requeridas en la industria farmacéutica.

Una tercera vía, muy prometedora, hace referencia a la naturaleza endosimbionte de muchos de los microorganismos de los que se obtienen estos compuestos (Proksch et al., 2002). La mayoría de los invertebrados marinos analizados hasta la fecha presentan microorganismos tales como cianobacterias, microalgas y hongos asociados a ellos, los denominados endosimbiontes, que coexisten con los huéspedes ocupando espacios intra y extracelulares (Vacelet y Donadey, 1977, Wilkinson, 1992). En algunos casos pueden llegar a suponer más del 40% de la biomasa total del espécimen, como ocurre con la esponja *Aplysina aerophoba*.

El análisis comparado de las moléculas aisladas de muchas esponjas, tunicados y otros invertebrados marinos, consideradas como metabolitos secundarios producidos por éstos, muestra grandes similitudes estructurales con compuestos sintetizados por microalgas y bacterias, por lo que bien podrían ser dichos microorganismos los verdaderos productores de estos metabolitos (Proksch et al., 2002). El desarrollo biotecnológico de procesos de fermentación industrial mediante la creación de microorganismos recombinantes capaces de sintetizar la molécula en cuestión, bien podría ser la alternativa más válida y viable para superar las limitaciones actualmente existentes en cuanto a la disponibilidad de materia prima de la que obtener el principio activo de interés farmacéutico.

5. La búsqueda de quimioterápicos en el mar

Actualmente existe una amplia batería de quimioterápicos para tratar de forma individual o combinada los distintos tipos de tumores. No obstante, incluso en pacientes que comienzan respondiendo adecuadamente a los tratamientos, es frecuente el desarrollo de resistencia adquirida conocida, en última instancia, como MDR ("Multidrug resistance"), y que está fundamentalmente relacionada con los transportadores ABC y con su capacidad para transportar los citotóxicos a través de la membrana celular. La aparición de este tipo de resistencias, así como la existencia de tumores para los que no existen tratamientos realmente efectivos, hacen que la oncología mire ávidamente hacia la potencial despensa terapéutica que significa la farmacología marina.

De las más de 20000 moléculas de origen marino con potencialidad terapéutica descritas hasta la fecha, unas 150 han evidenciado propiedades citotóxicas frente a células tumorales, y al menos una docena de ellas están inmersas en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (Haefner 2003) (Tabla 1):

Compuesto	Organismo	Clase Química
Agosterol A (AGA-A)	<i>Spongia spp.</i>	Esterol polihidroxiado
Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i>	Lactona macrocíclica
Citarabina (Ara-C)	<i>Cryptotethya crypta</i>	C-nucleósidos
Gemcitabina		
Ecteinascidina 743 (ET-743)	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Tetrahidroquinolona (Alcaloide)
Eribulina	<i>Halichondria okadai</i>	Cetona macrocíclica
Sifonolol A	<i>Callyspongia siphonella</i>	Triterpenoides
Sifolenona E		
Sifolenol L		
Sifonelinol D		
N-metil-welwitindolina C		Alcaloide

Tabla 1. Bioproductos marinos con capacidad de revertir la multirresistencia a quimioterápicos en células tumorales (extraído de Abraham et al. 2012).

Agosterol A (AG-A): El agosterol A es un esteroide polihidroxiado aislado de la esponja marina del género *Spongia spp.* (Foto 1) (Aoki et al., 1998), que inhibe el crecimiento de células tumorales MDR que sobreexpresan P-gp (ABCB1), mientras que no presenta citotoxicidad frente a células parentales KB-3-1. A partir del extracto de la esponja también se han aislado los análogos agosterólicos A₄, A₅, B, C, C₆ y D₂ (Aoki et al., 1999). El papel evidenciado por el agosterol A es su capacidad mediadora en la desaparición de la resistencia de las células MDR a quimioterápicos tales como la vincristina, colchicina, doxorubicina y etopósido (Aoki et al., 2001).



Foto 1. *Spongia spp.*

Briostatina 1: Se trata de una lactona macrocíclica aislada del briozoo marino *Bugula neritina* (Foto 2), con capacidad como agente antitumoral al modular la actividad enzimática de la proteína quinasa C (PKC) (Pettit, 1991). Existen evidencias de que la actividad transportadora de la P-gp se incrementa mediante una fosforilación mediada por PKC (Chambers et al., 1990). La briostatina 1 revierte la resistencia a la vinblastina y a la colchicina en líneas celulares tumorales HeLa-MDR1-V185, es decir, con valina en lugar de glicina en la posición aminoacídica 185 de la P-gp (Spitaler et al., 1998).

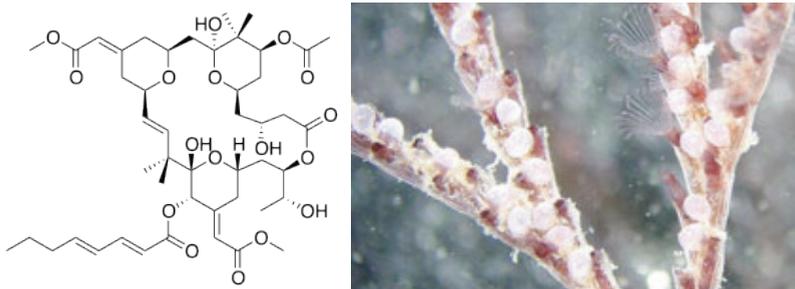


Foto 2. Estructura química de la Briostatina 1, extraído del briozoo marino *Bugula neritina*

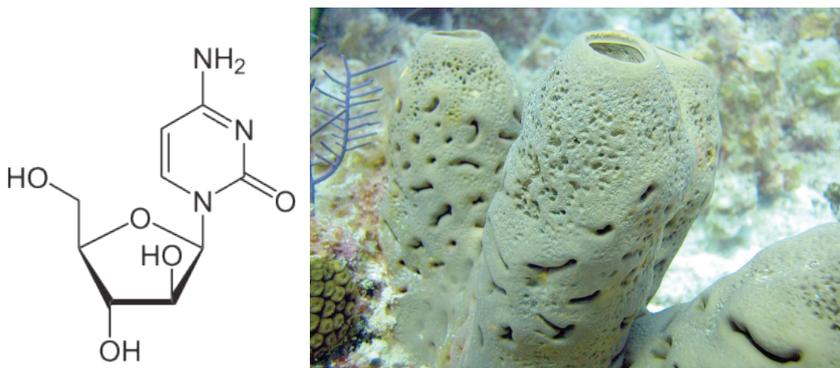


Foto 3. Estructura química de la Citarabina, extraído de la esponja *Cryptotethya crypta*

Citarabina (Ara-C) y Gemcitabina: El aislamiento de los C-nucleósidos de la esponja *Cryptotethya crypta* (Foto 3) hace 60 años (Bergmann y Feeney, 1951), proporcionó las bases para la síntesis de la citarabina, el primer antineoplásico de origen marino desarrollado para uso clínico en pacientes con leucemia y linfoma. Más recientemente, el derivado fluorado de la citarabina, la gemcitabina, ha mostrado una gran actividad en pacientes con tumores sólidos como el cáncer de páncreas, de mama, de vejiga y de pulmón (Schwartzmann, 1999).

La citarabina afecta sólo a las células durante la fase S de la división celular. En el interior de la célula, la citarabina (ara-C) es convertida en citarabina 5'-trifosfato (ara-CTP), que es el metabolito activo. El mecanismo de acción no se comprende totalmente, pero parece ser que ara-CTP actúa fundamentalmente a través de la inhibición de la síntesis de ADN. La incorporación de ese análogo nucleósido al ADN y ARN es lo que le confiere la capacidad citotóxica.

Por otra parte, la gemcitabina, se metaboliza intracelularmente a dos nucleósidos, ambos con actividad citotóxica por inhibición de la síntesis de ADN, lo que parece inducir la muerte celular o apoptosis.

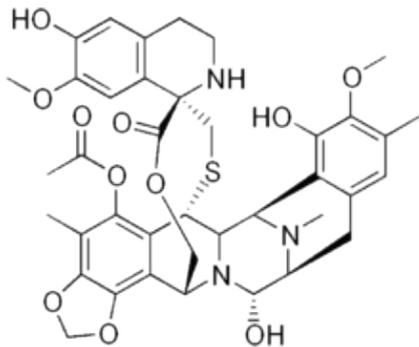


Foto 4. Estructura química de la Trabectidina, extraído de la ascidia *Ecteinascidia turbinata*

Ecteinascidin 743 (ET-743) o Trabectidina: Las ecteinascidinas son alcaloides tetrahydroquinolonas purificadas a partir del extracto acuoso del tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Foto 4) con una potente actividad anticancerígena (Rinehart et al., 1990, Wright et al., 1990), de entre las que destaca ET-743 como su principal metabolito. El fundamento de su capacidad citotóxica radica en interferir en los mecanismos de reparación del ADN durante la transcripción debido a que se une selectivamente a la guanina provocando una deformación de la hélice de ADN, alterando el ciclo celular y dando lugar a la apoptosis o muerte de las células tumorales (Newman y Cragg, 2004).

En general, la mejor respuesta a ET-743 obtenida en los ensayos de fase I se ha encontrado en pacientes con tumores avanzados de mama, ovario y mesenquimáticos, tratados previamente con platino y taxanos (Amador et al., 2003). En los ensayos de fase II, los mejores resultados se han obtenido en sarcoma de tejidos blandos y cáncer de mama y ovario, habiendo recibido el estatus de fármaco huérfano para sarcoma de tejidos blandos en USA y para cáncer de ovario recurrente tanto en USA como en Europa (Carter y Keam, 2007).

Eribulina: Los microtúbulos, formados por la polimerización de la proteína celular tubulina, juegan un papel fundamental en el proceso de división celular, por lo que, interferir en la función de esta proteína, es una estrategia anticancerígena para provocar la muerte celular por apoptosis (Kingston, 2009).

El mesilato de eribulina es un inhibidor de la formación de microtúbulos desarrollado a partir de la Halichondrina A, que se obtiene de la esponja *Halichondria okadai* (Hirata y Ohya, 1986) y del género *Axinella spp.* (Foto 5) (Pettit et al., 1991). La Halichondrina A ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de la tubulina sin tener efecto sobre el acortamiento de los microtúbulos (Bai et al., 1991), y también secuestra la tubulina para formar agregados no funcionales (Jordan et al., 2005).

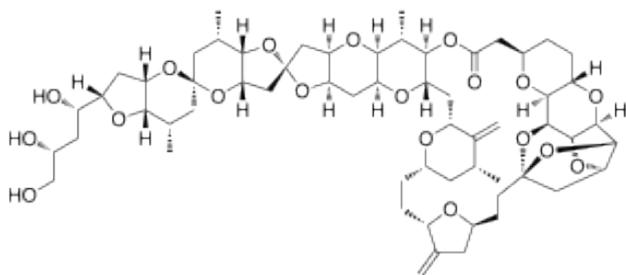


Foto 5. Estructura química de la Eribulina, extraído de la esponja *Halichondria okadai*.

Triterpenoides sifolánicos: Aislados de la esponja del mar rojo *Callyspongia siphonella* (Foto 6). Se trata de una clase de terpenoides con un sistema perhidrobenzoxepina (anillos A y B) unido a un [5,3,0]biciclodecano unidos por un puente de etileno (Shi et al., 2007). De los más de 30 terpenoides aislados de esta esponja, los cuatro más importantes son sifolenol A, sifolenona E, sifolenol L y sifolenilol D (Jain et al., 2007, 2009).



Foto 6. Esponja *Callyspongia siphonella*.

El sifolenol A revierte la capacidad de multirresistencia a drogas mediada por P-gp de células tumorales KB-C2 y KB-V1 MDR, incrementando la citotoxicidad de quimioterápicos como la colchicina, vinblastina y paclitaxel (Shi et al., 2007). Esto convierte a los triterpenoides sifolánicos como una nueva clase de moléculas con capacidad para revertir la multirresistencia a drogas, candidatos para terapias anticancerígenas combinadas.

Welwitindolinonas: Se trata de una familia de alcaloides aislados de la cianobacteria *Hapalosiphon welwitschii*, con capacidad para revertir la multirresistencia a quimioterápicos mediada por P-gp (Smith et al., 1995).

De los tres derivados conocidos, parece ser el isotiocianato de N-metilwelwitindolinona C, el más potente de los moduladores de la actividad de P-gp por su capacidad para provocar la acumulación de vinblastina, paclitaxel y azidopina en células tumorales multirresistentes (Smith et al., 1995).

6. Antimicrobianos de origen marino

Debido a la gran diversidad de especies existentes en el mar, y a la variabilidad de condiciones físico-químicas que nos encontramos, es fácil prever que, a lo largo de la evolución, se han debido originar multitud de sustancias antiinfecciosas que prevengan frente a ataques bacterianos y víricos. La mayoría de estas moléculas antimicrobianas son pequeños péptidos codificados por un único gen que se suelen denominar AMPs (“antimicrobial peptides”) (Brahmachary et al., 2004, Wang y Wang, 2004, Thomas et al., 2010):

Péptidos lineales α -helicoidales: Se trata de estructuras lineales pequeñas con segregación espacial de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos que adoptan una conformación alfa-helicoidal cuando interactúan con membranas bacterianas.

Categorías de AMPs	Familia (Organismo)	Actividad
Péptidos lineales alfa-helicoidales	Clavaninas (ascidia)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Dicintaurina (ascidia)	Gram+, Gram-, Hemolítica
	Halocintina (ascidia)	Gram+, Gram-
	Papilosina (ascidia)	Gram+, Gram-
	Piscidinas (pez)	Gram+, Gram-, Fungicida, Hemolítica
	Stielinas (ascidia)	Gram+, Gram-, Fungicida
Péptidos ricos en cisteína	Catelicidinas (pez)	Gram+, Gram-
	LEAPs (pez)	Gram-, Fungicida
	Taquiplesinas (cangrejo)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Polifemusinas (cangrejo)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Aurelina (medusa)	Gram+, Gram-
	Defensinas (cangrejo)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Peneidinas (gamba)	Gram+, Gram-, Fungicida, Unión a quitina
	Strongilocinas (erizo de mar)	Gram+, Gram-
	Taquistatina (cangrejo)	Gram+, Gram-, Fungicida, Hemolítica, Unión a quitina
	Defensinas (molusco)	Gram+, Gram-, Fungicida
	LEAPs (pez)	Gram-, Fungicida
	Miticinas (molusco)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Mitilinas (molusco)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Crustinas (cangrejo)	Gram+
Taquicina (cangrejo)	Gram+, Gram-, Fungicida, Unión a quitina	
Péptidos catiónicos, enriquecidos en aminoácidos	Arasina-1 (cangrejo)	Gram+, Gram-
	Bac-like (cangrejo)	Gram+, Gram-
	Cg-prp (ostra)	Sinergia con defensiva
	Hiastatina (cangrejo)	Gram+, Gram-, Fungicida, Unión a quitina
	Peneidinas (gamba)	Gram+, Gram-, Unión a quitina
Miscelánea	Arenicina (poliqueto)	Gram+, Gram-, Fungicida
	Hedistina (poliqueto)	Gram+, Gram-
	Perinerina (poliqueto)	Gram+, Gram-, Fungicida

Tabla 2. Distribución de familias de péptidos en categorías estructurales (extraído de Smith et al. 2010)

Si bien este tipo de AMPs son muy frecuentes en la naturaleza terrestre, en animales marinos se encuentran fundamentalmente en ascidias (tunicados) y peces.

Los péptidos alfa-helicoidales de ascidias incluyen las clavaninas y las stielinas (Tabla 2), ambos tipos de moléculas aisladas de la *Styela clava* (Lee et al., 1997a,b). Las cuatro clavaninas descritas hasta la fecha poseen una actividad antimicrobiana de amplio espectro, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*) y Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*), así como del hongo *Candida albicans* (Lee et al., 1997). De las cinco stielinas actualmente conocidas, dos se purificaron directamente de *Styela clava* y las otras tres fueron identificadas mediante metodologías moleculares (Zhao et al., 1997).

La primera familia de AMPs alfa-helicoidales aislada de un pez fue la de las pardaxinas, aisladas del *Pardachirus marmoratus*, y se les atribuyeron propiedades citotóxicas (Lazarovici et al., 1986, Thompson et al., 1986), como toxinas con propiedades antipredatorias, pero más adelante se evidenció su capacidad antimicrobiana tanto Gram-positiva como Gram-negativa (Oren et al., 1996). Otras familias de péptidos alfa-helicoidales con capacidad antimicrobiana son las pleurocicinas, aisladas de *Pleuronectes americanus* (Cole et al., 1997), y las piscidinas, obtenidas del híbrido entre *M. Saxatilis* y *M. chrysops* (Noga y Silphaduang, 2003) y cuya actividad microbiocida parece atribuirse a su capacidad de formar poros de membrana.

Péptidos ricos en cisteína: Presentes en moluscos bivalvos, crustáceos decápodos y peces. El grupo más representativo de AMPs ricos en cisteína son las defensinas, con láminas beta características y seis cisteínas que forman tres uniones disulfuro (Ganz, 2003). Las taquiplesinas, polifemusinas, taquistatinas, defensina y taquicitina se aislaron de los cangrejos *Tachypleus tridentatus* y *Limulus polyphemus* (Iwanaga, 2002). El mecanismo de acción de las taquiplesinas consiste en unirse a los lipopolisacáridos de la membrana bacteriana interna y alterar la permeabilidad del potasio (Katsu et al., 1993).

De los mejillones *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* se han extraído diversos AMPs ricos en cisteína como las defensinas, miticinas, mitilinas y mitimicina, que son principalmente activos como bacterias Gram-positivas (Li et al., 2009, Romestand et al., 2003).

Los AMPs ricos en cisteína obtenidos de peces teleósteos se agrupan en tres familias: catelicidinas, defensinas y LEAPs (péptidos antimicrobianos expresados en hígado) (Smith y Fernandes, 2009).

Péptidos catiónicos, enriquecidos en aminoácidos: Entre los que podemos incluir el péptido "Bac-like" rico en prolina aislado del cangrejo *Carcinus maenas* (Schnapp et al., 1996) y

la secuencia parcial rica en prolina de la calinectina del cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Khoo et al., 1999). Del cangrejo araña *Hyas arenaeus* se ha aislado la aracina y la hiastatina (Stensvåg et al., 2008).

Otros antimicrobianos no convencionales: Además de los antimicrobianos convencionales, existe una gran variedad de factores producidos por organismos eucariotas que no se clasifican habitualmente como moléculas de relevancia inmune pero que han demostrado tener una potente actividad antimicrobiana. En este grupo podemos encontrar fragmentos de la histona H2A de algunos peces con una demostrada capacidad antimicrobiana, como la parasina-1 aislada del pez gato *Parasilurus asetu* (Park et al., 1998), la hipposina del *Hippoglossus hippoglossus* (Birkemo et al., 2003), y también fragmentos de H2A de la viera *Chlamys farreri* (Li et al., 2007) y de la almeja *Litopenaeus vannamei* (Patat et al., 2004).

Otras moléculas con actividad antimicrobiana aisladas de organismos marinos son ácidos grasos libre, oxilipinas, pigmentos, toxinas formadoras de poros, neuropéptidos, lectinas y moléculas de unión.

7. Compuestos marinos con actividad anti-inflamatoria

Las estrategias para aliviar y contrarrestar la inflamación juegan un papel fundamental en el tratamiento de diversas enfermedades como pueden ser la artritis reumatoide, diabetes, enfermedades cardíacas, alergias, asma, Alzheimer, Parkinson e incluso cáncer. Productos tales como los aceites *n*-3, carotenoides, vitaminas, minerales y péptidos han demostrado una amplia variedad de ventajas para la salud como son sus propiedades cardio-saludables, anticancerígenas y anti-inflamatorias.

Los aceites de pescado y algunas bacterias marinas son reconocidas fuentes de ácidos grasos omega-3, de gran importancia en el tratamiento del dolor articular en la artritis (Suput, 2009, Blunt et al., 2012), las algas y crustáceos proporcionan potentes antioxidantes, como carotenoides y compuestos fenólicos (Jean et al., 2008). De este modo, contamos en la actualidad con una batería de nuevas moléculas de origen marino con propiedades anti-inflamatorias, como inhibidores de la COX (pacifenol, epitaondiol, stipotriol), esteroides marinos (contignasterol, xestobergesterol, clatriol B), moléculas que interfieren con NF-κB (cicloprodigosina, himenialdisina, cicloanfilectenos), macrólidos, péptidos (ciclomarinas, salinamidas, halipeptinas), otros metabolitos (scitonemina, petrocortina) y muchos agentes antioxidantes, fenoles y carotenoides marinos, como la astaxantina y la fucoxantina (Tabla 3).

Clase Farmacológica	Compuesto	Clase Química	Organismo
Inhibidores COX	Pacifenol	Terpenoides	<i>Laurencia claviformis</i>
	Epitaondiol	Terpenoides	<i>Styopodium flabelliforme</i>
	Styoptriol	Terpenoides	<i>Styopodium flabelliforme</i>
Esteroides	Contignasterol	Esteroides	<i>Petrosia contignata</i>
	Xestobergsterol	Esteroides	<i>Xestospongia bergquisita</i>
	Clatrioles	Esteroides	<i>Clathria lissosclera</i>
Moduladores de NF-kB	Cicloprodigosina	Carotenoides	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>
	Himentialdisina	Alcaloides	<i>Acanthella aurantica</i>
Macrólidos	Aplisiatoxinas	Macrólidos	<i>Stylocheilus longicauda</i>
	Loboforinas	Macrólidos	<i>Lobophora variegata</i>
	Latrunculinas	Macrólidos	<i>Latrunculia magnifica</i>
	Aplironinas	Macrólidos	<i>Aplysia kurodai</i>
	Dolastatinas	Macrólidos	<i>Dollabella auricularia</i>
	Scitoficinas	Macrólidos	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>
	Sfinxolidas	Macrólidos	<i>Neosiphonia superstes</i>
Péptidos	Ciclomarinas	Péptidos	<i>Streptomyces spp.</i>
	Salinamidas	Péptidos	<i>Streptomyces spp.</i>
	Halipectinas	Péptidos	<i>Haliclona spp.</i>
Otros metabolitos	Petrocortinas	Poliacetilos	<i>Petrosia spp.</i>
	Scitonemina	Alcaloides	<i>Cyanobacteria spp.</i>
Antioxidantes	Astaxantina	Carotenoides	<i>Haematococcus pluvialis</i>
	Fucoxantina	Carotenoides	<i>Undaria pinnatifida</i>

Tabla 3. Bioproductos marinos con capacidad anti-inflamatoria y antioxidante (extraído de D'Orazio et al. 2012)

8. Las conotoxinas y su potencial terapéutico sobre el SNC

Los venenos desarrollados por depredadores han sido históricamente de gran interés en farmacología y medicina por la capacidad terapéutica de muchas de estas toxinas. Los caracoles marinos del género *Conus*, con más de 500 especies conocidas, presentan una batería de casi 200 péptidos tóxicos conocidos como conotoxinas (Olivera et al., 1990, Terlau y Olivera, 2004).

La mayoría de las conotoxinas conocidas hasta la fecha se unen a receptores y canales iónicos asociados con tejido muscular y nervioso: receptores serotoninérgicos tipo 3 (England et

al. 1998) , de N-metil-D-aspartato (Jimenez et al., 2002, Haack et al., 1990, McIntosh et al., 1984, White et al., 2000), nicotínicos (Myers et al., 1991), alfa-adrenérgicos (Sharpe et al., 2003), de neurotensina (Craig et al., 1999), de vasopresina (Cruz et al., 1987), canales iónicos de calcio, sodio y potasio (McIntosh et al., 1995, Cruz et al., 1989, Olivera et al., 1984, McCleskey et al., 1987, Shon et al., 1998, Craig et al., 1998), así como al transportador de norepinefrina (Sharpe et al., 2003) (Tabla 4).

Compuesto	Secuencia aminoacídica	Especie
MVIIA (Prialt [®])	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK	<i>Conus magus</i>
CVID (AM336)	CKSKGAKCSKLMYDCCSGSCSGTVGRC	<i>Conus catus</i>
Contulaquina-G (CGX-1160)	ZSEEGGSNATKKPYIL	<i>Conus geographus</i>
MrIA (Xen-2174)	NGVCCGYKLCHOC	<i>Conus marmoreus</i>
Conatoquina-G (CGX-1007)	GEXXLQXNQXLIRXKSN	<i>Conus geographus</i>
Vc1.1 (ACV-1)	GCCSDPRCNYDHPEIC	<i>Conus victoriae</i>
MrVIB (CGX-1002)	ACSKKWEYCIVPILGFVYCCPGLICGPFVVCV	<i>Conus marmoreus</i>

Tabla 4. Secuencias aminoacídicas de conopéptidos analgésicos (extraído de Layer y McIntosh 2006)

La selectividad farmacológica de las conotoxinas, unida a la seguridad y eficacia demostradas en modelos preclínicos de analgesia (Basbaum y Jessell, 2000), desórdenes convulsivos (White et al., 2000, Armstrong et al., 1998), ictus (Miljanich, 2004, Lees, 1997, Dawson et al., 2001), bloqueo neuromuscular (McIntosh et al., 1999, Groebe et al., 1995, 1997, Hann et al. 1994, 1997) y cardioprotección (Shon et al., 1998, Terlau et al., 1996, 1999), los convierte en moléculas de gran interés por parte de la industria farmacéutica.

9. Fucoxantina y síndrome metabólico

La fucoxantina es un característico carotenoide presente en diversas algas pardas como el wakame (*Undaria pinnatifida*), hijiki (*Hijikia fusiformis*), ma-kombu (*Laminaria japonica*) y el sargazo (*Sargassum fulvellum*). Pertenece al grupo de los carotenoides no precursores de vitamina A, donde encontramos los xantófilos, como la fucoxantina, y los carotenos, con propiedades antioxidantes reconocidas (Hu et al., 2011, Kuipers et al., 2011).

Como otros carotenoides, la fucoxantina es un potente antioxidante que protege a las células de los radicales libres (Sachindra et al., 2007, Yan et al., 1999). Una dieta rica en fucoxantina ayuda a reducir la acumulación de grasa corporal y a modular los niveles de glucosa e insulina

en sangre, mediante la regulación de la secreción de citoquinas en el tejido adiposo blanco (Okada et al., 2011, Dalgard y Pedersen, 2001, Maeda et al., 2007, 2009).

La fucoxantina se ha demostrado segura y sin efectos secundarios en modelos animales, con probados beneficios para la salud, como la mejora en la salud cardiovascular, reducción de la inflamación, regulación de los niveles de colesterol y triglicéridos, capacidad de regulación de la presión arterial y mejora en la función renal (Tsukui et al., 2007), además de tener efectos demostrados como agente quelante de metales pesados y toxinas (Perugini et al., 2006, Zaccaroni et al., 2006). Estos hallazgos postulan a esta alga parda como un excelente alimento funcional para combatir la obesidad y la diabetes (Woo et al., 2009).

Referencias

- Abraham I., El Sayed K., Chen Z.S., Guo H. (2012) Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Marine Drugs*, 10: 2312-2321.
- Amador M.L., Jimeno J., Paz-Ares L., Cortes-Funes H., Hidalgo M. (2003) Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Annals of Oncology*, 14: 1607-1615.
- Aoki S., Chen Z.S., Higasiyama K., Setiawan A., Akiyama S., Kobayashi M. (2001) Reversing effect of agosterol A, a spongean sterol acetate, on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 92: 886-895.
- Aoki S., Setiawan A., Yoshioka Y., Higuchi K., Fudetani R., Chen Z.S., Sumizawa T., Akiyama S., Kobayashi M. (1999) Reversal of multidrug resistance in human carcinoma cell line by agosterols, marine spongean sterols. *Tetrahedron*, 55: 13965-13972.
- Aoki S., Yoshioka Y., Miyamoto Y., Higuchi K., Setiawan A., Murakami N., Chen Z.S., Sumizawa T., Akiyama S., Kobayashi, M. (1998) Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Letters*, 39: 6303-6306.
- Armstrong H., Zhou L.M., Layer R.T., Nielsen J., McCabe R.T., White H.S. (1998) Anticonvulsant profile of conantokin-G (Con-G): A novel, broad-spectrum NMDA antagonist. *Epilepsia*, 39: 39-40.
- Bai R.L., Paull K.D., Herald C.L., Malspeis L., Pettit G.R., Hamel E. (1991) Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 15882-15889.
- Basbaum A.I., Jessell T.M. (2000) *The Perception of Pain. Principles of Neural Science*, Fourth ed., McGraw-Hill: New York, pp 472-491.
- Bergmann R., Feeney. (1951) *Journal of Organic Chemistry*, 16: 981.
- Birkemo G.A., Luders T., Andersen O., Nes I.F., Nissen-Meyer J. (2003) Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochimica Biophysica Acta*, 1646: 207-215.
- Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H., Prinsep M.R. (2012) Marine natural products. *Natural Products Report.*, 29: 144-222.

- Brahmachary M., Krishnan S.P.T., Koh J.L.Y., Khan A.M., Seah S.H., Tan T.W., Brusic T.W., Bajic T.W. (2004) ANTIMIC: A database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Research*, 32: D586-D589.
- Carté B.K. (1996) Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, 46: 271-286.
- Carter N.J., Keam S.J. (2007) Trabectedin: A review of its use in the management of soft tissue sarcoma and ovarian cancer. *Drugs*, 67: 2257-2276.
- Chambers T.C., McAvoy E.M., Jacobs J.W., Eilon G. (1990) Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 7679-7686.
- Cole A.M., Weis P., Diamond G. (1997) Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 12008-12013.
- Cragg GM, Newman DJ. (1999) Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*, 17: 153-163.
- Craig A.G., Norberg T., Griffin D., Hoeger C., Akhtar M., Schmidt K., Low W., Dykert J., Richelson E., Navarro V., Mazella J., Watkins M., Hillyard D., Imperial J., Cruz L.J., Olivera B.M. (1999) Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 13752-13759.
- Craig A.G., Zafaralla G., Cruz L.J., Santos A.D., Hillyard D.R., Dykert J., Rivier J.E., Gray W.R., Imperial J., Delacruz R.G., Sporning A., Terlau H., West P.J., Yoshikami D., Olivera B.M. (1998) An O-Glycosylated Neuroexcitatory Conus Peptide *Biochemistry*, 37: 16019-16025.
- Cruz L.J., de Santos V., Zafaralla G.C., Ramilo C.A., Zeikus R., Gray W.R., Olivera B.M. (1987) Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 15821-15824.
- Cruz L.J., Kupryszewski G., LeCheminant G.W., Gray W.R., Olivera B.M., Rivier J. (1989) μ -conotoxin GIIIA, a peptide ligand for muscle sodium channels: chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *Biochemistry*, 28: 3437-3442.
- D’Orazio N., Gammone M.A., Gemello E., De Girolamo M., Cusenza S., Riccioni G. (2012) Marine bioactives: pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. *Marine Drugs*, 10: 812-833.
- Dalgaard L.T., Pedersen O. (2001) Uncoupling proteins: Functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and type II diabetes. *Diabetologia*, 44: 946-965.
- Dawson D.A., Wadsworth G., Palmer A.M. (2001) A comparative assessment of the efficacy and side-effect liability of neuroprotective compounds in experimental stroke. *Brain Research*, 892: 344-350.
- England L.J., Imperial J., Jacobsen R., Craig A.G., Gulyas J., Akhtar M., Rivier J., Julius D., Olivera B.M. (1998) Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science*, 281: 575-578.
- Ganz, T. (2003) The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and Comparative Biology*, 43: 300-304.
- Groebe D.R., Dumm J.M., Levitan E.S., Abramson S.N. (1995) alpha-Conotoxins selectively inhibit one of the two acetylcholine binding sites of nicotinic receptors. *Molecular Pharmacology*, 48: 105-111.

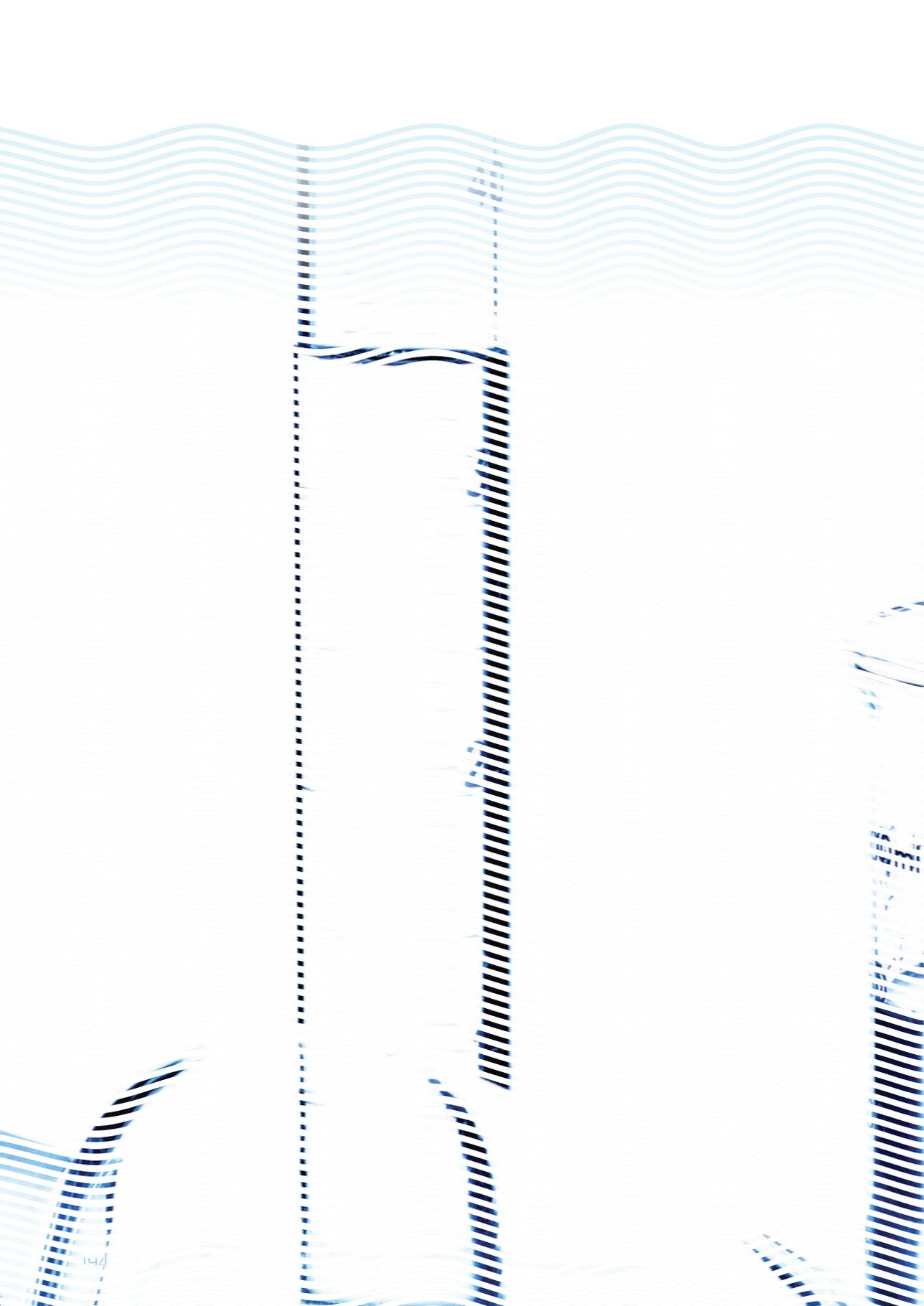
- Groebe D.R., Gray W.R., Abramson S.N. (1997) Determinants involved in the affinity of alpha-conotoxins GI and SI for the muscle subtype of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, 36: 6469-6474.
- Haack J.A., Rivier J., Parks T.N., Mena E.E., Cruz L.J., Olivera B.M. (1990) Conantokin-T. A gamma-carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-D-aspartate antagonist activity. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 6025-6029.
- Haefner B. (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8: 536-544.
- Hann R.M., Pagan O.R., Eterovic V.A. (1994) The alpha-conotoxins GI and MI distinguish between the nicotinic acetylcholine receptor agonist sites while SI does not. *Biochemistry*, 33: 14058-14063.
- Hann R.M., Pagan O.R., Gregory L.M., Jacome T., Eterovic V.A. (1997) The 9-arginine residue of alpha-conotoxin GI is responsible for its selective high affinity for the alphagamma agonist site on the electric organ acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 36: 9051-9056.
- Harvey A. (1999). Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *TIPS*, 20: 196-198.
- Hirata Y, Ohya S. (1986) Halichondrins: antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure and Applied Chemistry*, 58: 701-710.
- Hu F.B., Liu Y., Willett W.C. (2011) Preventing chronic diseases by promoting healthy diet and lifestyle: Public policy implications for China. *Obesity Reviews*, 12: 552-559.
- Hu G.P., Yuan J., Sun L., She Z.G., Wu J.H., Lan X.J., Zhu X., Lin Y.C., Chen S.P. (2011) Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9: 514-525.
- Iwanaga S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current Opinion in Immunology*, 14: 87-95.
- Jain S., Abraham I., Carvalho P., Kuang Y.H., Shaala L.A., Youssef D.T., Avery M.A., Chen Z.S., El Sayed K.A. (2009) Sipholane triterpenoids: Chemistry, reversal of ABCB1/ P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, and pharmacophore modeling. *Journal of Natural Products*, 72: 1291-1298.
- Jain S., Laphookhieo S., Shi Z., Fu L.W., Akiyama S., Chen Z.S., Youssef D.T., van Soest R.W., El Sayed K.A. (2007) Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by sipholane triterpenoids. *Journal of Natural Products*, 70: 928-931.
- Jean Y.H., Chen W.F., Duh C.Y., Huang S.Y., Hsu C.H., Lin C.S., Sung C.S., Chen I.M., Wen Z.H. (2008) Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory and analgesic effects of the natural marine compound lemnalol from Formosan soft coral *Lemnalia cervicorni*. *European Journal of Pharmacology*, 578: 323-331.
- Jimenez E.C., Donevan S., Walker C., Zhou L. M., Nielsen J., Cruz L.J., Armstrong H., White H.S., Olivera B.M. (2002) Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency. *Epilepsy Research*, 51: 73-80.
- Jordan M.A., Kamath K., Manna T., Okouneva T., Miller H.P., Davis C., Littlefield B.A., Wilson L. (2005) The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Molecular Cancer Therapy*, 4: 1086-1095.

- Katsu T., Nakao S., Iwanaga S. (1993) Mode of action of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, on biomembranes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16: 178-181.
- Khoo L., Robinette D.W., Noga N.J. (1999) Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Marine Biotechnology*, 1: 44-51.
- Kingston DG. (2009) Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *Journal of Natural Products*, 72: 507-515.
- Kuipers R.S., de Graaf D.J., Luxwolda M.F., Muskiet M.H., Dijck-Brouwer D.A., Muskiet F.A. (2011) Saturated fat, carbohydrates and cardiovascular disease. *Netherlands Journal of Medicine.*, 69: 372-378.
- Lazarovici P., Primor N., Loew L.M. (1986) Purification and pore-forming activity of two polypeptides from the secretion of the Red Sea Moses sole (*Pardachirus marmoratus*). *Journal of Biological Chemistry*, 261: 16704-16713.
- Lee I.H., Cho Y., Lehrer R.I. (1997) Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comparative Biochemical Physiology*, 118: 515-521.
- Lee I.H., Zhao C., Cho Y., Harwig S.S., Cooper E.L., Lehrer R.I. (1997) Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Letters*, 400: 158-162.
- Lees K.R. (1997) Cerestat and other NMDA antagonists in ischemic stroke. *Neurology*, 49: S66-S69.
- Li C.H., Song L.S., Zhou J.M., Zhu L., Zhang H., Wang H., Cai Z.H. (2007) Preliminary study of potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop, *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 663-672.
- Li C.H., Zhou J.M., Song L.S. (2009) A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. *Mollusca Research*, 29: 17-26.
- Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Miyashita K. (2007) Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7701-7706.
- Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Murakami-Funayama K., Miyashita K. (2009) Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports*, 2: 897-902.
- McCleskey E.W., Fox A.P., Feldman D.H., Cruz L.J., Olivera B.M., Tsien R.W., Yoshikami D. (1987) Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proceedings of Natural Academy of Sciences U.S.A.*, 84: 4327-4331.
- McClintock J.B., Baker B.J. (Eds.), *Marine Chemical Ecology*, CRC, Boca Raton, FL (2001).
- McIntosh J.M., Hasson A., Spira M.E., Gray W.R., Li W., Marsh M., Hillyard D.R., Olivera B.M. (1995) A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 16796-16802.
- McIntosh J.M., Olivera B.M., Cruz L.J., Gray W.R. (1984) Gamma-carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 14343-14346.
- McIntosh J.M., Santos A.D., Olivera B.M. (1999) Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 59-88.
- Mendola D. (2000) En: *Drugs from the Sea*, N. Fusetani (Ed.), pp. 120-133.

- Miljanich, G.P. (2004) Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Current Medical Chemistry*, 11: 3029-3040.
- Mutter R., Wills M. (2000) Chemistry and clinical biology of the bryostatins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8(8): 1841-1860.
- Myers R.A., Zafaralla G.C., Gray W.R. Abbott J., Cruz L.J., Olivera B.M. (1991) alpha-Conotoxins, small peptide probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, 30: 9370-9377.
- Newman D.J., Cragg G.M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products*, 67: 1216-1238.
- Noga E.J., Silphaduang U. (2003) Piscidins, a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News & Perspectives*, 16: 87-92.
- Okada T., Mizuno Y., Sibayama S., Hosokawa M., Miyashita K. (2011) Antiobesity effects of Undaria lipid capsules prepared with scallop phospholipids. *Journal of Food Science*, 76: H2-H6.
- Olivera B.M., McIntosh J.M., Cruz L.J., Luque F.A., Gray W.R. (1984) Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry*, 23: 5087-5090.
- Olivera B.M., Rivier J., Clark C., Ramilo C.A., Corpuz G.P., Abogadie F.C., Mena E.E., Woodward S.R., Hillyard D.R., Cruz L.J. (1990) Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science*, 249: 257-263.
- Oren Z., Shai Y. (1996) A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *European Journal of Biochemistry*, 237: 303-310.
- Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. (1998) Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters*, 437: 258-262.
- Patat S.A., Carnegie R.B., Kingsbury C., Gross, P.S., Chapman R.B., Schey K.L. (2004) Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 271: 4825-4833.
- Perugini M., D'Orazio N., Manera M., Giannella B., Zaccaroni A., Zucchini M., Giammarino A., Riccioni G., Ficoneri C., Amorena M. (2006) Total mercury in fish from the Central Adriatic Sea in relation to levels found in the hair of fishermen. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29: 176-177.
- Pettit G.R. (1991) The bryostatins. *Progress in Chemical Organic Natural Products*, 57: 153-195.
- Pettit G.R., Herald C.L., Boyd M.R., Leet J.E., Dufresne C., Doubek D.L., Schmidt J.M., Cerny R.L., Hooper J.N., Rützler K.C. (1991) Isolation and structure of the cell growth inhibitory constituents from the western Pacific marine sponge *Axinella* sp. *Journal Medical Chemistry*, 34: 3339-3340.
- Proksch P, Edrada RA, Ebel R. (2002) Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied. Microbiological Biotechnology*, 59: 125-134.
- Proksch P., Ebel R. (1998) En: *Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*, M. F. Roberts and M. Wink (Eds.), Plenum, New York, pp. 379–394.
- Proksch. (1999) En: *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology*, M. Wink (Ed.), Academic, Sheffield, pp. 134-154.
- Rinehart K.L., Holt T.G., Fregeau N.L., Stroh J.G., Keifer P.A., Sun F., Li L.H., Martin D.G. (1990) Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: Potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry*, 55: 4512-4515.

- Romestand B., Molina F., Richard V., Roch P., Granier C. (2003) Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. *European Journal of Biochemistry*, 270: 2805-2813.
- Sachindra N.M., Sato E., Maeda H., Hosokawa M., Niwano Y., Kohno M., Miyashita K. (2007) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8516-8522.
- Schnapp D., Kemp G.D., Smith V.J. (1996) Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 240: 532-539.
- Schupp P., Eder C., Paul V., Proksch P. (1999) Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and ecological implications. *Marine Biology*, 135: 573-580.
- Schwartzmann G. (2000) Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. *Annals of Oncology*, 11: 235-243.
- Sharpe I.A., Palant E., Schroeder C.I., Kaye D.M., Adams D.J., Alewood P.F., Lewis R.J. (2003) Inhibition of the norepinephrine transporter by the venom peptide chi-MrIA. Site of action, Na⁺ dependence, and structure-activity relationship. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 40317-40323.
- Sharpe I.A., Thomas L., Loughnan M., Motin L., Palant E., Croker D.E., Alewood D., Chen S., Graham R.M., Alewood P.F., Adams D. J., Lewis R.J. (2003) Allosteric alpha 1-adrenoreceptor antagonism by the conopeptide rho-TIA. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 34451-34457.
- Shi Z., Jain S., Kim I.W., Peng X.X., Abraham I., Youssef D.T., Fu L.W., El Sayed K.A., Ambudkar S., Chen Z.S. (2007) Siphonolol A, a marine-derived siphonane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Science*, 98: 1373-1380.
- Shon K.J., Stocker M., Terlau H., Stuhmer W., Jacobsen R., Walker C., Grilley M., Watkins M., Hillyard D.R., Gray W.R., Olivera B.M. (1998) kappa-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 33-38.
- Smith C.D., Zilfou J.T., Stratmann K., Patterson G.M., Moore R.E. (1995) Welwitindolinone analogues that reverse P-glycoprotein-mediated multiple drug resistance. *Molecular Pharmacology*, 47: 241-247.
- Smith V.J., Fernandes J.M.O. (2009) Non-specific antimicrobial proteins of the innate system. En: *Fish Defences*, Zaccone G., Masseguer J., García-Ayala A., Kapoor B.G., Eds., Science Publishers: Enfield, NH, USA, Volume 1, pp. 241-275.
- Spitaler M., Utz I., Hilbe W., Hofmann J., Grunicke H.H. (1998) PKC-Independent modulation of multidrug resistance in cells with mutant (V185) but not wild-type (G185) P-glycoprotein by bryostatin 1. *Biochemical Pharmacology*, 56: 861-869.
- Stensvåg K., Haug T., Sperstad S.V., Rekdal O., Indrevoll B., Styrvoid O.B. (2008) Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Development & Comparative Immunology*, 32: 275-285.
- Suarez-Jimenez G.M., Burgos-Hernandez A., Ezquerro-Brauer J.M. (2012) Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Marine Drugs*, 10: 963-986.
- Suput, D. (2009) In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon*, 54: 1190-1200.

- Terlau H., Boccaccio A., Olivera B.M., Conti F. (1999) The block of Shaker K⁺ channels by kappa-conotoxin PVIIA is state dependent. *Journal of Genetic Physiology*, 114: 125-140.
- Terlau H., Olivera B.M. (2004) Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiology Review*, 84: 41-68.
- Terlau H., Shon K.J., Grilley M., Stocker M., Stuhmer W., Olivera B.M. (1996) Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*, 381: 148-151.
- Thomas S., Karnik S., Shanker Barai R., Jayaraman V.K., Idicula-Thomas S. (2012) CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 38: D774-D780.
- Thompson S.A., Tachibana K., Nakanishi K., Kubota I., (1986) Melittin-like peptides from the shark-repelling defense secretion of the sole *Pardachirus pavoninus*. *Science*, 233: 341-343.
- Tsukui T., Konno K., Hosokawa M., Maeda H., Sashima T., Miyashita K. (2007) Fucoxanthin and fucoxanthinol enhance the amount of docosahexaenoic acid in the liver of KKAY obese/diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5025-5029.
- Vacelet J., Donadey C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30: 301-314.
- Wang Z., Wang G. (2004) APD: The antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*, 32: 590-592.
- Weinheimer A.J., Spraggins R.L. (1969) The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. *Tetrahedron Letters*, 59: 5185-5188.
- White H.S., McCabe R.T., Armstrong H., Donevan S.D., Cruz L.J., Abogadie F.C., Torres J., Rivier J.E., Paarmann I., Hollmann M., Olivera B.M. (2000) In vitro and in vivo characterization of conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 292: 425-432.
- Wilkinson R. (1992) En :Algae and Symbioses, W. Reisser (Ed.), Biopress, Bristol, pp. 112-151.
- Woo M.N., Jeon S.M., Shin Y.C., Lee M.K., Kang M.A., Choi M.S. (2009) Anti obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice. *Molecular Nutrition Food Research*, 53: 1603-1611.
- Wright A.E., Forleo D.A., Gunawardana G.P., Gunasekera S.P., Koehn F.E., McConnell O.J. (1990) Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry*, 55: 4508-4512.
- Yan X., Chuda Y., Suzuki M., Nagata, T. (1999) Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63: 605-607.
- Zaccaroni A., Perugini M., D'Orazio, N., Manera M., Giannella B., Zucchini M., Giammarino A., Riccioni G., Ficoneri C., Naccari C. (2006) Investigation of total arsenic in fish from the Central Adriatic Sea (Italy) in relation to levels found in fishermen's Hair. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, 29: 178-179.
- Zhao C., Liaw L., Lee I.H., Lehrer R.I. (1997) cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. *FEBS Letters*, 412: 144-148.



Estado del arte de empresas europeas vinculadas a los sectores nutracéutico, farmacéutico y biomédico que aprovechan recursos de origen marino

Noelia Estévez, Uxía Vázquez, Pilar Sieiro y Julio Maroto.

Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR.

Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo

jmaroto@cetmar.org

Resumen

Dentro del contexto del proyecto MARMED, del que se da cuenta en el inicio de este capítulo, se hizo un estudio de aquellas empresas europeas, prioritariamente de aquellas emplazadas en el llamado Arco Atlántico (Portugal, Irlanda, Francia, Reino Unido y España), en cuya actividad, bien parcial o totalmente, se utilizaran como fuente de materia prima organismos marinos y subproductos procedentes de la actividad pesquera. La finalidad de este trabajo era la de hacer una aproximación, lo más rigurosa y exhaustiva posible, al segmento industrial que, a través de desarrollos biomédicos, logra valorizar esas materias primas mencionadas. Se consideran como vías de valorización afines a esta línea las relacionadas con los productos nutracéuticos y alimentos funcionales, los biomateriales y la identificación de biomoléculas activas.

Son muchas las empresas que pueden encontrarse que, en su concepción más amplia, trabajan en este ámbito, pero son mucho más escasas, y difíciles de identificar, aquellas que, al menos en parte, sacan provecho de fuentes marinas. Por la amplitud del trabajo y el número de fuentes consultadas, sin duda alguna los resultados del mismo son útiles y significativos de este sector de actividad. No obstante, hay que tener presentes dos hechos que hacen que deban de considerarse con las convenientes cautelas: por un lado, se trata de un colectivo de empresas muy cambiante en donde, de manera continuada, se crean otras nuevas, desaparecen parte de las existentes, se dan fusiones y se amplían o reconducen las líneas de investigación, lo que hace que el escenario fluctúe constantemente y, en consecuencia, los datos aquí aportados puedan verse alterados en el tiempo. En segundo término, el alcance de estas indagaciones se circunscribió de inicio a aquellas empresas localizadas en el ámbito de actuación del proyecto MARMED. Si bien se dio cabida a empresas europeas adicionales

enclavadas en países ajenos a este ámbito geográfico, lo fueron en mucho menor número. Es por tanto importante asimilar la información generada teniendo siempre presente que quizás las conclusiones alcanzadas fueran distintas si el alcance fuera otro.

Ciñéndonos a los contenidos específicos, se hace una enumeración de todas aquellas biomoléculas y biocompuestos posibles, se estructura un mapa de la localización geográfica, se establece el perfil de las empresas objetivo, se revisan los Biocompuestos y Biomoléculas producidos por ellas, e, igualmente, son objeto de valoración los recursos marinos empleados en cada caso. El capítulo se cierra con una serie de consideraciones sobre este tejido empresarial.

1. Antecedentes. El proyecto MARMED

El reconocimiento de que los océanos y más concretamente, los seres que en ellos habitan, constituyen una fuente muy importante de producción de moléculas bioactivas, ha llevado a que en los últimos años el interés por estos ecosistemas haya crecido notablemente.

Los organismos marinos están dotados de mecanismos biosintéticos únicos a través de los cuales fabrican compuestos que les permiten sobrevivir en condiciones extremas a veces incompatibles con la vida. Los avances en el campo de las ciencias marinas han llevado a que en los últimos años se hayan descubierto cerca de 20.000 nuevos productos naturales procedentes de organismos marinos, siendo el reino animal y las bacterias las fuentes que han aportado más productos naturales en comparación con otros grupos como las plantas y los hongos. Sin embargo, de los productos naturales identificados, muy pocos han conseguido llegar al mercado.

Los recientes avances en campos como la genómica o la bioinformática, están siendo usados para enfrentarse a los problemas asociados al desarrollo comercial de nuevos productos marinos. Se estima que el 1,18% de los nuevos compuestos descubiertos llegaron a ensayo preclínico, el 0,36% a ensayo clínico y sólo el 0,02% se comercializó. Varias de las moléculas marinas que se encuentran en fase de ensayo clínico están destinadas a la búsqueda de tratamientos del cáncer, infecciones, enfermedad de Alzheimer y asma. El número de nuevos productos marinos que podrían encontrarse todavía, oscila entre 253.120 y 594.232. Entre los productos de origen marino descubiertos se encuentran aquellos con aplicaciones farmacéuticas como antibióticos, sustancias antiinflamatorias y antitumorales; cosméticos, productos de uso agrícola, enzimas industriales, complementos alimenticios, biomateriales para implantes o reactivos para investigación molecular entre muchos otros.

Sin embargo, mientras un considerable esfuerzo científico, económico y tecnológico se destina al descubrimiento y aprovechamiento de recursos marinos, otra parte importante de éstos no está siendo tratada de manera sostenible, produciéndose el descarte de subproductos y residuos con un elevado potencial de valorización, tales como espinas de pescado, exoesqueletos de crustáceos, endoesqueletos de moluscos, y algas, entre otros. El 50% de la producción pesquera mundial proviene de las capturas efectuadas por las diferentes flotas, siendo a su vez el 70% de la producción mundial destinado al procesado previo a su consumo. Como resultado de esto, cada año una cantidad considerable de la captura total se descarta en forma de residuos incluyendo aletas, cabezas, piel y vísceras. Además del propio procesado del pescado a bordo, otras plantas de procesado producen una gran cantidad de subproductos como conchas de crustáceos, pieles y endoesqueletos de moluscos. A partir de estos subproductos pueden obtenerse moléculas de gran interés como el colágeno, quitina o quitosano y polisacáridos, que tienen un interés potencial en diferentes campos como la nutracéutica, biomedicina o farmacia, y que no están siendo aprovechados.

En este sentido, la biotecnología brinda la oportunidad de aprovechar el potencial que ofrecen los ecosistemas marinos y sus recursos aportando conocimiento y metodologías para una explotación sostenible y uso de la biodiversidad marina. La biotecnología marina, que involucra a los biorecursos marinos, ya sea como fuente o como objetivo de las aplicaciones biotecnológicas, se está convirtiendo en un importante componente del sector biotecnológico a nivel global. Este aspecto ha conllevado al afloramiento de nuevas empresas biotecnológicas que apuestan por el aprovechamiento de los recursos marinos como fuente de nuevas moléculas dirigidas a mercados potenciales como el farmacéutico, cosmético, suplementos nutricionales, agroquímicos, pruebas moleculares, enzimas, química fina, proteínas y biofuels. Muchas de estas empresas están localizadas en países del arco Atlántico como Portugal, Francia, España, Reino Unido o Irlanda.

En Portugal, el proceso de desarrollo de la biotecnología tuvo sus inicios en el año 1989, con la creación de la primera organización de investigación especializada en biotecnología. Se trata de una investigación que se da de manera generalizada a lo largo de todo el país, donde ya se han constituido diferentes agrupaciones de unidades científicas de investigación aplicada y empresas especializadas, entre las cuales se cuenta con un parque tecnológico e institutos integrados de investigación multidisciplinar, reconocidos a nivel europeo. Las áreas tecnológicas con un desarrollo significativo incluyen las ciencias de la vida (enfermedades genéticas, enfermedades infecciosas e inmunología, neurociencias, estrés y biología estructural), los biomateriales, los materiales biodegradables y biomiméticos. En el año 1999

se fundó la APBIO (Asociación Portuguesa de Bioindustrias) que actualmente cuenta entre sus asociados con un total de 38 empresas y diversos centros de investigación e incubación. A pesar de que Portugal tiene en el mar una de sus mayores ventajas competitivas, de las empresas pertenecientes a APBIO, tan solo una de ellas estaría aprovechando recursos de origen marino para desarrollar su actividad.

En lo que se refiere a nuestro país, el sector de la biotecnología ha crecido de forma espectacular, contando en el año 2009, con cerca de 700 compañías. España cuenta con una larga tradición de excelencia científica, especialmente en el campo de las ciencias de la vida, siendo muchas las comunidades autónomas que se dedican al desarrollo biotecnológico. En la última década España ha orientado su investigación hacia el desarrollo de compañías y productos enfocados al consumidor. Casi la mitad de las nuevas empresas biotecnológicas emergentes españolas tienen sus oficinas centrales en el área de Madrid, donde compañías farmacéuticas como GlaxoSmithKline, Pfizer y Bristol-Meyers Squibb, por mencionar sólo algunas, han establecido centros de investigación. El ejemplo por excelencia de empresa biotecnológica marina es PharmaMar. La compañía, fundada en 1986, ha construido el mayor banco privado del mundo de muestras de origen marino para la investigación de nuevos fármacos en la lucha contra el cáncer. Los científicos de la compañía, en colaboración con instituciones de investigación y gobiernos locales, realizan regularmente expediciones de buceo en zonas de gran riqueza biológica, obteniendo abundantes muestras de la vida submarina. Pero además de esta empresa, otras como la gallega Ebiotec orientan su actividad a la investigación y desarrollo de nutracéuticos innovadores y servicios de alta tecnología aplicados a la salud y alimentación humana empleando para ello recursos de origen marino.

En Francia, la situación es muy distinta a la de Portugal. El sector de las biotecnologías marinas constituye un vivero de pequeñas y medianas empresas innovadoras. Las biotecnologías marinas sirven de nexo entre la investigación y la utilización de biorecursos marinos tales como microorganismos, invertebrados, subproductos de la pesca o macroalgas. De ahí que se hayan establecido tres ejes de competitividad especializados en las temáticas marinas: Pôle Mer Bretagne, PACA y Aquimer, así como la estructuración de una filial en Nantes denominada Blue Cluster.

En Reino Unido la mayor parte de las empresas cuyo ámbito de actividad está enfocado a las ciencias y tecnologías marinas, experimentó un aumento en los dos últimos años. Son numerosas las instituciones públicas y privadas tales como universidades, centros de

investigación, asociaciones o empresas, que centran su actividad en las ciencias marinas. Así, el Centro Europeo para la Biotecnología Marina (ECMB) actúa como incubador de empresas para generar nuevas compañías de biotecnología marina emergentes en el Reino Unido. Se trata de un clúster en crecimiento que promueve la actividad y creación de redes internacionales de biotecnología marina constituyendo el primer ente del Reino Unido para la promoción del crecimiento innovador de este sector emergente. El Centro se ha beneficiado de un gran apoyo empresarial y de clientes potenciales, los cuales han establecido un diálogo abierto con las empresas.

Por último, Irlanda cuenta con una estrategia denominada *Marine Biotechnology Ireland* que refleja el sistema de innovación nacional. Se trata de un programa que conecta instituciones del sector público y privado como un catalizador para el crecimiento económico. El programa contribuye al desarrollo y difusión de nuevas biotecnologías marinas relacionadas con objetivos comerciales. Las instituciones de investigación colaboradoras, trabajan dentro de un proceso definido para aprovechar los organismos marinos como fuente de nuevos materiales con aplicaciones en los campos de la producción industrial, salud y alimentación. Un amplio rango de disciplinas pertenecientes a las áreas de las ciencias de la vida y biología marina, contribuyen a la recolección y selección de organismos y comercialización de los resultados de investigación para crear nuevos procesos y bioproductos. Las áreas de investigación principales ligadas a la biotecnología marina incluyen la alimentación, ciencias de la vida, ciencias marinas, dispositivos médicos, diagnóstico y fármacos. Desde el 2007, los investigadores irlandeses han recibido cerca de 30 millones de euros de financiación europea para investigación en ciencias marinas, de los cuales, el 10% iría destinado al ámbito de la biotecnología marina.

MARMED es el acrónimo del proyecto: “Development of innovating biomedical products from marine resources valorisation”, enmarcado dentro de la modalidad Interreg IV-B Arco Atlántico que nace de una llamada común realizada por los socios de los estados miembros implicados en la idea de alcanzar una mejor explotación y uso de los recursos naturales. Este proyecto unifica diferentes regiones, con una fuerte tradición en las actividades relacionadas con el medio ambiente, de países del arco Atlántico como Portugal, España, Francia, Reino Unido e Irlanda. Un total de 10 grupos de investigación procedentes de estos 5 países constituyen el consorcio del proyecto.

El proyecto MARMED tiene como cometido la explotación sostenible de los recursos naturales a través, no sólo del mejor aprovechamiento de las materias primas entre

ellas descartes y subproductos, sino también mediante la optimización de procesos de valorización que permitan obtener productos de alto valor para aplicaciones de los siguientes sectores: nutracéutico, farmacéutico y biomédico. Más concretamente, MARMED pretende aprovechar los residuos marinos y acuícolas a través de su explotación e inclusión en un proceso de valorización con el fin de aislar y purificar biomoléculas y biopolímeros con potencial aplicación biomédica, así como desarrollar materiales naturales orientados a los tres ámbitos de interés citados anteriormente. Este proyecto sigue la senda marcada por los proyectos europeos de cooperación BIOTECMAR e IBEROMARE, con objetivos similares. Tanto es así, que las actividades de MARMED pretenden aprovechar los resultados generados por esos dos proyectos para seguir avanzando, en particular, en el ámbito biomédico.

2. Contexto geográfico y sectorial del estudio

2.1. Contexto geográfico

El Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR como socio implicado en el proyecto MARMED, ha preparado el terreno para llevar a cabo una colaboración directa con el sector industrial así como evaluar el mercado potencial de las aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas y biomédicas que se han desarrollado y/o estudiado en el marco del presente proyecto. Con este fin se ha procedido a identificar y describir el perfil de empresas objetivo situadas en países del arco Atlántico, con especial interés en aquellas compañías localizadas en la Península Ibérica. Dado el interés de los datos obtenidos y la ausencia de información existente en materia de empresas que se dedican al aprovechamiento de organismos o recursos marinos con fines farmacéuticos, biomédicos o nutracéuticos en nuestro país, pareció interesante extender la búsqueda a otros países del continente europeo, abarcando al final un total de 15 .

Tras una búsqueda detallada de empresas cuyo ámbito de actividad estuviese enmarcado en alguno de los sectores de interés ya mencionados, el número total de empresas localizadas asciende a 164. Dichas entidades estarían repartidas tal y como se visualiza en el siguiente mapa (figura 1).

El mayor porcentaje de empresas identificadas correspondió a nuestro país, con un 23%. En segundo lugar y con un 20% se localizaron empresas en Francia, y en tercer lugar con un 13% empresas en Noruega. Además de estos tres países, se identificaron empresas en Portugal, Italia, Austria, Polonia, Rusia, Suecia, Dinamarca, Alemania, Holanda, Bélgica, Reino Unido e Irlanda.

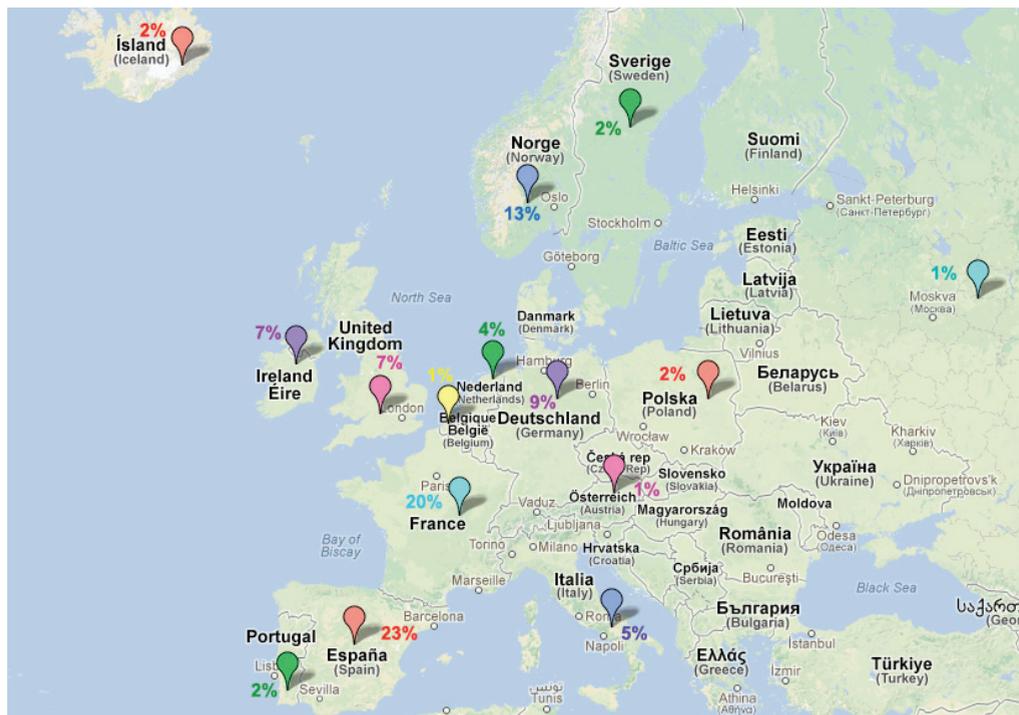


Figura 1. Localización geográfica de las empresas identificadas

2.2. Contexto sectorial

Para poder caracterizar la actividad empresarial de las compañías identificadas y enmarcarla en uno u otro ámbito de actividad es necesario definir cada uno de los sectores objetivo de este estudio de manera concreta.

a. Sector nutracéutico

Desde hace algunos años existe un creciente interés por promover el papel saludable de ciertos alimentos. En este sentido, muchos grupos de investigación vienen centrando sus esfuerzos en identificar componentes bioactivos y funcionales a partir de fuentes naturales incluyendo plantas, animales, microorganismos y organismos marinos lo que ha dado lugar a la aparición de dos nuevos grupos de productos: los alimentos funcionales y los nutracéuticos; los cuales han sido introducidos en el mercado y algunos de ellos ya se están produciendo a gran escala.

Los alimentos funcionales son alimentos enriquecidos con componentes o ingredientes funcionales y que ofrecen beneficios médicos y fisiológicos más allá de su valor nutricional.

El término nutraceutico fue acuñado por el Dr. Stephen De Felice, presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina, en el año 1989. Dicho término procede de las palabras “nutrición” y “farmacéutica” y se refiere a un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades. Dicho de otra manera, los nutraceuticos son la intersección entre la nutrición y el cuidado de la salud. Se trata de productos de origen natural con propiedades biológicas activas, saludables y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida que incluyen tanto a los complementos nutricionales como a los alimentos funcionales. Son numerosos los compuestos que se han identificado, extraído y seleccionado a partir de algas, peces y diversos invertebrados marinos. Así es el caso de aceites de pescado o algas, fosfolípidos, complementos nutricionales a base de microalgas, proteínas y péptidos de pescado, colágeno, oligosacáridos de quitina y muchos otros, todos ellos compuestos que presentan diversas propiedades.

El mercado tanto a nivel comercial como científico que ocupan los nutraceuticos y alimentos funcionales de origen marino es bastante amplio, destacando aquellos orientados a la nutrición infantil, malnutrición como consecuencia de la edad, enfermos de diferentes tipos de cáncer, Parkinson, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, salud de la mujer, control de peso, salud de las articulaciones y problemas asociados a la glucosa entre otros.

En cuanto al formato de presentación de estos productos, éste es muy variable existiendo varias modalidades. A efectos de este capítulo, y con el fin de delimitar el ámbito de estudio, se considerarán únicamente como nutraceuticos de interés aquellos productos que se presentan generalmente en forma de píldora, cápsula, comprimido o líquido, es decir, como complementos nutricionales en formatos no alimentarios. Se excluyen por tanto los alimentos y bebidas convencionales enriquecidos con ingredientes de origen marino.

b. Sector farmacéutico

La biotecnología marina ofrece un amplio rango de posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades farmacéuticas, y, el diseño y desarrollo de fármacos. Sin embargo, en comparación con la gran representación de compuestos bioactivos de origen terrestre, el número de productos de origen marino que se pueden encontrar en hospitales, clínicas y farmacias es por el momento muy pequeño.

La Farmacia es la ciencia que enseña a preparar y combinar productos naturales o artificiales como remedio a las enfermedades, o para conservar la salud. Los medicamentos se com-

ponen de dos tipos de materiales: fármacos y excipientes. Los fármacos o principios activos, son sustancias de origen natural o sintético que tienen alguna actividad farmacológica y que se identifican por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, reuniendo las condiciones para ser empleadas como componentes de un medicamento. Por otra parte, los excipientes son los componentes de un medicamento que no tienen actividad farmacológica, y cuya función es la de facilitar la administración del fármaco y brindarle estabilidad física, química, microbiológica y biológica al mismo. En este capítulo se considerarán tanto los fármacos como los excipientes o la combinación de ambos, que tengan su origen en el medio marino.

A pesar de que históricamente se ha prestado menos atención a los productos naturales marinos, algunos de gran importancia están presentes en el mercado. En el año 1950, Werner Bergmann extrajo nucleósidos a partir de la esponja *Cryptothetya crypta* de los que se obtuvieron compuestos bioactivos para posteriormente sintetizar drogas antivirales y antitumorales. Por ejemplo, la zidovudina (azidotimidina o AZT) fabricada bajo el nombre comercial de Retrovir® por la compañía farmacéutica GlaxoSmithKline, fue el primer medicamento autorizado para el tratamiento de la infección por VIH. Otro como la ziconitida, conocida por su nombre comercial Prialt®, es la forma sintética de un compuesto extraído del veneno de caracoles cono (*Conus spp*). Prialt fue aprobado por la FDA a finales de 2004 como tratamiento para los casos severos de dolor crónico en pacientes con cáncer o SIDA, mientras que en Europa se autorizó su comercialización en febrero de 2005. Por otra parte, Giuseppe Brotzu consiguió aislar cepas bacterianas y fúngicas con potencial antibiótico. Una de estas cepas, el hongo *Cephalosporium acremonium*, mostró una actividad inhibitoria significativa cuando se probó contra un número de cepas bacterianas. Este hallazgo fue el descubrimiento del primer antibiótico de la familia de las cefalosporinas, de gran importancia en la lucha contra una amplia gama de infecciones bacterianas. Actualmente hay en proyecto un gran número de compuestos de origen marino con potencial farmacéutico. Muchos de ellos están aún en fase de evaluación preclínica, pero otros están siendo administrados a los pacientes como parte de los ensayos clínicos. Cada año acceden a la etapa preclínica alrededor de un centenar de nuevos compuestos marinos, manteniendo esta área farmacéutica muy activa y con posibilidades de entrada en el mercado.

c. Sector biomédico

El aprovechamiento del potencial que ofrece el medio marino y sus recursos no se limita única y exclusivamente al descubrimiento de fármacos. Existen numerosos materiales

derivados del medio marino como los biopolímeros por ejemplo, que están siendo también explorados por su importancia y potencial aplicación biomédica en medicina regenerativa o procesos de liberación de fármacos. Sin embargo, el conocimiento de las oportunidades que ofrece el medio marino en relación al aislamiento de biocompuestos y su posterior uso y aplicación en el campo biomédico se encuentra todavía en una fase muy poco desarrollada.

La biomedicina aplica todos los principios de las ciencias naturales en la práctica clínica mediante el estudio e investigación de los procesos fisiopatológicos considerando desde las interacciones moleculares hasta el funcionamiento dinámico del organismo a través de las metodologías aplicadas en la biología, química y física. De esta manera permite la creación de nuevos fármacos, perfecciona el diagnóstico precoz de enfermedades y el tratamiento de éstas. El mercado de la biomedicina representa una oportunidad para la aplicación y salida al mercado de muchas biomoléculas y bioproductos, además de contribuir a la explotación sostenible de los recursos marinos. En ese sentido, la valorización de residuos de origen marino como por ejemplo aquellos obtenidos del procesado de alimentos, pueden constituir una interesante plataforma para el desarrollo de nuevas cadenas de valor añadido con ventajas económicas y ambientales.

Algunos de los materiales de origen marino que están siendo mayormente investigados por la comunidad científica son los polisacáridos, entre los que figuran los alginatos, quitina y quitosán, agar, carragenatos, glucosaminoglucanos, etc. Las industrias médica y farmacéutica han mostrado un creciente interés por algunos de estos polisacáridos como los alginatos, debido a la gran utilidad que presentan en aplicaciones específicas como la mejora la eficiencia de los tratamientos del reflujo esofágico, creación de fibras de calcio para dermatología y cicatrización de heridas, o impresión dental, ofreciendo ventajas en relación a los polímeros sintéticos.

En este capítulo se considerará el término biomedicina en su sentido más amplio con especial atención en el campo de la ingeniería biomédica, que consiste en la aplicación de los principios y técnicas de la ingeniería al campo de la medicina. La ingeniería biomédica se ocupa de los biomateriales, es decir, aquellos materiales implantables intracorporalmente a los que se les exige que lleven a cabo una función adecuada, y no ocasionen ningún daño al organismo. Estos materiales tienen que poseer un carácter inerte o tolerable, ser bioactivos, y sus productos de degradación no deben originar toxicidad. Los biomateriales se utilizan tanto para la reconstrucción del organismo como para darle soporte. Los materiales sustitutivos de tejidos blandos son diferentes de los sustitutivos de tejidos duros o de los empleados en la fabricación de dispositivos. El paciente o el cirujano no necesitan

biomateriales, sino componentes, piezas o aparatos y sistemas médicos fabricados con biomateriales. De hecho, los biomateriales se sintetizan y elaboran específicamente para cada sistema o aparato médico.

3. Análisis del perfil de las empresas objetivo

Una vez definidos de manera concreta los tres ámbitos de interés, el análisis de la información presente en las páginas webs de cada una de las 164 empresas identificadas, permitió clasificarlas en base a su ámbito de actividad. En algunos casos, la realización de esta clasificación se presentó complicada dada la falta de información concreta reflejada en las webs correspondientes por lo que se tuvo que recurrir a otro tipo de fuentes de información para extraer aquellos datos concisos que permitiesen enmarcar a las compañías en uno u otro sector de manera correcta.

Se hicieron dos tipos de clasificación: una clasificación excluyente y otra no excluyente.

3.1. Clasificación no excluyente

De las 164 empresas, 124 orientan su actividad al sector nutracéutico, 62 pertenecen al ámbito farmacéutico y 43 empresas se dedican al sector biomédico. Por tratarse de una clasificación no excluyente, el hecho de que una empresa se dedique a uno de los tres sectores de interés no implica que no se dedique a otro u otros sectores. Es decir, una empresa caracterizada como nutracéutica puede también pertenecer al ámbito farmacéutico, biomédico o a ambos (figura 2).

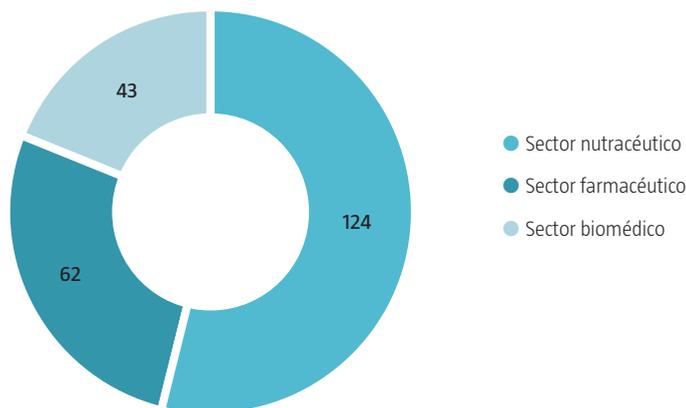


Figura 2. Distribución sectorial (no excluyente) de las empresas identificadas

3.2. Clasificación excluyente

Cuando se realiza un análisis sectorial excluyente de las empresas identificadas (figura 3), se observa que el mayor número de empresas corresponde a aquellas que se dedican únicamente al sector nutracéutico (88 empresas). En segundo lugar se encontrarían las compañías que orientan su actividad tanto al ámbito nutracéutico como farmacéutico, de manera simultánea (24 empresas), seguidas muy de cerca, con 23 empresas, de aquellas compañías farmacéuticas y biomédicas. En cuanto a las compañías que únicamente centran sus esfuerzos en el ámbito biomédico, serían un total de 13. Del total de empresas identificadas, 9 se dedicarían a los tres ámbitos de interés: nutracéutico, farmacéutico y biomédico. Las empresas únicamente farmacéuticas serían 6 y en último lugar una única empresa sería la que combinaría tareas propias del ámbito nutracéutico y biomédico.

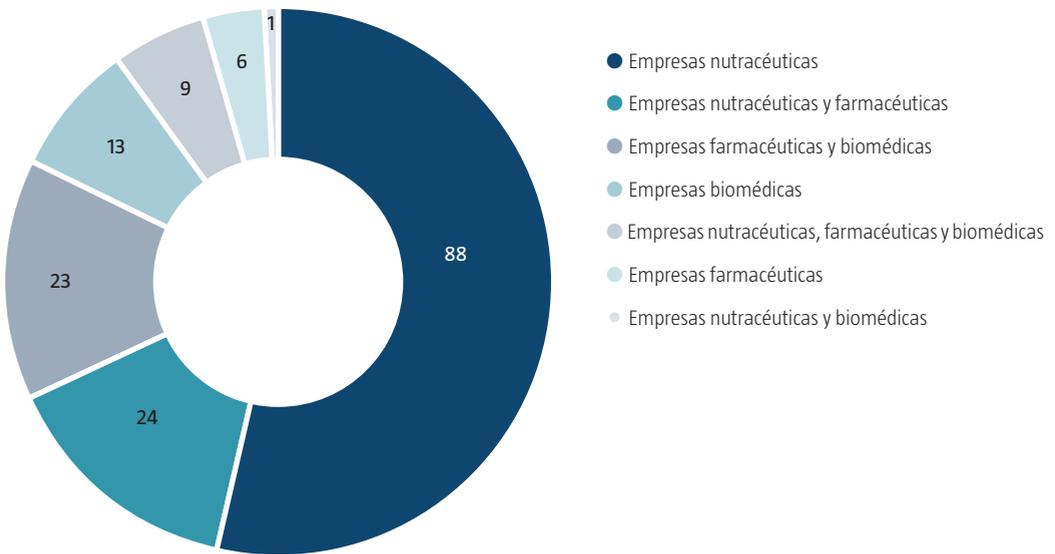


Figura 3. Distribución sectorial (excluyente) de las empresas identificadas

3.3. Empresas nutracéuticas

La distribución geográfica de las 88 empresas que se dedican única y exclusivamente al ámbito de los nutracéuticos se repartieron de la siguiente manera: se encontró que el mayor número fue localizado en España (26 empresas), seguido de Francia con 18 empresas, y Noruega con 12 (figura 4).

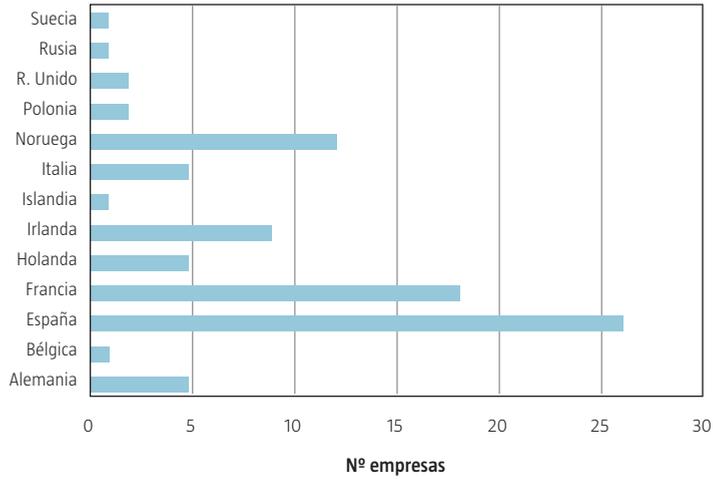


Figura 4. Distribución geográfica de empresas nutracéuticas

El análisis del **perfil de empresas** (figura 5) nutracéuticas revela que en algunos casos la actividad de estas compañías se limita a producir y/o comercializar ingredientes funcionales o productos nutracéuticos, mientras que en otros casos poseen además un perfil de carácter científico o investigador (tabla 1).

País de origen	Nº empresas nutracéuticas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	5	4	1
Bélgica	1	1	-
España	26	16	10
Francia	18	6	12
Holanda	5	5	-
Irlanda	9	6	3
Islandia	1	1	-
Italia	5	4	1
Noruega	12	8	4
Polonia	2	2	-
Reino Unido	2	1	1
Rusia	1	1	-
Suecia	1	-	1
Total	88	55	33

Tabla 1: Ámbito específico de actividad de las empresas nutracéuticas

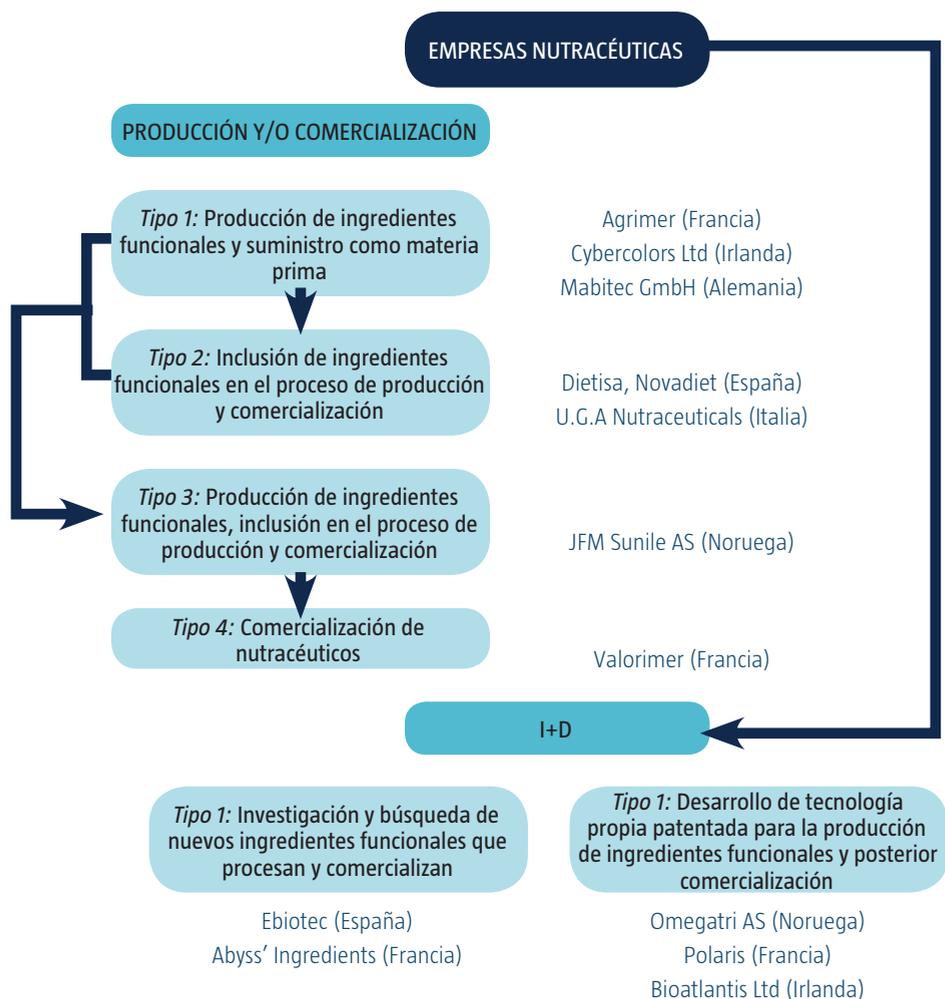


Figura 5. Tipología del perfil de las empresas de nutraceuticos

Se observa que el número de empresas nutraceuticas productoras y/o comercializadoras es mayor que las que poseen además, una componente investigadora o científica. En los 13 países en los que se localizaron empresas nutraceuticas, con la salvedad de Bélgica, Holanda, Islandia, Polonia y Rusia, se encontraron empresas que orientan su actividad a la investigación en el campo nutraceutico, estando el mayor número de empresas en Francia (12 empresas).

Cada uno de esos perfiles se puede dividir en varios **tipos empresariales** en función de la actividad desarrollada por la empresa. Así, las empresas productoras y/o comercializadoras se dividen en:

- Tipo 1: Empresas productoras de ingredientes funcionales que suministran a otras empresas en forma de materia prima
- Tipo 2: Empresas que adquieren los ingredientes funcionales a otras empresas y los incluyen en el proceso de producción de nutracéuticos y los comercializan
- Tipo 3: Empresas que producen sus propios ingredientes funcionales, fabrican nutracéuticos y los comercializan
- Tipo 4: Empresas que sólo se ocupan de la comercialización y distribución de productos nutracéuticos

Por otra parte, se han considerado como empresas de carácter investigador aquellas que poseen un departamento de investigación y desarrollo:

- Tipo 1: Orientan una parte de su actividad a la investigación y búsqueda de nuevas moléculas o biocompuestos activos los cuales extraen y posteriormente desarrollan como ingredientes funcionales que incluyen en el proceso de fabricación del nutracéutico y comercializan
- Tipo 2: Desarrollan una tecnología propia patentada para la extracción de biomoléculas o bioproductos que posteriormente incluyen como ingredientes funcionales en el producto nutracéutico

3.4. Empresas farmacéuticas

De las 6 empresas identificadas que orientan su actividad única y exclusivamente al ámbito farmacéutico, el mayor número se encuentra en Alemania (2 empresas), seguido de Francia, Holanda, Portugal y Reino Unido con 1 empresa (figura 6).

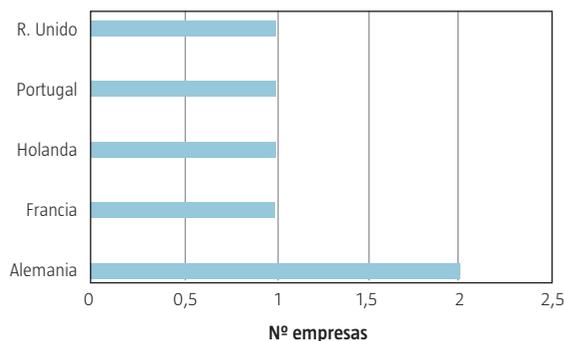


Figura 6. Distribución geográfica de empresas farmacéuticas

El análisis del perfil (figura 7) de las empresas farmacéuticas identificadas muestra como a diferencia de las empresas nutracéuticas, todas las compañías se dedican a la producción y/o comercialización de productos farmacéuticos (tabla 2).

País de origen	Nº empresas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	2	2	-
Francia	1	1	-
Holanda	1	1	-
Portugal	1	1	-
Reino Unido	1	1	-
Total	6	6	-

Tabla 2. Sector específico de actividad de las empresas farmacéuticas

Las empresas farmacéuticas que poseen una componente investigadora, comparten sector de actividad con otros ámbitos como el biomédico, de ahí que no se hayan incluido en este apartado y se traten en el punto 3.4 de este capítulo.

Del mismo modo que para las empresas nutracéuticas, se distinguen varios tipos empresariales en función de la actividad que desempeñan:

- Tipo 1: Empresas productoras de excipientes y/o principios activos que suministran a otras empresas en forma de materia prima
- Tipo 2: Empresas que adquieren los excipientes y/o principios activos a otras empresas y los incluyen en el proceso de producción de fármacos y los comercializan

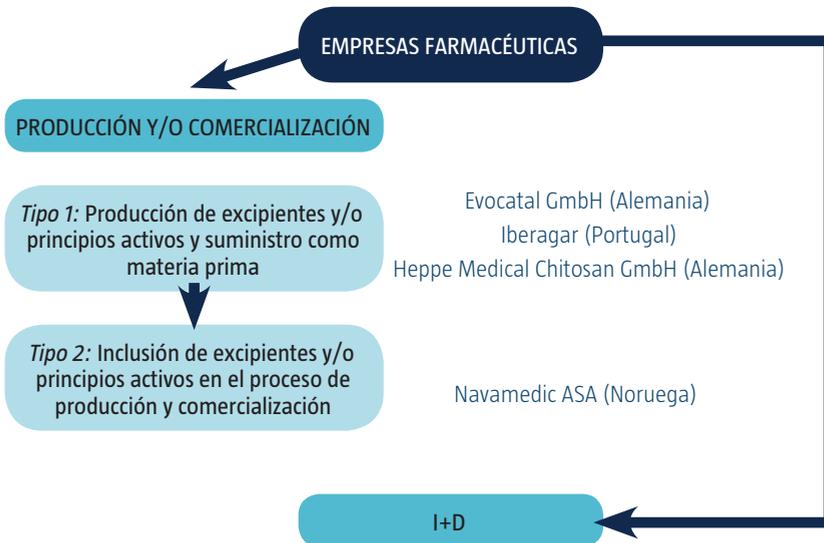


Figura 7. Tipología del perfil de las empresas farmacéuticas

3.5. Empresas biomédicas

Se observa que el número de empresas identificadas que se dedican únicamente al ámbito biomédico son 13, de las cuales 3 se localizan en Francia, 2 en Reino Unido y Suecia, y en otros países como Alemania, España, Islandia, Italia, Noruega y Portugal hay tan solo una empresa (figura 8).

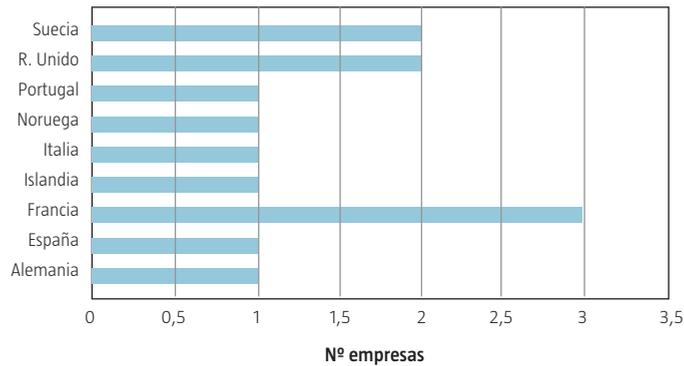


Figura 8. Distribución geográfica de empresas biomédicas

El análisis del perfil de las empresas biomédicas (figura 9) identificadas revela que todas las compañías se dedican además de a la producción y/o comercialización, a la investigación (tabla 3).

País de origen	Nº empresas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	1	-	1
España	1	-	1
Francia	3	-	3
Islandia	1	-	1
Italia	1	-	1
Noruega	1	-	1
Portugal	1	-	1
Reino Unido	2	-	2
Suecia	2	-	2
Total	13	-	13

Tabla 3. Sector específico de actividad de empresas biomédicas

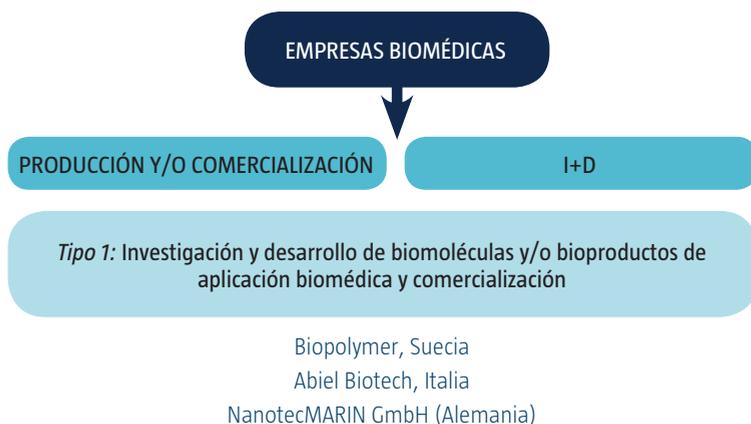


Figura 9. Tipología del perfil de las empresas biomédicas

En el caso de las empresas biomédicas identificadas, se establece un único tipo empresarial:

Tipo 1: Empresas que investigan y desarrollan biomoléculas y/o bioproductos de aplicación biomédica y los comercializan (o están llevando a cabo los ensayos necesarios para lograr su comercialización) a otras empresas biomédicas

País de origen	Nº empresas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	1	-	1
España	1	-	1
Francia	3	-	3
Islandia	1	-	1
Italia	1	-	1
Noruega	1	-	1
Portugal	1	-	1
Reino Unido	2	-	2
Suecia	2	-	2
Total	13	-	13

Tabla 3. Sector específico de actividad de empresas biomédicas

3.6. Empresas que comparten sector de actividad

Las empresas que comparten actividad se pueden diferenciar en cuatro grupos:

Grupo 1: Empresas nutracéuticas y farmacéuticas

Grupo 2: Empresas nutracéuticas y biomédicas

Grupo 3: Empresas farmacéuticas y biomédicas

Grupo 4: Empresas nutracéuticas, farmacéuticas y biomédicas

Grupo 1

De las 24 empresas que orientan su actividad al ámbito nutracéutico y farmacéutico, 9 están localizadas en Francia, 5 en Noruega y España, y 2 en los demás países excepto Holanda que cuenta con 1 única empresa (figura 10).

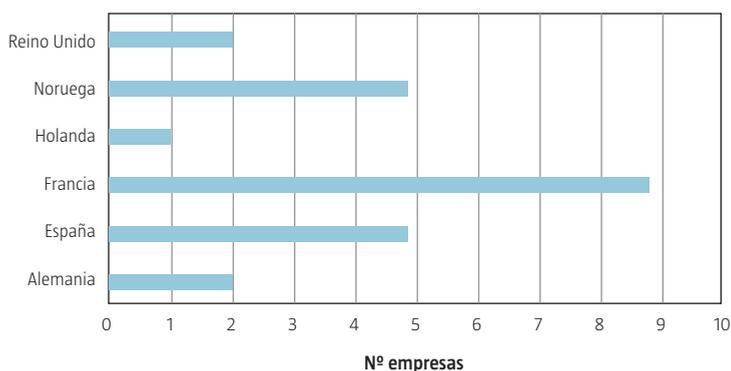


Figura 10. Distribución geográfica de empresas que compaginan la actividad nutracéutica y farmacéutica

Al igual que con las empresas que se dedican exclusivamente al sector nutracéutico, algunas de las empresas identificadas en este apartado poseen dos tipos distintos de perfiles: un perfil productor y/o comercializador de nutracéuticos y fármacos y, un perfil de carácter investigador (tabla 4).

País de origen	Nº empresas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	2	1	1
España	5	3	2
Francia	9	6	3
Holanda	1	1	-
Noruega	5	4	1
Reino Unido	2	-	2
Total	24	15	9

Tabla 4. Sector específico de empresas que compaginan la actividad nutracéutica y farmacéutica

En este tipo de empresas no se distinguen tipos empresariales por tratarse de una combinación de los ya establecidos anteriormente en los apartados 3.1 y 3.2.

Grupo 2

Una sola empresa localizada en Noruega orienta su actividad al ámbito de la nutracéutica y biomedicina simultáneamente. Además, de manera específica se dedica a la producción y/o comercialización además de a la investigación.

Grupo 3

En lo que a las empresas farmacéuticas y biomédicas se refiere, de las 23 identificadas, 5 de ellas se localizan en España, 3 en Noruega y Reino Unido, mientras que el resto de países registraron una o dos empresas (figura 11).

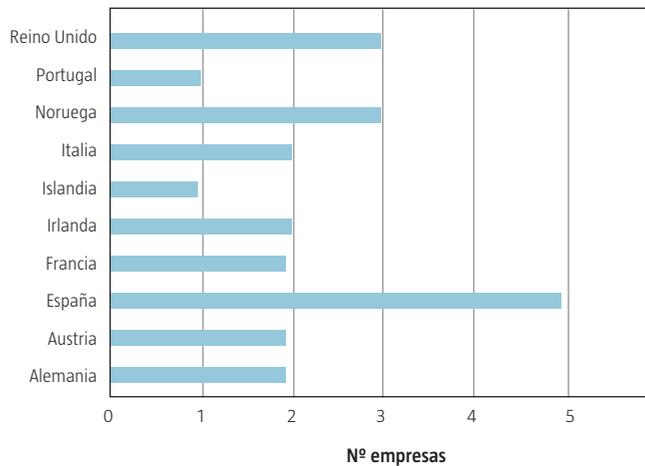


Figura 11. Distribución geográfica de empresas que compaginan la actividad farmacéutica y biomédica

En la tabla 5 se incluye el origen de cada uno de las empresas identificadas en este apartado y la clasificación de su perfil empresarial. Todas las empresas poseen un perfil investigador.

Grupo 4

Por último, un grupo reducido de 9 empresas comparten ámbito de actividad de los tres sectores de interés del presente estudio. En Francia y Reino Unido están presentes 2 empresas mientras que en el resto de países tan sólo una empresa (figura 12).

En la tabla 6 se observa que todas las empresas identificadas en este apartado orientan su actividad a la producción y/o comercialización así como investigación.

País de origen	Nº empresas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	2	-	2
Austria	2	-	2
España	5	-	5
Francia	2	-	2
Irlanda	2	-	2
Islandia	1	-	1
Italia	2	-	2
Noruega	3	-	3
Portugal	1	-	1
Reino Unido	3	-	3
Total	23	-	23

Tabla 5. Sector específico de empresas que compaginan la actividad farmacéutica y biomédica

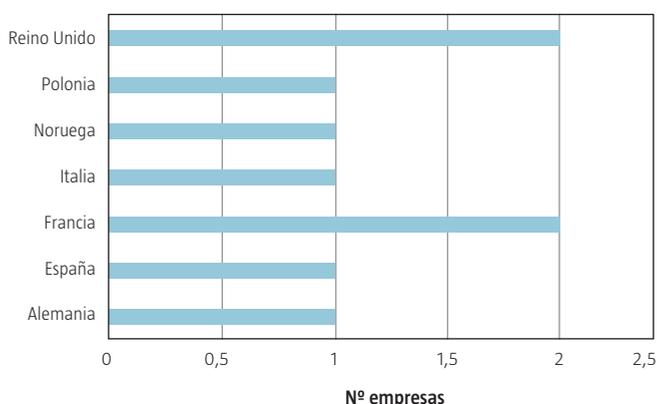


Figura 12. Sector específico de empresas que compaginan la actividad nutracéutica, farmacéutica y biomédica

País de origen	Nº empresas	Ámbito productor y/o comercializador	Ámbito investigador
Alemania	1	-	1
España	1	-	1
Francia	2	-	2
Italia	1	-	1
Noruega	1	-	1
Polonia	1	-	1
Reino Unido	2	-	2
Total	9	-	9

Tabla 6. Sector específico de empresas que compaginan la actividad nutracéutica, farmacéutica y biomédica

4. Biocompuestos de origen marino producidos por las empresas objetivo

Las empresas nutracéuticas, farmacéuticas y biomédicas identificadas trabajan con una amplia gama de bioproductos y/o biomoléculas de origen marino. Por una parte se ha hecho un análisis para determinar la relación de empresas que emplean un determinado biocompuesto y, en segundo lugar, se ha identificado además el recurso marino que emplean para su obtención, la existencia de algún producto patentado o registrado constituido a partir de cada bioproducto/biomolécula y, por último, el país de origen de las empresas que trabajan con cada biocompuesto.

En el caso de las empresas biomédicas dado que aprovechan una amplia variedad de recursos marinos, los cuales en muchos casos no ha sido posible identificar por falta de información detallada en las páginas web de las empresas, se ha incluido también la aplicación de los biocompuestos obtenidos y que participan en procesos biológicos de interés para el campo terapéutico o también, en el campo de los biomateriales. Es necesario aclarar, que este análisis de biocompuestos se ha hecho teniendo en cuenta todas las empresas nutracéuticas (es decir, en base a la clasificación no excluyente), al igual que el estudio de los biocompuestos.

4.1. Biocompuestos nutracéuticos marinos

En la figura 13 se analiza la relación entre el número de empresas del sector nutracéutico y el uso de los compuestos de origen marino identificados.

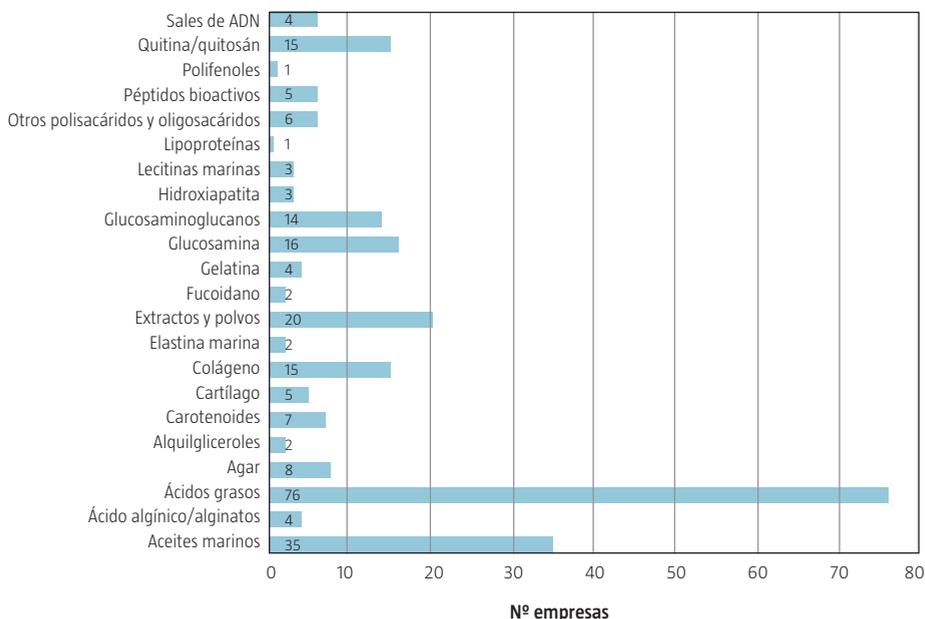


Figura 13. Relación de empresas nutracéuticas y uso de biocompuestos marinos

De acuerdo con la figura 13, del total de las 124 empresas nutracéuticas analizadas (número total de empresas en base a la clasificación no excluyente), aquéllas que emplean los ácidos grasos, destacando principalmente el omega 3, alcanzan un número de 76, seguido por los aceites marinos con 35 empresas. En tercer lugar se encuentran los extractos y polvos marinos, recurso aprovechado por 20 empresas.

En la tabla 7 se recogen un total de 22 biomoléculas y/o biocompuestos obtenidos a partir de diferentes recursos marinos tales como macroalgas y microalgas, mamíferos, peces o invertebrados marinos. Son varios los productos patentados o registrados de origen marino, correspondiendo el mayor número a aceites marinos, ácidos grasos y extractos y/o polvos marinos.

4.2. Biocompuestos farmacéuticos marinos

El rango de bioproductos y biomoléculas de grado farmacéutico con el que trabajan las empresas coincide en gran medida con los biocompuestos empleados por las empresas nutracéuticas. Sin embargo, y con excepción de los ácidos grasos, el uso que se le da a los diferentes compuestos varía en relación a las empresas nutracéuticas (figura 14).

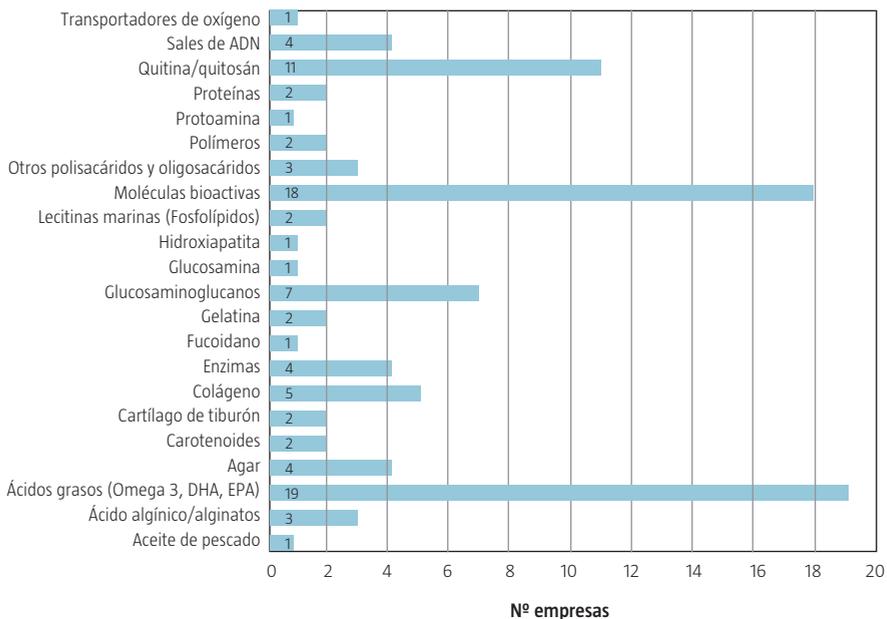


Figura 14. Relación de empresas farmacéuticas y uso de biocompuestos marinos

Del total de 62 empresas farmacéuticas analizadas (número total de empresas en base a la clasificación no excluyente), el número de aquéllas que emplean los ácidos grasos, destacando principalmente el omega 3, es de 19, seguido muy de cerca por las moléculas

Bioproducto/ biomolécula	Recurso marino	Patente de producto/tecnología	Origen de las empresas
Aceites marinos	Macroalgas y microalgas, fanerógamas, cefalópodos, mamíferos marinos, crustáceos, peces e hígados de pescado (tiburón, salmón y bacalao)	Calamarine® (Pharmamarine AS, Noruega) Coldsea™ Krill oil (JFM Sunile, Noruega) Huile de poisson 1812 TG Qualitysilver®, Huile de thon 25% DHA Qualitysilver® (Polaris, Francia) Novalgic® Krill oil (Sanofi-Aventis, Francia) Salmoil® (Marinebio, Noruega)	Alemania, España, Francia, Holanda, Italia, Noruega, Polonia, Reino Unido
Ácido algínico/Alginatos	Macroalgas	Algea® (Algea, Noruega) DuPont™ Danisco® (Danisco, Francia)	Italia, Francia, Noruega
Ácidos grasos (Omega 3, DHA, EPA)	Microalgas, crustáceos, peces, subproductos	Brudy Technology® (Brudy Technology, España) Calanus® Oil (Calanus AS, Noruega) Crystalpure™, Maxomega™ (Equatec, Reino Unido) Eupoly-3® (Biosearchlife, España) Kd-pür™ Technology (Bioseutica, Holanda) Marinol® (Stepan, Holanda) Omega 3 DHA AlgoFit™ (AlgoFit, Francia) Omegatri Technology® (Omegatri, Noruega) PLX Plus con omega 3® (New Developments in Nutraceuticals, España) PureMax™ (Croda, Reino Unido) Vivomega™ (Rieber Oils, Noruega)	Alemania, Bélgica, España, Francia, Holanda, Irlanda, Islandia, Italia, Noruega, Polonia, Reino Unido, Suecia
Agar	Macroalgas	-	España, Francia, Italia, Noruega, Portugal
Alquilgliceroles	Hígado de tiburón	Ecomer® (Natumin Pharma, Suecia)	Suecia
Carotenoides	Microalgas, macroalgas pardas	PLX Sea con astaxantina® (New Developments in Nutraceuticals, España)	Alemania, España, Irlanda, Noruega, Polonia
Cartílago	Peces (raya, tiburón)	-	España, Francia, Italia
Colágeno	Medusas, peces	Colway® (Collagen Colway Ltd, Polonia) Glycollagen® (Copalis, Francia)	Alemania, España, Francia, Holanda, Polonia, Reino Unido
Elastina marina	Peces	-	Francia
Extractos y polvos	Macroalgas, microalgas, fanerógamas, cefalópodos, crustáceos, moluscos, peces	Aquamin™ (Marigot, Irlanda) Digestica® (Bioatlantis, Irlanda) Calanus® Hydrolysate, Calanus® Powder (Calanus AS, Noruega) Fitalga® (Algues et mer, Francia) Phoscalim® (Copalis, Francia)	Alemania, España, Francia, Italia, Irlanda, Polonia, Reino Unido, Noruega
Fucoídano	Macroalgas pardas	-	Alemania, España
Gelatina	Peces	Rousselot Synergy Systems™ (Rousselot, Francia)	Alemania, España, Francia
Glucosamina	Crustáceos	-	Alemania, España, Francia, Holanda, Islandia, Italia, Noruega, Reino Unido
Glucosaminoglucanos (ácido hialurónico/hialuronatos, condroitín sulfato)	Peces	Glycollagen® (Copalis, Francia)	Alemania, España, Francia, Noruega, Reino Unido
Hidroxiapatita	Peces	-	Francia, Portugal
Lecitinas marinas (fosfolípidos)	Peces	-	Alemania, Francia
Lipoproteínas	Peces	DefendVid®, LipoEsar®, MineraXin®, Cabymar®, HepatoSar®, AntiGan® (Ebiotec, España)	España
Otros polisacáridos y oligosacáridos	Subproductos de origen marino	-	España, Francia, Reino Unido
Péptidos bioactivos	Organismos marinos sin identificar	Nutripeptin® (Copalis, Francia)	Francia, Noruega, Portugal
Polifenoles	Macroalgas, fanerógamas, subproductos de origen marino	-	Francia
Quitina y quitosán	Crustáceos	Chitoclear™ (Primex, Islandia)	Alemania, Francia, España, Islandia, Noruega, Polonia, Rusia
Sales de ADN	Peces	-	España, Francia

Tabla 7. Bioproductos y biomoléculas de origen marino para uso nutracéutico

bioactivas con 18 empresas. En tercer lugar se encuentran la quitina y quitosán, recurso aprovechado por 11 empresas.

Bioproducto/biomolécula	Recurso marino	Patente de producto/tecnología	Origen de las empresas
Aceite de pescado	Peces	-	Francia
Ácido alginico/Alginatos	Macroalgas	DuPont™ Danisco®, GRINDSTED® Alginate PH (Danisco, Francia) PRONOVA™ (Novamatrix, Noruega) Satialgine™, Algogell™, Satiagel™, Satiagum™ (Cargill, Francia)	Francia, Noruega
Ácidos grasos (Omega 3, DHA, EPA)	Microalgas, peces	Crystalpure™, Maxomega™ (Equatec, Reino Unido) Omacor®, Lovaza™, Zodin® (Pronova Biopharma, Noruega) Vascepa® (Amarin, Irlanda)	Alemania, España, Francia, Holanda, Irlanda, Noruega, Polonia, Reino Unido
Agar	Macroalgas	-	España, Francia, Italia, Portugal
Carotenoides	Macroalgas, microalgas	-	España, Polonia
Cartilago de tiburón	Peces (raya, tiburón)	-	España, Francia
Colágeno	Peces	-	España, Francia
Glucosaminoglucanos (Ácido hialurónico/hialuronatos, condroitín sulfato)	Peces, crustáceos, algas, subproductos, otros organismos marinos	-	Alemania, España, Francia, Noruega, Reino Unido
Enzimas	Microorganismos, peces	Penzyme® (Zymetech, Islandia) ColdZyme® Mouth Spray (Enzymatica, Suecia)	Alemania, Islandia, Reino Unido, Suecia
Lecitinas marinas (Fosfolípidos)	Peces	-	Alemania, Francia
Fucoidano	Macroalgas pardas	-	Alemania
Gelatina	Peces	Rousselot Synergy Systems™ (Rousselot, Francia)	Francia
Glucosamina	Crustáceos	Droglican® (Bioibérica, España)	España
Hidroxiapatita	Peces	-	Francia, Portugal
Otras moléculas bioactivas sin identificar	Microorganismos, fanerógamas, poríferos, tunicados, moluscos, equinodermos, algas, otros organismos marinos	Yondelis®, Aplidin®, Zalypsis® (Pharmamar, España) Refirmar™ (Bioalvo, Portugal) SeaRch™ (Aquapharm Biodiscovery, Reino Unido)	Alemania, Austria, España, Francia, Italia, Irlanda, Portugal, Reino Unido
Otros polisacáridos y oligosacáridos sin identificar	Varios organismos marinos	-	Reino Unido
Otros polímeros sin identificar	Macroalgas	Carragelose® (Marinomed Biotechnologie GmbH, Austria) NovaMatrix™ (Novamatrix, Noruega)	Austria, Noruega
Otras proteínas sin identificar	Microorganismos, peces	-	España, Francia, Reino Unido
Protamina	Peces	-	Noruega
Quitina y quitosán	Crustáceos	Protasan™ (Novamatrix, Noruega)	Alemania, Francia, Noruega
Sales de ADN	Peces	-	España, Francia
Transportadores de oxígeno	Anélidos, crustáceos	HEMO2Life®, HEMO2Ling®, HEMOXYcarrier® (Hemarina, Francia)	Francia

Tabla 8. Bioproductos y biomoléculas de origen marino para uso farmacéutico

En la tabla 8 se indican los compuestos identificados, el recurso marino empleado para su obtención, la existencia de patentes o productos registrados y el origen de las empresas que emplean dichos biocompuestos. Los compuestos que presentan mayor número de patentes se corresponden con los alginatos, los ácidos grasos, y ciertas moléculas no identificadas.

4.3. Biocompuestos marinos de aplicación biomédica

Se han identificado 12 biomoléculas o bioproductos que son empleados por algunas empresas con fines biomédicos. Del total de 43 empresas biomédicas identificadas (número total de empresas en base a la clasificación no excluyente), los biocompuestos más empleados son las moléculas bioactivas (18 empresas), seguidas a gran distancia de la quitina y quitosán (9 empresas), y las enzimas (7 empresas) (figura 15).

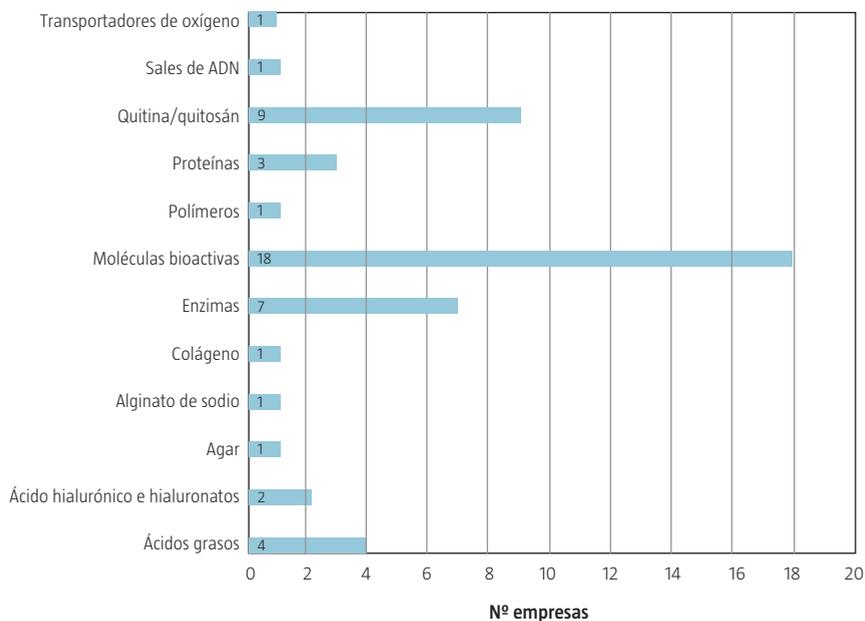


Figura 15. Relación de empresas biomédicas y uso de biocompuestos marinos

En la tabla 9 se recogen los biocompuestos que aprovechan las empresas biomédicas, los recursos marinos a partir de los cuales se obtienen diferentes compuestos, la aplicación de los mismos y el país de origen de las empresas. Cabe decir que los compuestos que poseen un mayor número de patentes son las enzimas.

Bioproducto/ biomolécula	Recurso	Patente de producto/ tecnología	Origen de las empresas	Aplicación
Ácido hialurónico e hialuronatos	Peces	-	Alemania, España, Francia, Noruega, Reino Unido	Fabricación de biomateriales
Ácidos grasos (Omega 3, DHA, EPA)	Peces	MariGen™ Omega3 (Kerecis, Islandia)	Irlanda, Islandia	Reconstrucción de la piel, tratamiento de hernias
Agar	Macroalgas	-	Italia	Impresión dental
Alginato de sodio	Macroalgas	PRONOVA™ (Novamatrix, Noruega)	Noruega	Fabricación de biomateriales
Colágeno	Medusas, peces	-	Francia	Reconstrucción piel dañada
Enzimas	Microorganismos, peces, poríferos, otros organismos marinos	Penzyme®, Zymetech® (Zymetech, Suecia) Silicatein® (Nanotecmarin GmbH, Alemania)	Alemania, Italia, Islandia, Reino Unido, Suecia	Investigación en el campo de la osteoporosis Investigación y desarrollo en el área de enzimas marinas (Penzyme) y formulaciones tópicas que aportan estabilidad proteica Desarrollo de biomateriales, composites y dispositivos médicos
Otras moléculas bioactivas sin identificar	Algas, microalgas, microorganismos, fanerógamas, poríferos, tunicados, moluscos, equinodermos, otros organismos marinos	Algebiosys™ (Algenics, Francia) SeaRch™ (Aquapharm Biodiscovery, Reino Unido)	Austria, Francia, España, Holanda, Italia, Alemania, Irlanda, Reino Unido, Portugal	Necesidades médicas no cubiertas (enfermedades autoinmunes, daños tisulares causados por enfermedades crónicas y degenerativas) Estudio de propiedades antitumorales y anti-degenerativas Desarrollo de antibióticos para tratar infecciones resistentes a fármacos Enfermedades neurodegenerativas e identificación de nuevos targets terapéuticos (glicosilados p.ej.) Psoriasis, enfermedades respiratorias Oncología, virología, neurología Fibrilación atrial Investigación de moléculas anti-envejecimiento
Otros polímeros sin identificar	Macroalgas, peces	-	Austria, Francia	Desarrollo de tratamientos antivirales e inmunológicos Biomateriales, osteoartritis, oftalmología
Otras proteínas sin identificar	Moluscos, otros organismos marinos	-	Italia, Reino Unido, Suecia	Proteína adhesiva de mejillón para empleo en composiciones adhesivas en contacto con tejido vivo (evaluación toxicológica y ensayo preclínico)
Quitina y quitosán	Crustáceos	NovaMatrix™, Protasan™ (Novamatrix, Noruega)	Alemania, España, Islandia, Noruega, Portugal	Producción de biomateriales Tratamientos cicatrizantes Diseño de nanosistemas de encapsulación de principios activos Liberación de fármacos
Sales de ADN	Peces	-	Francia	Reconstrucción del daño cutáneo
Transportadores de oxígeno	Anélidos, crustáceos	-	Francia	Conservación de órganos Tratamientos cicatrizantes Transportadores de oxígeno de hemoglobina

Tabla 9. Bioproductos y biomoléculas de origen marino para uso biomédico

5. Recursos marinos empleados por las empresas objetivo

Las empresas identificadas aprovechan diversos tipos de organismos marinos para el desarrollo de su actividad. Así, algunas de ellas emplean organismos inferiores como invertebrados (poríferos, tunicados o moluscos) mientras que otras recurren a organismos vertebrados como peces o incluso mamíferos. A continuación, se incluyen los diferentes recursos marinos y el porcentaje de empresas que los emplean como fuente de obtención de biocompuestos de interés (figura 16). Esta clasificación no es excluyente, así una empresa que aprovecha un recurso marino puede aprovechar simultáneamente otros de los representados en el gráfico.

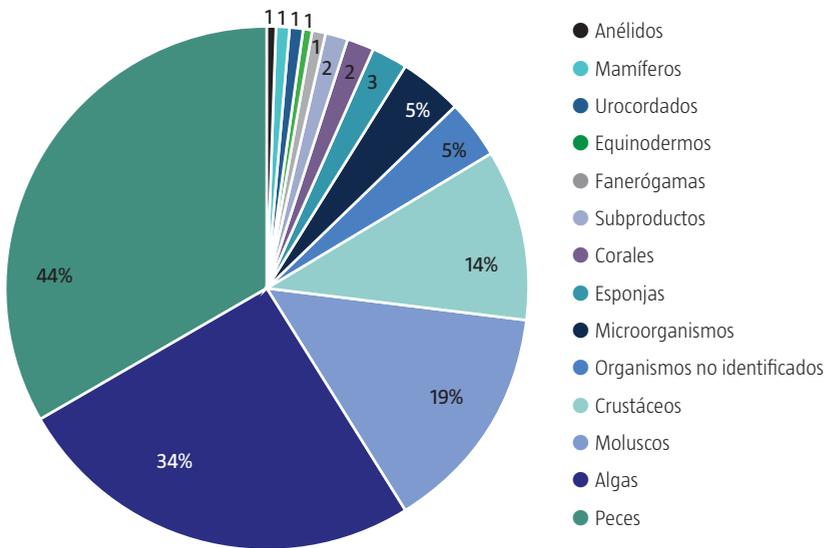


Figura 16. Porcentaje de empresas que emplean uno u otro recurso marino

En el gráfico se observa que el 44% del total de las empresas identificadas emplean peces como recurso marino para obtención de compuestos, en segundo lugar, se encuentran las algas (34%), y en tercer y cuarto lugar, con porcentajes muy similares, están los moluscos (19%) y los crustáceos (14%). Con un 5% están aquellas empresas que emplean microorganismos (incluyendo bacterias y actinomicetos marinos, dinoflagelados y hongos marinos) y organismos sin identificar. Además, el 3% de las empresas emplean poríferos como fuente de obtención de biomoléculas y/o biocompuestos de interés; con un 2% las compañías que usan subproductos y corales, y por último, un 1% de las empresas emplea anélidos, mamíferos, urocordados, equinodermos y fanerógamas marinas.

6. Observaciones finales

- Los recursos marinos, tanto organismos como subproductos, ofrecen una gran diversidad de biocompuestos naturales que son aprovechados por más de 160 empresas europeas pertenecientes a los sectores nutracéutico, farmacéutico y biomédico.
- De los 13 recursos marinos explotados por las empresas identificadas en este estudio, los peces ocupan la primera posición estando destinados a la obtención de numerosos biocompuestos de diversa naturaleza como ácidos grasos, aceites, colágeno, elastina, enzimas, glucosaminoglicanos como el ácido hialurónico, condroitín sulfato, hidroxapatita y lipoproteínas entre muchos otros, y que presentan aplicaciones en los tres campos de interés.
- Más de la mitad de las empresas identificadas desarrollan su actividad únicamente en el sector nutracéutico a lo largo de 13 países europeos. El biocompuesto mayormente explotado por estas empresas, al igual que las compañías farmacéuticas, es el omega 3.
- El mayor número de biocompuestos registrados y/o patentados por el conjunto total de las empresas identificadas corresponde a ácidos grasos y aceites marinos.
- Las empresas biomédicas centran mayoritariamente sus esfuerzos en el aislamiento de moléculas bioactivas que posteriormente son susceptibles de ser incluidas en procesos de producción de fármacos o biomateriales.
- Aunque el alcance geográfico del presente estudio no cubre el continente europeo en su totalidad ni se ha dedicado el mismo esfuerzo a la identificación de empresas en unos países y otros; los resultados que aquí se presentan sirven como precedente y ofrecen una visión general sobre el mercado actual de los productos nutracéuticos, farmacéuticos y biomédicos de origen marino en Europa, así como la representación empresarial biotecnológica que posee cada uno de esos sectores en este continente.

7. Glosario de biomoléculas y biocompuestos

Aceites marinos: Aceites obtenidos a partir de recursos marinos tales como algas, peces, mamíferos o invertebrados marinos. Los aceites de origen marino se caracterizan por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga destacando el EPA

(ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico). La metodología y condiciones de extracción del aceite de pescado son vitales e influirán en la calidad final del producto.

El aceite de **pescado e hígados de pescado** se obtiene a partir del músculo de pescado, como subproductos de la harina de pescado, o directamente a partir de las vísceras de peces. Generalmente son ricos en triacilglicérols de ácidos grasos, sobre todo poliinsaturados de cadena larga (PUFAs), y otros lípidos polares. Sin embargo, en algunas especies, los lípidos mayoritarios son los ésteres de cera, apolares y que restan digestibilidad al pescado.

El aceite de **calamar** es muy rico en DHA y además reúne una serie de características que lo hacen un recurso atractivo para el mercado de los productos nutracéuticos. Así, algunos productos patentados como Calamarine®, producido por la empresa noruega Pharmamarine, se adhieren al principio de que el aceite es producido únicamente a partir de subproductos de calamar y en gran medida, generados por pesquerías artesanales de este recurso marino. El aceite de calamar posee una elevada estabilidad oxidativa comparada con otros aceites de pescado además de ser un aceite limpio y de sabor y olor neutro.

El aceite obtenido a partir de la **foca**, posee un porcentaje de alrededor del 9% en DHA, 6,5% de EPA y 4% de DPA. Es comercializado por la empresa noruega JFM Sunile. Este aceite contiene omega 3 natural incluso en cantidades 10 veces superiores a los ácidos grasos omega 3 o DPAs de otros aceites de pescado. Entre sus propiedades beneficiosas destacan la de ser apropiado para diabéticos, capacidad reductora del colesterol, bueno para la piel seca o psoriasis entre otros. El aceite de foca ártico se obtiene a partir de foca de Groenlandia, la cual no figura en la lista de especies amenazadas.

El aceite de **krill**, es un producto que se obtiene a partir de pequeños crustáceos marinos que se alimentan directamente de diatomeas y dinoflagelados ricos en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, especialmente EPA y DHA. Aunque el contenido de aceites en el krill es bajo (cerca del 3%) es considerado uno de los aceites ricos en omega-3 de mayor calidad ya que contiene a la vez fosfolípidos y astaxantina. A esta última se le atribuye su mayor capacidad antioxidante y mejor conservación.

Ácido alginico/Alginatos: Hidrocoloide en forma de polisacárido coloidal que se obtiene de forma natural de las paredes celulares de las algas pardas donde llega a tener concentraciones entre los 20% a 25% del peso seco del alga. Las sales sódicas, cálcicas y potásicas se denominan alginatos y se emplean frecuentemente en la industria de la alimentación como espesantes y emulsionantes. Los alginatos comerciales se extraen principalmente de los géneros *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Eclonia*, *Lessonia*, *Durvillea* y *Sargassum*.

Aunque cualquier alga parda puede ser empleada como fuente de alginatos, la estructura química de éstos varía de un género a otro y entre los diferentes tejidos del alga. La cantidad, composición y secuencia estructural de los alginatos dependen de varios factores incluyendo el taxón, la especie, la estación, la edad del tejido y las condiciones ambientales. La gelificación es una característica importante de los alginatos.

Ácidos grasos (Omega 3, DHA, EPA): Los ácidos grasos omega 3 son ácidos grasos esenciales poliinsaturados, que se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados (por regla general pescado azul como el arenque, caballa, anchoas o sardinas, entre otros), y en algunas fuentes vegetales como las semillas de lino, los cañamones y las nueces. Algunas fuentes de omega 3 pueden contener otros ácidos grasos como los omega 6. La ingestión de aceite de pescado (fuente importante de ácidos grasos omega 3) está relacionada con la mejora de la salud humana contra numerosas enfermedades. Varios estudios de investigación han demostrado que el consumo de pescado aumenta los niveles de EPA y DHA en sangre lo que reduce el riesgo de sufrir enfermedades coronarias del corazón a través de diferentes vías. También destacan los efectos antitrombóticos de estos ácidos grasos disminuyendo el riesgo de trombosis entre muchas otras propiedades.

Agar: Polisacárido complejo presente en las paredes celulares de las algas rojas. El agar comercial se extrae principalmente de los géneros Gelidium, Gracilaria, Acantkopenltis, Ceramium y Pterocladia. Es un polímero estructural cuya función en las algas es análoga pero diferente de la que ocupa la celulosa en las plantas terrestres. La naturaleza química del agar depende de varios factores como el taxón, la especie, las condiciones ambientales, fisiológicas y el procedimiento de extracción.

Alquilglicerol: Éteres lipídicos no polares, constituyentes mayoritarios del aceite de hígado de diversas especies de tiburones y otros peces elasmobranquios. En su estructura, una molécula de glicerina se une a una cadena alquílica mediante un enlace éter a través de uno de sus grupos hidroxilo. Los alquilglicerol pueden contener distintos ácidos grasos en su estructura, esterificando los grupos hidroxilo restantes de la molécula de glicerina, y según esto pueden ser no esterificados, monoesterificados y diesterificados. Tienen importantes propiedades biofuncionales, como estimulantes, anticancerígenos, antivirales y de liberación de fármacos.

Carotenoides: Pertenecen a la familia de los terpenos, es decir están formados por unidades de isopreno, y su biosíntesis se produce a partir de isopentenil pirofosfato. Esto produce su rasgo estructural más evidente: la presencia de muchos dobles enlaces conjugados y de un

buen número de ramificaciones de grupos metilo, situados en posiciones constantes. Se conocen alrededor de 600 compuestos de esta familia, que se dividen en dos tipos básicos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, sus derivados oxigenados. A estos dos tipos hay que unir los apocarotenoides, de tamaño menor, formados por ruptura de los carotenoides típicos.

El carotenoide *astaxantina* es un antioxidante pigmentado producido por muchas microalgas las cuales son responsables del color rojo asociado de manera frecuente a los crustáceos como langostinos, cangrejos y langostas. Estudios recientes demuestran que este carotenoide reduce la inflamación y estimula el sistema inmune en humanos. Estudio in vivo e in vitro han demostrado sus efectos antitumorales así como la efectividad en la prevención y tratamiento del daño oxidativo de la retina y la degeneración macular. Se cree que este carotenoide es un antioxidante más fuerte que las vitaminas E y C o que otros carotenoides como el licopeno, beta-caroteno, luteína o zeaxantina.

Los *betacarotenos* son pigmentos liposolubles que se producen mediante reacciones fotosintéticas y enzimáticas llevadas a cabo por microalgas, bacterias o plantas. Los animales superiores no son capaces de sintetizar de forma endógena estos carotenoides, por lo que deben ingerirlos con la dieta. Los beta-carotenos son carotenoides compuestos únicamente por átomos de carbono e hidrógeno.

Otro carotenoide es la *fucoxantina*, con propiedad antioxidante presente en las algas pardas, las cuales utilizan dicho pigmento para captar la luz a mayor profundidad. Entre sus propiedades se encontrarían la de ayudar al cuerpo en el empleo de grasas para generación de calor en lugar de acumularla en células grasas. De ahí que se le dé un uso potencial en productos antiobesidad pero también posee otras aplicaciones como inducción de la apoptosis vía acción prooxidante.

Cartilago: El cartilago de tiburón es conocido como un producto alimenticio usado como terapia biológica, es decir, basada en sustratos biológicos que se encuentran en la naturaleza, al cual se le atribuyen propiedades para favorecer la integridad del cartilago y ayudar a proteger el tejido cartilaginoso. El cartilago está compuesto esencialmente por mucopolisacáridos, proteínas, colágeno desnaturalizado y glucosaminoglicanos que contienen condroitinsulfato del tipo A y C. Algunas empresas lo comercializan como coadyuvante en el tratamiento de las afecciones dolorosas inflamatorias, para favorecer la defensa inmune, la regeneración celular y para ayudar a la recuperación muscular en el caso de personas que practican deporte con frecuencia.

Colágeno: El colágeno es una proteína que juega un papel de gran importancia en los tejidos y órganos y expresión funcional de las células. Está compuesto por tres cadenas que forman una triple hélice, cada una de las cuales presenta unos 1.400 aminoácidos, siendo uno de cada tres una glicina. El colágeno hidrolizado comercial se presenta como un polvo blanco inodoro, de sabor neutro que se disuelve fácilmente en líquidos fríos. Se comporta como agente emulsionante y espumante, texturizador y aglutinante, estando formado por la misma materia prima que la gelatina aunque sin sus propiedades gelificantes. Es empleado de manera frecuente en la industria médica y farmacéutica como transportador de moléculas en medicamentos, proteínas y genes. Investigaciones clínicas sugieren que la ingestión de hidrolizados de colágeno reduce el riesgo de sufrir osteoartritis.

Elastina marina: La elastina marina se obtiene por hidrólisis enzimática del tejido conectivo de algunas especies de pescado. Está formada por polipéptidos de bajo peso molecular que la hacen soluble y fácil de asimilar. La elastina es rica en algunos aminoácidos como la prolina, leucina, isoleucina, alanina y valina. Se caracteriza por la presencia de desmosina e isodesmosina. Ayuda a dar elasticidad a los tejidos y a acortar el envejecimiento.

Enzimas: Moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, es decir, que hacen que las reacciones transcurran a mayor velocidad. Algunos enzimas destacadas son las silicateínas y silicasas presentes en las esponjas. Son muy interesantes para el campo de la nanobiotecnología dado que pueden ser empleadas en la formación de materiales nanocomposites, empleando la naturaleza como modelo para la producción de nuevos sistemas nanoescala; aunque presentan una gran variedad de aplicaciones.

Extractos y polvos marinos: Se extraen a partir de diferentes organismos como crustáceos, moluscos o algas. En el caso del polvo de crustáceos, este se obtiene a partir de la carne de crustáceos no cultivados que son sometidos a un proceso de cocción para su posterior deshidratación. El polvo es micronizado y envasado. Se suele emplear como materia prima para su obtención: carne de cangrejo, carne de cigala, carne de langostino, caparazón de las mismas especies y también carne de calamar.

Otros productos que se obtienen siguiendo procesos similares son el polvo de mejillón para el que se emplea normalmente el mejillón de labios verdes de Nueva Zelanda (Green lipped mussel). A esta especie se le atribuyen numerosas propiedades como la de disminuir la síntesis de algunas proteínas ligadas a la inflamación, controlar el dolor asociado a la artritis y mejorar los niveles de citoquinas. El extracto de este molusco es una fuente rica en hierro, betaína y glicaminoglicanos. Algunas empresas siguen tratamientos específicos

para recoger los minerales depositados en las conchas de otros moluscos como las ostras y los comercializan en forma de polvo.

En cuanto a los extractos y polvos de pescado, éstos están constituidos por proteínas que se obtienen a partir de especies como el bacalao, el carbonero y el eglefino. Mediante hidrólisis enzimática se obtienen cadenas cortas de polipéptidos con bajo peso molecular a unas condiciones determinadas de pH y temperatura. Para garantizar una calidad óptima, el proceso es controlado de manera estricta para preservar los aminoácidos que se encuentran en la materia prima y mejorar su biodisponibilidad y solubilidad.

Asimismo, también se pueden encontrar en el mercado extractos y polvos de fanerógamas, como la especie *Zostera marina*, que se recoge en las arribazones para posteriormente obtener extractos que pueden ser incluidos como ingrediente de productos nutracéuticos.

En cuanto a las microalgas, tradicionalmente, la microalga de agua dulce *Spirulina (Spirulina spp)* ha sido un pilar en productos nutricionales durante muchos años. Pero existen otras especies de interés como *Dunaliella salina*, *Lithothamnium calcareum* o *Nannochloropsis spp*. También se utilizan especies de macroalgas como *Ascophyllum spp*, *Fucus spp*, *Laminaria spp* y *Macrocystis spp*, que son utilizadas como polvos secos, suspensiones o extractos simples. Los extractos de macroalgas son bioestimulantes naturales extraídos a partir de diferentes especies de algas. Algunas empresas los comercializan como productos con propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticoagulantes.

Fucoidano: Polisacárido sulfatado presente principalmente en varias especies de algas pardas. Se encuentran variantes de este polisacárido en el pepino de mar. Se emplea en algunos productos dietéticos. Existen al menos dos formas distintas de fucoidano: F-fucoidano el cual posee un porcentaje superior de ésteres sulfatados de mucosa al 95% y el U-fucoidano, con un porcentaje de ácido glucurónico del 20%. Los efectos fisiológicos y bioquímicos del fucoidano han sido examinados en varios estudios en animales, a pequeña escala *in vitro*. Se ha visto que el F-fucoidano inhibe la hiperplasia en conejos e induce apoptosis en líneas celulares del linfoma humano *in vitro*.

Gelatina: Se trata de un ingrediente de origen animal que tradicionalmente se obtiene a partir de pieles de porcino, bovino o pescado y que puede ir destinado a varios tipos de aplicaciones farmacéuticas, alimenticias o técnicas. La gelatina de origen marino presenta ventajas respecto a la obtenida a partir de otras fuentes debido al bajo riesgo de presentar patógenos desconocidos como los de la encefalopatía espongiiforme bovina. La gelatina

es una proteína pura al 86% (12% agua) que procede de la hidrólisis parcial del colágeno contenido dentro del tejido conjuntivo. Mediante la desnaturalización por calor se puede convertir fácilmente el colágeno en gelatina. La gelatina es una proteína única debido a su contenido aminoacídico, en particular, aminoácidos no polares como la glicina, alanina y prolina y a la presencia significativa de hidroxiprolina. La gelatina se puede emplear como espesante, espumante, emulsionante, plastificante, agente anti-sinéresis o como sustituto de materia grasa, floculante, ligante o estabilizante entre otros.

Glucosamina: La glucosamina es un aminoazúcar que actúa como precursor de la síntesis bioquímica en la glicosilación de las proteínas y de los lípidos. Se encuentra principalmente en el exoesqueleto de los crustáceos y otros artrópodos, en los hongos y en otros muchos organismos, siendo el monosacárido más abundante. Se obtiene con fines comerciales a partir de la hidrólisis de exoesqueletos de crustáceos, especialmente para el tratamiento de la artritis y la artrosis.

Glicosaminoglicanos: Los glicosaminoglicanos o glicosaminoglucuronanos también llamados mucopolisacáridos, son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos. Existen dos tipos fundamentales de glicosaminoglicanos: glicosaminoglucuronanos estructurales, que son polisacáridos con alternancia de enlaces $\beta(1-4)$ y $\beta(1-3)$. Entre este tipo destacan ejemplos como los sulfatos de condroitina o el ácido hialurónico; y los glicosaminoglucuronanos de secreción: polisacáridos con alternancia de enlaces $\beta(1-4)$ y $\beta(1-3)$, siendo el más importante la heparina.

El ***condroitín sulfato*** es un glicosaminoglicano sulfatado compuesto por una cadena de disacáridos de N-acetilgalactosamina y N-ácido glucurónico alternados. Se encuentra habitualmente asociado a proteínas constituyendo agregados de alto peso molecular denominados proteoglicanos. Es un importante componente de la mayoría de los tejidos de vertebrados e invertebrados y está presente principalmente en aquellos que poseen una gran matriz extracelular, como los que forman los tejidos conectivos del cuerpo, cartílago, piel, vasos sanguíneos, así como los ligamentos y los tendones. El condroitín sulfato aporta al cartílago sus propiedades mecánicas y elásticas, y le proporciona a este tejido mucha de su resistencia a la compresión. El condroitín sulfato ha sido aislado de varias fuentes naturales incluyendo las terrestres (bovina, porcina y cartílago de pollo) y especies marinas como ballenas, tiburones, rayas, calamares, salmones, cangrejo real y pepino de mar pero también se ha descrito en pequeños invertebrados como cnidarios, poliquetos y moluscos. De todos ellos, el más usado comercialmente es el procedente del cartílago de tiburón.

Por otra parte el *ácido hialurónico* es un glicosaminoglicano no sulfatado y constituye el principal componente macromolecular de la matriz intercelular de muchos tejidos conectivos como el cartílago, humor vítreo, el cordón umbilical y el tejido sinovial. Puede estar presente en el cordón umbilical pero también en las crestas de los gallos además de algunos recursos marinos como los peces cartilaginosos y el humor vítreo de diferentes especies de peces. Presenta la propiedad de retener grandes cantidades de agua y de adoptar una conformación extendida en disolución.

Hidroxiapatita: Mineral formado por fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que representa el depósito del 99% del calcio corporal y 80% del fósforo total. Constituye alrededor del 60-70% del peso seco del tejido óseo, haciéndolo muy resistente a la compresión. Algunas empresas comercializan hidroxiapatita bajo el nombre comercial de *calcio marino*.

Lecitinas marinas (fosfolípidos): Poseen un elevado contenido en ácidos grasos omega 3 lo que hace que sean nutrientes atractivos para ser empleados en aplicaciones anti-inflamatorias, en dietas con bajo contenido en grasas, en la mejora de la actividad cerebral y en el balance del ratio de ácidos grasos omega 3 y 6. Los fosfolípidos marinos poseen una alta biodisponibilidad de DHA y EPA y son perfectamente estables contra la oxidación mucho más que los triglicéridos o etil-ésteres como los aceites de pescado. Algunas empresas ofrecen un producto denominado *Lecitinas naturales marinas LC*, que consiste en una gama de extractos aceitosos y pastosos con una composición de fosfolípidos marinos que varía entre el 10 y 60%, los cuales son ricos en DHA y colina.

Lipoproteínas: Macromoléculas compuestas por proteínas y lípidos que transportan masivamente las grasas por todo el organismo. Son esféricas, hidrosolubles, formadas por un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) cubiertos con una capa externa polar de 2nm, formada por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre. Estabilizan los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, etc.), en un entorno acuoso como es la sangre. Se clasifican en diferentes grupos según su densidad. Algunas empresas comercializan lipoproteínas extraídas a partir de diferentes especies de pescado como las del pescado azul (sardina, jurel y caballa) o moluscos bivalvos como el mejillón.

Otros polisacáridos y oligosacáridos: Se trata de biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuentran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales. Estos compuestos llegan a tener un peso molecular muy elevado, que depende del número de residuos o unidades de

monosacáridos que participan en su estructura. Los polisacáridos pueden descomponerse, por hidrólisis de los enlaces glucosídicos entre los residuos, en polisacáridos más pequeños, así como en disacáridos o monosacáridos. La unión de dos a nueve monosacáridos cíclicos mediante enlaces de tipo glucosídico da lugar a los oligosacáridos.

La rama de la biología que se ocupa del estudio de la estructura, biosíntesis y función de los sacáridos que pueden existir de manera pura o combinados con otras moléculas biológicas para formar gliconjugados, se denomina glicobiología. En la actualidad algunos centros de investigación y empresas biotecnológicas trabajan en este campo de la biología dado que ofrece un enorme potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos obtenidos a partir de sacáridos u otras moléculas que actúan como diana en la biosíntesis y función de estos azúcares.

Entre la gran variedad de moléculas de origen marino, los polisacáridos sulfatados de las algas poseen una gran importancia económica demostrada por la amplia aplicación que poseen en la industria alimentaria y medicina además de no poseer ningún homólogo en los organismos terrestres. Además de las microalgas, también se pueden obtener polisacáridos a partir de otros invertebrados marinos (cnidarios, poríferos, moluscos, anélidos, crustáceos, equinodermos o braquiópodos), peces y bacterias.

Moléculas y péptidos bioactivos: Las moléculas bioactivas o biomoléculas son aquellas producidas por un organismo vivo, incluyendo macromoléculas de gran tamaño como las proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos así como moléculas de pequeño tamaño como metabolitos primarios, secundarios y productos naturales, que presentan unas características y propiedades particulares y de aplicación para el campo de la biomedicina. Existen gran cantidad de moléculas bioactivas de origen marino identificadas hasta la fecha, algunas de las cuales han sido sometidas a largos estudios de investigación y de ahí que se encuentren en fase preclínica o incluso como parte de productos farmacéuticos en el mercado.

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de una proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud, que son liberados durante el procesado industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal. Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto, entre otros, sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso.

La literatura científica evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores.

Polifenoles: Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas presentes tradicionalmente en plantas y caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles se dividen generalmente en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados. Algunos estudios indican que los polifenoles pueden tener capacidad antioxidante con potenciales beneficios para la salud. Podrían reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Algunos autores han encontrado polifenoles en productos marinos como la *Zostera*, cuyas hojas poseen un contenido en ácido rosmarínico superior al del propio romero.

Polímeros: Los polímeros son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. El almidón, la celulosa, la seda y el ADN son ejemplos de polímeros naturales, y entre los polímeros sintéticos, encontramos el nailon, el polietileno y la baquelita. Existen numerosos polímeros de origen marino de potencial interés para el diseño y fabricación de biomateriales y armazones proteicos (scaffolds) en el campo de la biomedicina.

Protamina: Proteína ligada al ADN de los espermatozoides del esperma de salmón. Posee varias aplicaciones cosméticas pero también se emplea como inhibidor de la actividad de la lipasa, estimulando la actividad de los agentes quelantes de radicales libres. En cuanto a las propiedades farmacéuticas figuran la de neutralizar la heparina in vivo y retrasar el efecto de la insulina. Como propiedades bioquímicas presenta gran afinidad cromatográfica y transferencia génica.

Proteínas: Las proteínas son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Por sus propiedades físico-químicas, las proteínas se pueden clasificar en proteínas simples, que por hidrólisis dan solo aminoácidos o sus derivados; proteínas conjugadas, que por hidrólisis dan aminoácidos acompañados de sustancias diversas; y proteínas derivadas, sustancias formadas por desnaturalización y desdoblamiento de las anteriores. Las proteínas son indispensables para la vida, sobre todo por su función plástica, pero también por sus funciones biorreguladoras y de defensa. Las proteínas desempeñan un papel fundamental

para la vida y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Son imprescindibles para el crecimiento del organismo. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes.

Algunas empresas comercializan un concentrado proteico de pescado bajo la forma de **autolisado de pescado**, un producto resultante de la digestión de tejidos de pescado por sus propias enzimas, de manera que se obtiene una predegradación de las proteínas en polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos. La fracción proteica constituye alrededor de un 80% del peso total.

También cabe destacar la proteína adhesiva de mejillón o MAP. Existen numerosas referencias bibliográficas en las que se evalúa la MAP para su uso potencial *in vivo* incluyendo el trasplante de condrocitos humanos o cirugía oftálmica. Hoy en día, el producto médico se comercializa como adhesivo seco que se activa en contacto con el tejido vivo. Algunas empresas ofrecen el producto como una cinta adhesiva doble con el film adhesivo aplicado a ambos lados de un polímero biodegradable. La MAP para uso clínico se encuentra en estudio preclínico y evaluación toxicológica.

Quitina y quitosán: Descubierto en 1859, el quitosano (o quitosán) es una molécula presente de manera natural en la concha de los crustáceos. Se trata de un polisacárido compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil glucosamina que se repiten. El quitosano se produce, comercialmente mediante la desacetilación de la quitina, que es un elemento estructural del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostas, etc.). Es un bioadhesivo y puede ligarse a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas. Debido a esta propiedad física, permite el transporte de principios activos polares a través de las superficies epiteliales, siendo además biocompatible y biodegradable. Las cualidades de purificación de los quitosanos están disponibles en aplicaciones biomédicas. El quitosano y sus derivados, como el trimetilquitosano (compuesto en el que el grupo amino ha sido trimetilado), han sido empleados en el transporte de genes no víricos. El trimetilquitosano o, incluso, el quitosano cuaternizado se han mostrado capaces de hacer transfección de las células malignas del cancer de pecho.

Salas de ADN: Se trata de ADN altamente polimerizado, también denominado HPDR y que está formado por largas fibras de ADN extraído a partir del esperma de salmón salvaje. Gracias a sus propiedades médicas, este material ha sido empleado en varios fármacos, como biopolímero bien de manera oral o en formato inyectable así como en aplicaciones nutraceuticas. Entre sus propiedades destacan la de ser un antioxidante, cicatrizante, estimulante y carece de efectos tóxicos. Es biocompatible y biodegradable. También se

puede emplear en purificaciones bioquímicas y diagnósticos. Además del ADN sodio también se puede producir, ADN calcio, ADN magnesio, ADN cinc, ADN cobre entre otros.

Transportadores de oxígeno: Se trata de un tipo de transportadores de oxígeno específicos desarrollados en base a la estructura y función de los pigmentos respiratorios de invertebrados (hemoglobina extracelular en anélidos y hemocianina en crustáceos). Estos transportadores presentan numerosas aplicaciones como la conservación de órganos mediante la oxigenación del órgano trasplantado y la disminución del riesgo de rechazo. Otra aplicación es la funcionar como apósito que aporta oxígeno a heridas hipóxicas de úlceras y que no poseen en la actualidad una solución terapéutica. Dado que la falta de oxígeno impide el proceso de cicatrización y el crecimiento celular de las heridas, el uso de este apósito aporta grandes ventajas que radican en la adición de hemoglobinas directamente a la matriz del apósito aportando oxígeno extra a la herida.

Referencias

- Asociación de Fabricantes y Comercializadores de Aditivos y Complementos Alimentarios (AFCA). <http://www.afca-aditivos.org/>
- Andalucía BIORegión - Cluster Biotecnológico de Andalucía. <http://www.andaluciabioregion.es>
- Asociación Española de Bioempresas. <http://www.asebio.com>
- Asociación de Empresas Biotecnológicas de la Comunidad de Madrid. <http://www.biomadrid.org>
- Asociación Catalana de Tecnología. <http://www.actec.cat/>
- Association française des Biotechnologies. <http://www.france-biotech.org>
- Associação dos Centros de Empresa e Inovação Portugueses. <http://www.bics.pt>
- Associação Portuguesa de BioIndústrias. <http://www.apbio.pt>
- Banca dati delle imprese del Sistema Italia. <http://www.guidamonaci.it>
- Barrow, C., y Shahidi, F. (2008). Marine Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press, 494 pp
- Biobasque. <http://www.biobasque.org>
- Biocat. <http://www.biocat.es>
- Bioclúster de les Illes Balears. <http://www.bioib.org>
- Biodeutschland. <http://www.biodeutschland.org>
- Biogenouest. <http://www.biogenouest.org>
- Biomeridies. <http://www.biomeridies.com>
- Biotechgate Company Database. <http://www.biotechgate.com>
- Biotechnologia Italia. <http://www.biotechnologia.it>

Biotechnology Europe. <http://www.biotechnology-europe.com>

Biotechnology Industry Organization. <http://www.bio.org>

Capbiotek. <http://www.capbiotek.fr>

Clúster Tecnológico Empresarial de las Ciencias de la Vida de Galicia (Bioga). <http://www.bioga.org>

CSA Marine Biotech. <http://www.marinebiotech.eu>

Directorate-General for Research and Innovation Biotechnologies, Agriculture, Food-Knowledge-Based-Bioeconomy (European Commission). FP7-Cooperation-Theme 2. (2012) Interim catalogue of marine related projects. Biotechnologies, Agriculture, Food

Euopharm SMC. <http://www.euopharmsmc.org>

European Association of Bioindustries. <http://www.europabio.org>

European Biotechnology Network. <http://www.european-biotechnology.net>

European Science Foundation. Marine Board. (2010). Position Paper 15 Marine Biotechnology: A New Vision and Strategy for Europe. <http://www.esf.org/marineboard>

Farmaindustria. (2010) Estudio sobre la financiación de empresas de reciente creación en el ámbito de la biomedicina. Informe final ref V15. Madrid

Federation of European Specialty Food Ingredients Industries. <http://www.elc-eu.org/>

German Biotech Database. <http://www.germanbiotech.com>

Green, D.W., Howard, D., Yang, X., Kelly, M., Oreffo, R.O.C. (2003). Natural marine sponge fiber skeleton: a biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation. **Tissue Engineering** 9(6): 1159-1166

Guía de empresas en el sector biotecnológico español. Fundación Española para el desarrollo de la investigación en Genómica y Proteómica. <http://www.canariasbioregion.org/upload/File/Empresasbiotecnologia/Guiaempresas2006Genomaespana.pdf>

Idealg. <http://www.idealq.ueb.eu/>

Innovateuk. <https://connect.innovateuk.org>

Irish Bioindustry Association. <http://www.ibec.ie/ibia>

Kim, S. y Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International* 39: 383-393

Lloyd-Evans, L.P.M. (2005). A study into the prospects for marine biotechnology development in the United Kingdom Volume 1-Strategy. Foresight Marine Panel. Marine Biotechnology Group. BioBridge Ltd

Louët, S. (2004) Norway goes private to develop biotech. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/bioent812

Marelife. <http://www.marelife.org>

Marinalg International. <http://www.marinalg.org>

Moo-Puc, R., Robledo, D., Freile-Pelegrín, Y. (2009). In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas* 35(4): 345–358

Netalgae. <http://www.netalgae.eu>

- Norwegian Bioindustry Association. <http://www.biotekforum.no>
- Notions élémentaires sur les bioproduits. <http://www.biocap.ca/images/pdfs/BioproduitsPrimerF.pdf>
- Marine Functional Foods Research Initiative (NutraMara). <http://www.nutramara.ie>
- Plataforma Tecnológica Española de los Alimentos. <http://www.foodforlife-spain.org>
- Polish Biotech Database. <http://www.polishbiotech.com>
- Project Special. <http://www.project-special.eu>
- Regalado, E.L., Laguna, A., Martínez, J.R. (2010). Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente 19
- Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Ratiskol, J., Godeau, G., Fischer, A.M., Helley, D., Collicec-Jouault, S. (2011). Review: Marine Polysaccharides: A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering. *Marine Drugs* 9: 1664-1681.
- Silva, T.H., Alves, A., Ferreira, B.M., Oliveira, J.M., Reys, L.L., Ferreira, R.J.F., Sousa, R.A., Silva, S.S., Mano, J.F., Reis, R.L. (2012). Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*
- Sociedad Española de Nutracéutica Médica. <http://www.nutraceuticamedica.org/>
- Spain Technology. <http://www.spaintechnology.com>
- Tecnio ACC10. <http://www.acc10.cat/tecnio>
- Thimmanagari, M., McDonald, I., Todd, J. (2010). Introduction aux bioproduits. Commande N° 10-014W AGDEX 80. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales. Ontario. Canadá
- Valenzuela A., Sanhueza, J., De la Barra, F. (2012). El aceite de pescado: Ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista Chilena de Nutrición* 39(2): 201-209
- 7th International Sponge Symposium Biodiversity, Innovation, Sustainability. 7-13 mayo 2006. Book of Abstracts. Série Livros 16. Museo Nacional. Armação de Búzios, Rio de Janeiro, Brazil
- Wijffels, R.H., Pomponi, S.A. (2010). Marine Biotechnology in the 21st Century. *Biotechnology Research for a Complex World* (2010) Oral Presentation. Barcelona (España)



Miembros del Consorcio del Proyecto MARMED



Universidade de Vigo





European Community

European Regional
Development Fund

INVESTING IN OUR COMMON FUTURE

