

ALIMENTOS FUNCIONALES

ALIMENTOS FUNCIONALES

Grupo de coordinación:

Manuela Juárez, CSIC

Agustín Olano, CSIC

Federico Morais, FIAB

© de la edición

Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT)

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Convenio Específico de Colaboración entre el MAPA y la FIAB para la ejecución de determinadas actuaciones del fomento del sector industrial agroalimentario. Año 2005.

Impresión: RUMAGRAF, S.A. Avda. Pedro Díez, 25. 28019 Madrid

ISBN: 84-689-4204-9

Depósito Legal: M-42536-2055

Contenido

Introducción	7
I. La evaluación científica de los alimentos funcionales	11
I.1. Introducción	12
I.2. La ciencia de la alimentación funcional	12
I.3. Marcadores de función	14
I.4. Sistemas de evaluación de un efecto funcional	15
I.5. Áreas temáticas de la alimentación funcional	16
I.6. Criterios comunes	19
I.7. Conclusiones	21
I.8. Bibliografía	21
II. Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud	23
II.1. Introducción	25
II.2. Probióticos, prebióticos y simbióticos	26
II.3. Ingredientes funcionales de naturaleza proteica	39
II.4. Ingredientes funcionales de naturaleza lipídica	57
II.5. Otros ingredientes funcionales	66
II.6. Conclusiones	69
II.7. Bibliografía	70
III. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales	101
III.1. Introducción	103
III.2. Radicales libres y envejecimiento	105
III.3. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal	111
III.4. Relevancia de la biodisponibilidad y el metabolismo	141
III.5. Factores que afectan al contenido cuali y cuantitativo de sustancias fitoquímicas	147
III.6. Estrategias para la elaboración de alimentos funcionales	150
III.7. Conclusiones	152
III.8. Bibliografía	153
IV. Fibra dietética y antioxidantes en la dieta española y en alimentos funcionales	167
IV.1. Resumen	168
IV.2. Introducción	169
IV.3. Paradojas nutricionales	170

IV.4.	Fibra y compuestos bioactivos	173
IV.5.	Dieta española y mediterránea	179
IV.6.	Parámetros para definición de dietas saludables y de dieta mediterránea	189
IV.7.	Ingredientes funcionales	192
IV.8.	Criterios nutricionales para la elaboración de alimentos funcionales	198
IV.9.	Limitaciones de las bases de datos y tablas de composición de alimentos	201
IV.10.	Conclusiones e hipótesis	204
IV.11.	Bibliografía	207
V.	Lípidos como alimentos funcionales	215
V.1.	Resumen	217
V.2.	Introducción	218
V.3.	Aspectos estructurales, funcionales y metabólicos de los lípidos	219
V.4.	Efectos saludables de los lípidos de la dieta	226
V.5.	Efectos de los lípidos de la dieta en situaciones fisiológicas	227
V.6.	Efectos de los lípidos de la dieta en situaciones patológicas	236
V.7.	Conclusiones	261
V.8.	Bibliografía	262
VI.	Alimentos transgénicos funcionales	281
VI.1.	Genética y mejora de propiedades funcionales	282
VI.2.	Alimentos transgénicos con mejor composición proteica	284
VI.3.	Semillas oleaginosas transgénicas con nuevas composiciones de ácidos grasos	285
VI.4.	Modificaciones en la composición de vitaminas	286
VI.5.	Plantas transgénicas sin deficiencias en hierro	289
VI.6.	Producción de otros compuestos con relevancia funcional o sanitaria en organismos transgénicos	291
VI.7.	Vacunas orales	293
VI.8.	Producción en la leche de animales transgénicos de proteínas de interés farmacológico	295
VI.9.	El futuro	297
VI.10.	Bibliografía	298

Introducción

Los alimentos funcionales, definidos como aquellos que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporcionan beneficios para la salud o reducen el riesgo de sufrir enfermedades, están irrumpiendo con fuerza en los mercados internacionales, dado el interés de los consumidores por la relación entre la alimentación y la salud.

Las múltiples posibilidades de elaboración de alimentos funcionales, basadas en la incorporación a un alimento convencional de una gran variedad de ingredientes con actividad biológica, en la eliminación de constituyentes no deseados o en la modificación de otros, hacen que la gama de productos comercializados actualmente haya aumentado de forma espectacular.

En los países industrializados, una gran parte de la población, para la que cubrir las necesidades nutricionales ya no es un problema, dispone en el mercado de una gran variedad de nuevos alimentos con ingredientes bioactivos que están diseñados para cubrir necesidades de salud específicas. Ante la amplia oferta de nuevos productos, los consumidores necesitan entender claramente los criterios científicos en los que se basan sus potenciales beneficios para la salud y demandan información acerca de sus propiedades para así poder decidir sobre la conveniencia de su adquisición.

Aunque se han realizado numerosos estudios epidemiológicos *in vitro*, con animales de experimentación y clínicos, que ponen de manifiesto el beneficio para la salud del consumo de ingredientes bioactivos, el conocimiento de cómo estos ingredientes actúan en el organismo no está en muchos casos suficientemente consolidado. Ello se debe, entre otras causas, a la complejidad de las múltiples interacciones entre los constituyentes de los alimentos durante el proceso digestivo y las repercusiones en el metabolismo de los mismos. Los diferentes estilos de vida, edad, estado de salud y hábitos alimentarios entre poblaciones, incluso dentro de una misma sociedad, dificultan también la generalización de los resultados obtenidos en los estudios realizados e indican que un ingrediente bioactivo no es necesariamente eficaz para todos los consumidores. Por tanto, existen todavía multitud de aspectos de la relación alimentación/salud en las distintas etapas de la vida y para individuos en situaciones metabólicas diferentes que requieren investigación, aunque hay resultados que impulsan cada vez más el desarrollo de nuevos productos.

En el libro que se presenta, en el primer capítulo, “La evaluación científica de los alimentos funcionales”, del que son autores los Dres. Francisco Guarner y Fernando Azpiroz, se recogen aspectos básicos del concepto de la alimentación funcional, así

como áreas temáticas en las que la alimentación funcional puede demostrar efectos relevantes y marcadores/sistemas de evaluación de los efectos funcionales.

Por otra parte, el libro reúne en otros cinco capítulos el estado actual del conocimiento sobre las propiedades bioactivas de los ingredientes funcionales, así como las investigaciones más recientes encaminadas al establecimiento de los mecanismos de acción biológica de dichos ingredientes. Aunque cada capítulo centra sus objetivos en aspectos diferentes de los alimentos funcionales, las propiedades y aplicaciones de los ingredientes bioactivos de mayor relevancia, tales como los lípidos, compuestos fenólicos y carbohidratos prebióticos, se comentan de modo complementario a lo largo del libro en diferentes capítulos, con objeto de ofrecer un amplio panorama de las múltiples posibilidades que dichos ingredientes tienen en el desarrollo de alimentos, que puedan mejorar la salud y reducir el riesgo de la aparición de enfermedades.

Las Dras. María Isidra Recio y Rosina López-Alonso, en el capítulo dedicado a “Ingredientes y productos lácteos funcionales”, comentan las propiedades de alimentos prebióticos, probióticos, simbióticos y diversos tipos de alimentos funcionales basados en la adición de ingredientes bioactivos de distintos orígenes a productos lácteos. Asimismo, describen los ingredientes lácteos funcionales de naturaleza proteica y lipídica y sus propiedades bioactivas.

En el capítulo de “Constituyentes bioactivos no nutricionales de origen vegetal”, del que son autores los Dres. Juan Carlos Espín y Francisco A. Tomás-Barberán, se describen los principales constituyentes agrupados en polifenoles, terpenoides y compuestos azufrados, explicando su biodisponibilidad y metabolismo, así como el mecanismo de acción y su contribución a la prevención de distintos tipos de patologías.

En el capítulo sobre “Fibra dietética y dieta mediterránea”, cuyos autores son los Dres. Fulgencio Saura-Calixto e Isabel Goñi, se comentan las características de la dieta mediterránea, la utilidad de la fibra como ingrediente en alimentos, así como los criterios nutricionales para la elaboración de alimentos funcionales.

En el capítulo de “Lípidos insaturados como alimentos funcionales”, del que son autores los Dres. María Dolores Mesa, Concepción María Aguilera, Javier Linde, María del Carmen Ramírez y Ángel Gil, se comentan los distintos tipos de lípidos que integran la dieta (con especial énfasis en los mono y poliinsaturados) y los efectos saludables debidos a su consumo, tanto durante la gestación como en la infancia y periodo adulto. Se describe cómo influyen estos componentes en el crecimiento y desarrollo del ser humano, así como su implicación en la prevención y tratamiento de patologías de distinto origen.

El Dr. Daniel Ramón describe, en el capítulo dedicado a “Alimentos transgénicos”, las posibilidades de la ingeniería genética para la producción de alimentos que contengan ingredientes funcionales, modificando la composición en ácidos grasos, vitaminas, minerales, polifenoles, etc.

El rigor científico de los capítulos que constituyen el libro, avalado por el reconocido prestigio de los autores, y su claridad de presentación proporcionan una información asequible a un amplio sector de lectores especializados y consumidores interesados en la relación entre la dieta y la salud. Por ello se estima que la lectura del conjunto, aunque sin pretender ser exhaustiva, aporta una puesta al día sobre los datos actualmente disponibles de aspectos prácticos de los alimentos funcionales seleccionados.

AGUSTÍN OLANO. Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

MANUELA JUÁREZ. Instituto del Frío (CSIC)

I. La evaluación científica de los alimentos funcionales

Francisco Guarner y Fernando Azpiroz

Unidad de Investigación de Aparato Digestivo

Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona

I.1. Introducción

I.2. La ciencia de la alimentación funcional

I.3. Marcadores de función

I.4. Sistemas de evaluación de un efecto funcional

I.5. Áreas temáticas de la alimentación funcional

I.6. Criterios comunes

I.7. Conclusiones

I.8. Bibliografía

1.1. Introducción

La cultura ancestral conoce bien la vinculación entre alimentación y buena salud, y además aprecia el buen saber y las tradiciones que revelan ese vínculo. Sin embargo, la ciencia ha enfocado, y quizá limitado, la relación alimentación-salud atendiendo sólo a los aspectos nutritivos de la comida. El extraordinario desarrollo de la bioquímica desde comienzos del siglo XX y su gran impacto en las ciencias biológicas son, probablemente, la causa de que los alimentos se hayan estudiado primordialmente desde la perspectiva de la nutrición. La función principal de los alimentos es la de cubrir las necesidades metabólicas del individuo en cuanto al aprovisionamiento de combustibles y de materiales plásticos para la renovación de los tejidos. Un alimento es bueno si es bueno como nutriente. Esta afirmación es científicamente válida pero claramente insuficiente desde el punto de vista de la cultura tradicional. En el binomio alimentación y salud habría que reconocer otros beneficios que no se encasillan en los aspectos puramente nutricionales. La nutrición es una función de los alimentos, pero cabe pensar en otras funciones que pueden obtenerse a través de una alimentación adecuada. A la entrada del siglo XXI, la ciencia atiende a esta nueva perspectiva y se plantea el estudio de la promoción de salud a través de la alimentación con horizontes más amplios (Sastre Gallego, 2005). Así nace el concepto de “alimentación funcional” en distintos ámbitos científicos de Asia, Europa y América (Diplock *et al.*, 1999).

La nueva concepción de los alimentos requiere nueva metodología y nuevos instrumentos para investigar y evaluar los efectos funcionales de la comida. Antes podía bastar el estudio de la composición de un alimento y de la biodisponibilidad de sus componentes. Ahora, además, se necesitan los instrumentos adecuados para detectar el efecto funcional, estimar su magnitud, determinar la exposición requerida para que tenga lugar el efecto, identificar las personas o grupos de personas susceptibles de experimentar el efecto, etc.

1.2. La ciencia de la alimentación funcional

En Europa, el abordaje científico de la alimentación funcional tiene su punto de partida más destacable en un grupo de trabajo promovido y coordinado por la Sección Europea del International Life Sciences Institute (ILSI) y patrocinado por la Comisión Europea como Acción Concertada dentro del 4.º Programa Marco de Investigación. El proyecto se tituló *Functional Food Science in Europe* (acrónimo FUFLOSE) y propuso una serie de conceptos y definiciones de consenso con el fin de proporcionar bases y fundamentos apropiados para el futuro desarrollo científico de la alimentación funcio-

nal. Es interesante y conveniente comentar sumariamente algunas de las conclusiones del proyecto FUFOSSE, publicadas hace ya unos años (Bellisle *et al.*, 1998; Diplock *et al.*, 1999). Evidentemente, se trata de conceptos propuestos desde una perspectiva científica y con la finalidad de promocionar el desarrollo científico de este campo. Por tanto, sus implicaciones desde el punto de vista legal o de reglamentación no son necesarias ni obligadas, y dependerán de la voluntad del legislador.

En primer lugar, se propone una definición *ad hoc*: un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad (Diplock *et al.*, 1999). Al proponer esta definición, el grupo de trabajo no pretende decir la “última palabra” sobre la cuestión, es decir, promulgar una fórmula cerrada y definitiva, sino más bien describir y delimitar convenientemente el concepto de modo que permita trabajar científicamente sobre una base precisa. Cabe destacar tres aspectos importantes y novedosos en la definición: a) el efecto funcional es distinto que el nutritivo; b) debe demostrarse satisfactoriamente; c) puede consistir en mejoría de funciones fisiológicas (incluyendo funciones psicológicas como el bienestar) o en reducción de riesgo de desarrollar un proceso patológico.

El grupo de trabajo enuncia, además, una serie de características adicionales que son compatibles con el concepto: un alimento funcional siempre debe ser un alimento (se excluyen explícitamente píldoras o cápsulas), pero puede ser un alimento natural, o también puede ser un alimento transformado tecnológicamente para retirar o modificar alguno de sus componentes o añadir un nuevo elemento. Estas transformaciones no confieren necesariamente el carácter de alimento funcional, sino que el efecto funcional debe demostrarse expresamente en cada caso. Es decir, la transformación tecnológica de un producto lácteo por extracción de la grasa o adición de ácidos grasos más saludables no le convierten automáticamente en alimento funcional, sino que es necesario que se demuestre un efecto beneficioso debido a la transformación tecnológica del producto.

Los objetivos primarios de la ciencia de la alimentación funcional son identificar las interacciones beneficiosas entre un alimento concreto y una o más funciones del organismo y, además, obtener evidencias sobre los mecanismos implicados en la interacción. Estos objetivos primarios de la nueva ciencia deben cubrirse con la metodología científica apropiada y de uso común en las ciencias de la vida (fisiología, psicología, farmacología, biomedicina), que incluye experimentación *in vitro* o *ex vivo* en líneas celulares o tejidos en cultivo, modelos animales y estudios de observación o de intervención en personas humanas.

1.3. Marcadores de función

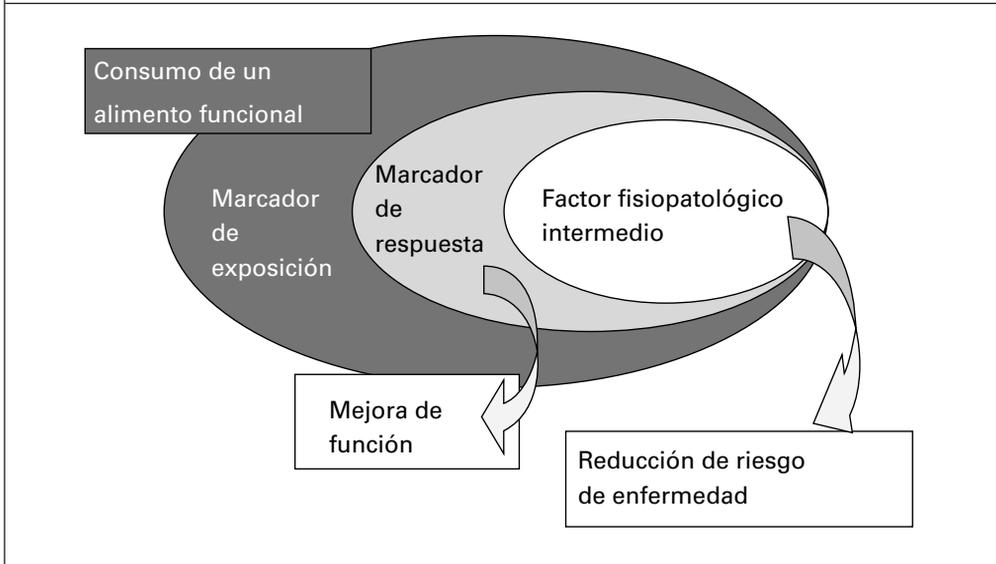
En segundo lugar, el grupo de expertos propone que la ciencia de la alimentación funcional debe identificar y validar marcadores biológicos relevantes para evaluar las funciones del organismo e investigar la modulación de los marcadores mediante los alimentos. Ésta es una de las conclusiones más interesantes y trascendentes del proyecto FUFOSÉ. La demostración de un efecto funcional precisa que se definan claramente cuáles son los marcadores válidos de las distintas funciones biológicas (Bellisle *et al.*, 1998). Esta cuestión es clave para el desarrollo futuro de la ciencia de la alimentación funcional, y se considera crítica y difícil.

El grupo de trabajo reconoce que algunos marcadores pueden representar un evento directamente relacionado con el efecto, y entonces serían “factores” involucrados en el efecto funcional. Pero esto no es necesario en todos los casos, porque otros marcadores válidos pueden ser meros “indicadores”, asociados a un evento pero sin estar directamente implicados en su génesis. Por ejemplo, la elevación del colesterol HDL respecto a la fracción LDL es un “indicador” válido de protección frente a enfermedades cardiovasculares, aunque no esté claramente demostrada su implicación como factor responsable de la protección cardiovascular (Bellisle *et al.*, 1998).

Los marcadores biológicos relevantes para la ciencia de la alimentación funcional son diversos y se reconocen distintos tipos (figura 1). Unos marcadores no son propiamente funcionales pero sí de exposición, y serían los que demuestran la exposición a un alimento funcional o a un componente funcional de un alimento (por ejemplo, niveles eritrocitarios de ácido fólico, niveles de ácidos grasos omega 3 en plasma o membrana celular, presencia de un probiótico en heces, etc.). Otros marcadores pueden ser útiles para medir la respuesta a una intervención y son los que reflejan directamente una función biológica o psicológica (presión arterial, tiempo de tránsito colónico, cuestionarios de calidad de vida o de bienestar) o son un factor intermedio en un proceso fisiológico o fisiopatológico (índice de masa corporal, niveles de hemoglobina glicosilada como factor que predice desarrollo de diabetes tipo 2).

El grupo de trabajo recomienda que se usen los marcadores de forma dinámica, es decir, que se evalúen cambios o variaciones asociados a una intervención. Los marcadores deben validarse con estudios apropiados, y se recomienda que sean reproducibles, sensibles (baja incidencia de falsos negativos: un individuo que no muestra cambios en el marcador pero sí que experimenta respuesta en la función) y específicos (baja incidencia de falsos positivos: un individuo que muestra cambios en el marcador sin que haya respuesta).

Figura 1 Tipos de marcadores relevantes para la evaluación de los efectos de los alimentos funcionales según el grupo de trabajo de FUFOSSE (traducido de Diplock *et al.*, 1999)



1.4. Sistemas de evaluación de un efecto funcional

Las diversas contribuciones del proyecto FUFOSSE han sido y serán, sin duda, muy relevantes para enmarcar el campo de acción de una nueva ciencia, pero algunos aspectos importantes quedaron excesivamente indefinidos. ¿Qué quiere decir demostrar satisfactoriamente un efecto funcional? La demostración de un efecto puede obtenerse en el laboratorio trabajando con modelos animales sin necesidad de ensayos con personas humanas. La demostración puede ser satisfactoria para el consejo editorial de una revista científica de baja difusión, aunque sea rechazada y discutida por otros.

Con la finalidad de revisar la metodología existente y proponer los instrumentos adecuados para la investigación de los efectos funcionales de los alimentos, la Comisión Europea ha promovido y financiado recientemente una segunda Acción Concertada (dentro del 5.º Programa Marco) bajo la coordinación de la Sección Europea de ILSI y con la participación de unos 200 científicos de los cinco continentes en un enfoque ampliamente multidisciplinar. El proyecto, titulado *Process of the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods*, con el acrónimo PASSCLAIM, se ha desarro-

llado con éxito durante los cuatro últimos años (desde abril de 2001 hasta marzo de 2005), y ha dado lugar a un número importante de publicaciones científicas (Aggett *et al.*, 2005; Cummings *et al.*, 2004; Mensink *et al.*, 2003; Prentice *et al.*, 2003; Rafter *et al.*, 2004; Riccardi *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2003; Saris *et al.*, 2003; Westenhoefer *et al.*, 2004, entre otras).

El objetivo de la acción fue generar un cuadro o guía genérico con carácter instrumental que reuniera los principios necesarios para prestar una base científica a las alegaciones de los alimentos relacionadas con la salud. Se trataba también de revisar y evaluar críticamente los marcadores biológicos ya reconocidos, y proporcionar criterios para la identificación y validación de nuevos marcadores.

1.5. Áreas temáticas de la alimentación funcional

Desde el principio, los científicos que participaron en FUFLOSE propusieron que la ciencia de la alimentación funcional debía estructurarse en áreas relativas a las funciones que pueden mejorarse con los alimentos funcionales, evitando en cambio clasificaciones en base a los productos en sí mismos. Una clasificación basada en productos alimenticios sería menos universal por la variedad de regímenes y costumbres dietéticos en las distintas partes del mundo. En cambio, una clasificación funcional se adapta mejor al carácter de validez y aplicabilidad universal que requiere una ciencia.

El nuevo proyecto PASSCLAIM identificó y propuso siete áreas temáticas en las que la alimentación funcional puede demostrar efectos relevantes (figura 2). El proyecto se estructuró alrededor de esas siete áreas temáticas de modo que se constituyeron grupos de trabajo integrados por científicos de la academia y la industria, expertos en las respectivas áreas. La misión de cada grupo fue identificar funciones o disfunciones (patologías) susceptibles de ser influenciadas por los alimentos y, por tanto, de ser objeto de alegaciones de salud, describir los requerimientos científicos para comprobar y evaluar los efectos (y las alegaciones correspondientes) y, por último, revisar la utilidad de los marcadores existentes dentro de cada área funcional. Un octavo grupo trabajó de modo independiente en la revisión de los procesos legales para regulación de las alegaciones de los alimentos actualmente en uso en distintas partes del mundo. Sus conclusiones son menos pertinentes para la finalidad de este capítulo, por lo que se remite al lector a la publicación correspondiente (Richardson *et al.*, 2003).

Figura 2 Áreas temáticas en la ciencia de la alimentación funcional propuestas por el proyecto PASSCLAIM (Aggett *et al.*, 2005)

Patología cardiovascular relacionada con la dieta
Salud ósea y osteoporosis
Rendimiento y forma física
Regulación del peso corporal, sensibilidad a insulina y diabetes
Cáncer relacionado con la dieta
Estado mental y rendimiento psíquico
Salud gastrointestinal e inmunidad

En el área de enfermedades cardiovasculares hay abundancia de datos en la literatura científica que permiten confirmar la relevancia de la alimentación en la prevención del riesgo (Mensink *et al.*, 2003). Existen marcadores bien validados y universalmente aceptados como la fracción LDL del colesterol plasmático y las cifras de presión arterial. Se identifica la necesidad de validar otros marcadores relativos al *stress* oxidativo o las funciones de hemostasia (trombosis), que serían muy útiles en la investigación de alimentos funcionales. Es ésta probablemente una de las áreas con más oportunidades para la alimentación funcional.

La salud ósea es claramente susceptible de mejora con una alimentación adecuada en cuanto que el contenido mineral de calcio en los huesos puede regularse dietéticamente. El estudio de la densitometría ósea permite obtener marcadores válidos que se relacionan con la fortaleza de los huesos y la prevención de fracturas por osteoporosis (Prentice *et al.*, 2003).

El grupo de trabajo sobre forma física y rendimiento propuso una serie de parámetros para evaluar el trabajo muscular, aprovechamiento energético, estado de hidratación, desarrollo muscular, etc. Existen marcadores adecuados que permitirán el estudio de

la eficacia de la alimentación funcional en este área y la fundamentación científica de alegaciones (Saris *et al.*, 2003).

Otra área destacable por las oportunidades que ofrece a la alimentación funcional es la regulación del peso corporal, sensibilidad a la insulina y prevención de diabetes (Riccardi, 2004). Los trastornos y patologías relacionados con el sobrepeso corporal constituyen la plaga del siglo XXI. El rol de la dieta en el control de la nueva plaga es primordial, y se proponen una serie de marcadores físicos y bioquímicos que permitirán investigar los efectos de la alimentación funcional en este área.

Hay evidencias epidemiológicas que relacionan ciertos tipos de cáncer con la dieta. Existen oportunidades en este campo, pero hay dificultades metodológicas para llevar a cabo estudios adecuados por la larga evolución de los procesos. Hacen falta marcadores válidos que permitan definir estados de riesgo. De este modo, la modulación de los marcadores con intervenciones dietéticas debería ser útil para predecir el riesgo de desarrollo tumoral (Rafter *et al.*, 2004).

En cuanto al estado mental y rendimiento psíquico, existen abundantes instrumentos de medición cualitativa y cuantitativa de las funciones mentales (Westenhoefer *et al.*, 2004). El grupo de trabajo revisó una serie de funciones y propuso marcadores adecuados para valorar el impacto de la alimentación en dichas funciones.

Por último, la salud gastrointestinal y el sistema inmune se abordaron en un grupo de trabajo conjunto (Cummings *et al.*, 2004). El sistema gastrointestinal cuenta con un amplio número de parámetros susceptibles de medición, como absorción de nutrientes, cantidad y calidad de las secreciones, tiempo de tránsito, población bacteriana comensal y patógena, etc. Además, también existen instrumentos apropiados para medir las sensaciones originadas en el tracto gastrointestinal. Aunque las variaciones interindividuales son muy amplias, el grupo reconoció grandes oportunidades para la alimentación funcional en la promoción de salud gastrointestinal. Sin embargo, parece más difícil el estudio del sistema inmune en el individuo sano. Las variaciones de los parámetros del sistema inmune dentro del rango de la normalidad no tienen una vinculación clara con cambios en las funciones de defensa. Este campo necesita más desarrollo para poder disponer de marcadores adecuados, y se recomienda la aplicación de amplias baterías de parámetros inmunes en la investigación de los efectos de la alimentación.

1.6. Criterios comunes

Las alegaciones de salud sobre un alimento se deben basar en uno o varios efectos funcionales de ese alimento que hayan sido demostrados y comprobados con una metodología científicamente válida. A lo largo del proyecto PASSCLAIM se celebraron una serie de sesiones de discusión en grupos reducidos o de carácter plenario con el fin de elaborar un cuadro de criterios comunes a todas las áreas temáticas. Se trata de criterios que definen los requisitos o condiciones para valorar la calidad científica de los datos que justifican una alegación. La tabla 1 muestra los criterios propuestos por PASSCLAIM (Aggett *et al.*, 2005).

El criterio segundo describe las características idóneas de los estudios con capacidad para generar evidencia científica sobre un efecto. Habitualmente, los conocimientos científicos que revelan un efecto proceden inicialmente bien de estudios epidemiológicos de observación, o bien de trabajo de laboratorio en estudios fisiológicos con un número limitado de sujetos humanos, con modelos animales o con sistemas de cultivo de células u órganos. Los estudios de observación se basan en el seguimiento prospectivo de una población (estudios de cohorte) o en técnicas analíticas de tipo caso-control en las que se relacionan eventos o características alrededor de un caso con los de otros sujetos controles estudiados en paralelo. Los estudios de observación son muy importantes para identificar relaciones y pueden ser muy innovativos, pero carecen de fuerza para demostrar una vinculación causa-efecto dentro de las asociaciones que detectan. Los estudios de laboratorio con un diseño correcto pueden conseguir evidencias de tipo causa-efecto y, además, son el instrumento principal para conseguir información sobre mecanismos de acción. Sin embargo, la experimentación de laboratorio puede no ser reproducible *in vivo* o en una población humana concreta.

Por todo ello, el patrón habitual para demostrar una relación causa-efecto relevante para el ser humano lo constituyen los ensayos de intervención randomizados y controlados (RCT, *Randomised Controlled Trials*). Este tipo de estudios sirven, además, para calibrar la magnitud del efecto y detectar posibles efectos secundarios de la intervención. La metodología de estos estudios básicamente consiste en reclutar un número adecuado de sujetos que se distribuyen en dos o más grupos de modo aleatorio. Al menos uno de los grupos es control, de modo que no recibe la intervención activa que se ensaya en el otro u otros grupos. El diseño y metodología de este tipo de estudios fueron analizados hace unos años por una comisión de expertos que preparó un documento-guía para mejorar la calidad de los informes sobre RCT (*Consolidated Standards for Reporting of Trials*, CONSORT). Dicho documento puede consultarse en la literatura (Begg *et al.*, 1996), fue revisado posteriormente (Moher *et al.*, 2001) y sus

puntos-guía son actualmente accesibles desde la página web del grupo (<http://www.consort-statement.org>).

Los demás criterios de la tabla son autoexplicativos y responden a la necesidad de calibrar bien el grado de evidencia de un efecto. Cuánto mejor sea la calidad de los datos, más fuerza tendrá la evidencia que soporte la alegación del efecto.

Tabla 1 Criterios de PASSCLAIM para la fundamentación científica de las alegaciones	
Criterio 1	El alimento o componente del alimento al que se le atribuye el efecto alegado debe estar bien caracterizado.
Criterio 2	<p>La fundamentación de una alegación debe basarse en datos obtenidos en estudios con personas humanas, principalmente en estudios de intervención, cuyo diseño debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Grupos de estudio representativos de la población para la que se pretende el efecto. b) Controles apropiados. c) Adecuada duración de la exposición y del seguimiento para demostrar el efecto que se pretende. d) Caracterización de la dieta de base y otros aspectos relevantes del estilo de vida de los grupos en estudio. e) Cantidad de alimento o del componente consistente con el nivel de consumo que se recomienda. f) Influencia de la matriz o del contexto dietético en el efecto funcional. g) Monitorización de la ingesta del producto durante el estudio. h) Potencia estadística aplicada para ensayar la hipótesis.
Criterio 3	Cuando el objeto propio de la alegación no puede medirse directamente deben utilizarse marcadores.
Criterio 4	<p>Los marcadores deben ser:</p> <ul style="list-style-type: none"> — biológicamente válidos en tanto que tienen una relación conocida con el evento que representan, y su variabilidad en la población estudiada es conocida; — metodológicamente válidos con respecto a sus características analíticas.
Criterio 5	La variable primaria en estudio debe modificarse por la intervención de modo estadísticamente significativo, y el cambio debe ser biológicamente significativo para la población en estudio y consistente con la alegación.
Criterio 6	Las alegaciones se fundamentan científicamente teniendo en consideración la totalidad de los datos y valorando el peso de la evidencia.

1.7. Conclusiones

La alimentación funcional se plantea como ciencia que describe la interacción de los alimentos con la salud del individuo en aquellos aspectos que son independientes de su poder nutritivo. La nueva ciencia debe emplear adecuadamente los recursos metodológicos desarrollados por las demás ciencias de la vida, incluyendo la Biología y la Psicología, con el fin de generar nuevos conocimientos.

1.8. Bibliografía

- Aggett, P. J.; Antoine, J. M.; Asp, N. G.; Bellisle, F.; Contor, L.; Cummings, J. H.; Howlett, J.; Muller, D. J.; Persin, C.; Pijls, L. T.; Rechkemmer, G.; Tuijtelaars, S., y Verhagen, H.
(2005) PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur. J. Nutr.* 44 (Suppl. 1), 5-30.
- Begg, C. B.; Cho, M. K.; Eastwood, S., *et al.*
(1996) Improving the quality of reporting of randomized controlled trials: the CONSORT statement. *JAMA* 276, 637-639.
- Bellisle, F.; Diplock, A. T.; Hornstra, G.; Koletzko, B.; Roberfroid, M.; Salminen, S., y Saris, W. H. M.
(1998) Functional Food Science in Europe. *Br. J. Nutr.* 80 (Suppl. 1), 1-193.
- Cummings, J. H.; Antoine, J.-M.; Azpiroz, F.; Bourdet-Sicard, R.; Brandtzaeg, P.; Calder, P. C.; Gibson, G. R.; Guarner, F.; Isolauri, E.; Pannemans, D.; Shortt, C.; Tuijtelaars, S., y Watzl, B.
(2004) PASSCLAIM - Gut health and immunity. *Eur. J. Nutr.* 43 (Suppl. 2), 118-173.
- Diplock, A. T.; Aggett, P. J.; Ashwell, M.; Bornet, F.; Fern, E. B., y Roberfroid, M. B.
(1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *Brit. J. Nutr.* 81, S1-S27.
- Mensink, R. P.; Aro, A.; Den Hond, E.; German, J. B.; Griffin, B. A.; Ter Meer, H.-U.; Mutanen, M.; Pannemans, D., y Stahl, W.
(2003) PASSCLAIM - Diet-related cardiovascular disease. *Eur. J. Nutr.* 42 (Suppl. 1), 6-27.

- Moher, D.; Schulz, K. F.; Altman, D. G., for the CONSORT Group
(2001) The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* 357, 1191-1194.
- Prentice, A.; Bonjour, J.-P.; Branca, F.; Cooper, C.; Flynn, A.; Garabedian, M.; Müller, D.; Pannemans, D., y Weber, P.
(2003) PASSCLAIM - Bone health and osteoporosis. *Eur. J. Nutr.* 42 (Suppl. 1), 28-49
- Rafter, J.; Govers, M.; Martel, P.; Pannemans, D.; Pool-Zobel, B.; Rechkemmer, G.; Rowland, I.; Tuijelaars, S., y Van Loo, J.
(2004) PASSCLAIM - Diet-related cancer. *Eur. J. Nutr.* 43 (Suppl. 2), 47-84.
- Riccardi, G.; Aggett, P. J.; Brighenti, F.; Delzenne, N.; Frayn, K.; Niewenhuizen, A.; Pannemans, D.; Theis, S.; Tuijelaars, S., y Vessby, B.
(2004) PASSCLAIM - Body weight regulation, insulin sensitivity, and diabetes risk. *Eur. J. Nutr.* 43 (Suppl. 2), 7-46.
- Richardson, D. P.; Affertsholt, T.; Asp, N.-G.; Bruce, A.; Grossklaus, R.; Howlett, J.; Pannemans, D.; Ross, R.; Verhagen, H., y Viechtbauer, V.
(2003) PASSCLAIM - Synthesis and review of existing processes. *Eur. J. Nutr.* 42 (Suppl. 1), 96-111.
- Saris, W. H. M.; Antoine, J.-M.; Brouns, F.; Fogelholm, M.; Gleeson, M.; Hespel, P.; Jeukendrup, A. E.; Maughan, R. J.; Pannemans, D., y Stich, V.
(2003) PASSCLAIM - Physical performance and fitness. *Eur. J. Nutr.* 42 (Suppl. 1), 50-95.
- Sastre Gallego, A.
(2005) Nuevos alimentos. En *Tendencias en Alimentación Funcional*, eds. Serrano Ríos, M.; Sastre Gallego, A., y Cobo Sanz, J. M. You&Us, Madrid, pp. 1-14.
- Westenhoefer, J.; Bellisle, F.; Blundell, J. E.; De Vries, J.; Edwards, D.; Kallus, W.; Milon, H.; Pannemans, D.; Tuijelaars, S., y Tuorila, H.
(2004) PASSCLAIM - Mental state and performance. *Eur. J. Nutr.* 43 (Suppl. 2), 85-117.

II. Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud

Isidra Recio y Rosina López-Fandiño
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

II.1. Introducción

II.2. Probióticos, prebióticos y simbióticos

Probióticos

Efectos gastrointestinales de los microorganismos probióticos

Otras actividades

Administración de los microorganismos probióticos

Prebióticos

Actividades biológicas de los prebióticos

Administración de los prebióticos

Simbióticos

II.3. Ingredientes funcionales de naturaleza proteica

Proteínas lácteas

Actividad anticancerígena

Tratamiento de la hepatitis y virus de la inmunodeficiencia humana

Efecto en la composición corporal: masa muscular, obesidad y osteoporosis

Efecto sobre el tracto gastrointestinal del lactante

Otros efectos

Proteínas de otros orígenes como ingredientes funcionales en productos lácteos

Péptidos e hidrolizados proteicos

Efecto sobre el sistema cardiovascular

Efecto sobre el sistema nervioso

Efecto sobre el sistema inmune

Efecto sobre la absorción de nutrientes

II.4. Ingredientes funcionales de naturaleza lipídica

Lípidos lácteos

Ácido butírico

Productos de digestión de la grasa láctea

Ácido linoleico conjugado (CLA)

Fosfolípidos

II. Ingredientes y productos lácteos funcionales

Lípidos de otros orígenes como ingredientes funcionales en productos lácteos

Ácidos grasos poliinsaturados omega-3

Esteroles y estanoles

II.5. Otros ingredientes funcionales

Calcio

Fibra alimentaria

Ácido fólico

Compuestos antioxidantes

II.6. Conclusiones

II.7. Bibliografía

II.1. Introducción

Los alimentos funcionales son aquellos alimentos que contienen componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Este concepto nació en Japón, en los años ochenta, debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida a la vista de los elevados gastos sanitarios originados por el aumento de la longevidad de la población. En la actualidad, los consumidores están cada vez más concienciados de la relación existente entre la dieta y la salud, lo que ha impulsado el desarrollo y comercialización de alimentos con propiedades beneficiosas. Sin embargo, es evidente la necesidad de establecer científicamente las bases en las que se apoyan las alegaciones funcionales, y que se demuestren sus efectos en las cantidades que normalmente se consumirían en el contexto de una dieta global. Esto protegería y daría confianza a los consumidores y, a la vez, apoyaría a la industria en el desarrollo, comercialización y promoción de estos productos

Si bien en Japón ya se estableció en 1991 el concepto de “Alimentos para Uso Específico en la Salud” (Foods for Specified Health Use, FOSHU), y los requisitos que deben cumplir éstos, en la Unión Europea no existe una legislación uniforme sobre las alegaciones de salud. De hecho, la legislación europea relativa al etiquetado prohíbe hacer referencia a las propiedades preventivas, terapéuticas o curativas de los alimentos, incluso aunque existan pruebas científicas que las avalen.

Los aspectos regulatorios y de etiquetado han de comprender dos consideraciones fundamentales: seguridad y consolidación de la alegación funcional o beneficio para la salud que comporta el consumo del alimento. En este sentido, se admite que las alegaciones funcionales deberían estar apoyadas en datos científicos basados en la totalidad de la evidencia (es decir, no restringidos a la alegación en concreto), obtenidos en ensayos clínicos realizados en humanos, doble-ciegos al azar y con un grupo control (placebo). Además, tales estudios deben cumplir estrictos requerimientos, ser confirmados por grupos de investigación independientes y publicados en revistas de prestigio (Salminen *et al.*, 1996; Sanders y Veld, 1999).

Según la Acción concertada FUFLOSE, puesta en marcha en 1995 como respuesta de la Comisión Europea a la expansión de los alimentos funcionales en el mercado, se distinguirían dos tipos de alegaciones de salud: **alegaciones de funcionales de mejora**, asociadas a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y a actividades biológicas que van más allá de su papel establecido en el crecimiento, el desarrollo y otras funciones normales del cuerpo, y **alegaciones de reducción de riesgo de enfermedades**, que se asocian a la reducción del riesgo de padecer una determinada enfermedad o afección.

Dentro del mercado de los alimentos funcionales, en continua expansión, el mercado de los alimentos lácteos funcionales y de los ingredientes funcionales de origen lácteo supone un segmento muy importante (se estima que 5 billones de dólares en 2003) y en crecimiento (Playne *et al.*, 2003). Debe destacarse que, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, muchos productos lácteos tradicionales (yogur, leches fermentadas, calostro, leches maternizadas o la propia leche) pueden considerarse en sí mismos alimentos funcionales, a la vez que contienen multitud de ingredientes para la formulación de otros alimentos funcionales. Por otra parte, cada vez es más frecuente la inclusión de ingredientes funcionales de origen lácteo y no lácteo en leche y alimentos de base láctea, que incluyen bacterias probióticas y carbohidratos prebióticos, salvado, avena, almidón, calcio, ácidos grasos omega-3, ácido fólico, vitaminas y minerales, etc. El objetivo de este artículo es revisar los conocimientos actuales sobre ingredientes funcionales de origen lácteo y alimentos lácteos funcionales, haciendo especial hincapié en las bases científicas en las que se fundamentan sus efectos positivos para la salud.

II.2. Probióticos, prebióticos y simbióticos

El hecho de que en ausencia de microflora intestinal aumente el transporte de antígenos demuestra la importancia de ésta en el sistema defensivo. La principal función de la flora gastrointestinal radica en prevenir la colonización por microorganismos patógenos al competir por sus nichos ecológicos y sustratos metabólicos. El metabolismo microbiano supone, además, una importantísima fuente de energía para la pared intestinal, aproximadamente un 50% de los requerimientos diarios, gracias a la fermentación de carbohidratos a ácidos orgánicos. La microbiota intestinal también modula el sistema inmune mediante la inducción de tolerancia y la producción de inmunoestimulantes no inflamatorios (Tuohy *et al.*, 2003). Una vez comprendida la importancia de este mecanismo de defensa y la amenaza que para él suponen los patógenos gastrointestinales, algunos agentes quimioterapéuticos, fundamentalmente antibióticos, y ciertas enfermedades crónicas, los esfuerzos se han concentrado en el desarrollo de alimentos que contienen agentes que específicamente fortifican la microbiota gastrointestinal: probióticos, prebióticos y simbióticos.

Probióticos

Los probióticos son microorganismos no patógenos que, cuando se ingieren, ejercen una influencia positiva sobre la salud o la fisiología del huésped. Schrezenmeir y

De Vrese (2001), después de una discusión crítica de las distintas definiciones del término probiótico, propusieron definirlo como “una preparación de, o un producto que contiene, microorganismos viables, definidos y en número suficiente, los cuales alteran la microflora en un compartimento del huésped y, por ello, ejercen efectos beneficiosos en la salud de dicho huésped”. En esta definición, el concepto de probiótico está confinado a efectos ejercidos por microorganismos viables, pero es independiente del lugar de acción o del modo de administración.

Tradicionalmente se ha considerado que el éxito de la terapia probiótica se manifestaba en la normalización de la permeabilidad intestinal, la mejora de su función como barrera inmunológica y el alivio de las respuestas inflamatorias intestinales (Ouwehand *et al.*, 2002). La idea original consistía en que los probióticos pueden cambiar la composición de la flora gastrointestinal aumentando la microflora beneficiosa. Sin embargo, ahora se acepta que un mero cambio en la flora gastrointestinal no es un biomarcador suficiente de un beneficio potencial para la salud. Por el contrario, en el caso de algunos efectos, como la inmunomodulación, no es necesario que se produzca una modificación conmensurable en la composición de la microflora. Así, los probióticos mejorarían la salud del huésped debido no sólo a efectos locales, ligados a su capacidad de colonizar la mucosa intestinal, sino también a efectos distales ligados a su actividad promotora de la inmunidad celular y humoral (Clancy, 2003).

Las preparaciones comerciales de probióticos son normalmente mezclas de lactobacilos y bifidobacterias, aunque también se han empleado levaduras. Las más importantes son: *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *Lactococcus cremoris*, *Lc. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. gasseri*, *Saccharomyces boulardii* y *S. cerevisiae*. Entre los requisitos exigibles a los microorganismos probióticos se encuentran: ser de origen humano; demostrar un comportamiento no patógeno; exhibir resistencia a los procesos tecnológicos (viabilidad y actividad), a la acidez gástrica y a los ácidos biliares; adherirse al tejido epitelial del intestino; ser capaces de persistir, aunque durante periodos cortos, al tracto gastrointestinal; producir sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos, ácidos grasos, bacteriocinas...); modular la respuesta inmune e influir en la actividad metabólica (Dunne *et al.*, 1999). En cualquier caso, existen importantes excepciones y, además, su comportamiento en el tracto gastrointestinal y sus efectos varían entre las distintas cepas. De hecho, muchos son incapaces de colonizar el intestino, ni siquiera temporalmente, y ejercen sus efectos de modo local durante su paso por el sistema gastrointestinal, por lo que deben ser ingeridos regularmente para que persista cualquier propiedad favorable a la salud (Ouwehand *et al.*, 2002).

Se han hecho numerosas declaraciones sobre los efectos terapéuticos de los probióticos, en especial sobre su capacidad de prevenir o curar molestias intestinales; sin embargo, sólo algunas cepas han demostrado su actividad en estudios serios. Debe tenerse en cuenta que los ensayos encaminados a demostrar su efectividad deberían cumplir estrictos requerimientos, entre los que se encuentran documentar y ensayar cada cepa probiótica independientemente y emplear solamente cepas bien definidas. La tabla 1 resume los principales beneficios de estos microorganismos demostrados en estudios clínicos controlados en humanos (Ouweland *et al.*, 2002).

Efectos gastrointestinales de los microorganismos probióticos

Entre las actividades consideradas como científicamente probadas en un número suficiente de estudios (Andersson *et al.*, 2001; Marteau *et al.*, 2001), destaca la de mejorar la **digestibilidad de la lactosa**. Está bien establecido que las personas con intolerancia a la lactosa absorben mejor aquélla contenida en yogur o leche fermentada con *Lb. acidophilus* que la de la leche (De Vrese *et al.*, 2001). Se han establecido dos mecanismos principales para esta actividad: la digestión de la lactosa por los microorganismos del yogur, que continúa en el intestino delgado cuando se lisan las bacterias por los ácidos biliares, y un tránsito intestinal más lento cuando se consume yogur en vez de leche, debido a su viscosidad.

La **diarrea asociada a antibióticos** ocurre en, aproximadamente, el 20% de los pacientes tratados con éstos, y la causa es un desequilibrio microbiano que lleva a una disminución de la flora endógena, responsable de la resistencia a la colonización y de la capacidad fermentativa del colon. En muchos casos se debe a la proliferación de *Clostridium difficile*. Se han observado efectos terapéuticos positivos y concluyentes tras la administración oral de *S. boulardii* (Surawicz *et al.*, 1989; McFarland *et al.*, 1995), que posiblemente actúe reduciendo los niveles de *C. difficile*, sus toxinas o la secreción intestinal de éstas. La eficacia terapéutica de otros probióticos no ha sido tan bien establecida.

En el caso de **infecciones intestinales y colonización por bacterias patógenas**, destaca por su gravedad la recurrencia de infecciones por *C. difficile*. En ocasiones, las infecciones severas con *C. difficile*, que se tratan con antibióticos activos frente a bacterias aeróbicas, no llegan a ser erradicadas, lo que da lugar a episodios recurrentes de diarrea (de un 20% de los individuos tratados por el primer episodio hasta un 40% de los que han sufrido varios episodios). La adición de *S. boulardii* al tratamiento con metronidazol o vancomicina para la erradicación de *C. difficile* redujo a la mitad el riesgo de recurrencia en 124 pacientes (McFarland *et al.*, 1994). También se han referido resultados positivos tras el tratamiento con *Lb. rhamnosus* GG, aunque en ensa-

Tabla 1 Microorganismos usados como probióticos con efectos beneficiosos para la salud documentados en ensayos clínicos en humanos (adaptada de Ouwehand *et al.*, 2002)

Género	Especie	Ejemplo de cepa	Beneficio para la salud
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Reduce diarrea asociada a antibióticos
	<i>casei</i>	Shirota	Acorta la diarrea causada por rotavirus Reduce la recurrencia de cáncer de vejiga superficial Inmunomodulación
	<i>crispatus</i>		
	<i>fermentum</i>	KLD	
	<i>johnsonii</i>	La1	Mejora la vacunación oral Reduce la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>paracasei</i>	F19	
	<i>plantarum</i>	299v	Alivia el síndrome de intestino irritable Reduce el colesterol-LDL
	<i>reuteri</i>	SD2112	Acorta la diarrea causada por rotavirus
	<i>rhamnosus</i>	GG	Acorta la diarrea causada por rotavirus Inmunomodulación Alivia la enfermedad del intestino inflamable Tratamiento y prevención de alergia
	<i>salivarius</i>	UCC118	Reduce los síntomas de la enfermedad del intestino inflamable
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		Reduce los síntomas del síndrome del intestino irritable
	<i>longum</i>	BB536	
	<i>lactis</i>	Bb12	Tratamiento de alergia Acorta la diarrea causada por rotavirus Reduce la incidencia de la diarrea del viajero Mejora la vacunación oral
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	JS	
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>		
	<i>cereus</i>	toyoi	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Nissle 1917	Menores recaídas de la enfermedad del intestino inflamable
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SF68	
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>boulardii</i>	Menores recaídas de la enfermedad del intestino inflamable

yos abiertos (Bennet *et al.*, 1996), por lo que se necesitan más estudios para comprobar este punto.

La principal causa de diarrea aguda es la gastroenteritis, que puede deberse a varios patógenos virales o bacterianos y a parásitos, aunque la causa más frecuente **en niños** es la **infección por rotavirus**. Varios ensayos controlados al azar han mostrado un efecto beneficioso de probióticos y leches fermentadas en las gastroenteritis infantiles y, con menos frecuencia, en las que afectan a adultos. *Lb. rhamnosus* GG, ya sea como liofilizado o formando parte de una leche fermentada, acorta la diarrea aguda, fundamentalmente la causada por rotavirus (Isolauri *et al.*, 1991), efecto que se ha comprobado y repetido en varios estudios (Marteau *et al.*, 2001). Se ha encontrado un efecto preventivo beneficioso en la administración de *B. bifidum* y *S. thermophilus* en un ensayo doble-ciego y controlado por placebo en 55 niños hospitalizados (Saavedra *et al.*, 1994).

En cuanto a los mecanismos de acción mediante los cuales los microorganismos probióticos controlan la diarrea, debe destacarse que, aunque se asumió originalmente que esta capacidad era exclusiva de aquellos capaces de colonizar el intestino alterando el equilibrio microbiano (como *Lb. plantarum* o *Lb. rhamnosus*), otros microorganismos que no colonizan, como *S. boulardii*, han demostrado su efectividad. Su mecanismo de acción es desconocido, pero podría deberse a la interferencia con el sistema nervioso o inmune del intestino, favoreciendo la producción de compuestos inhibidores como bacteriocinas u otros metabolitos (ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico y acético, H_2O_2 , etc.), hormonas, neuropéptidos, citoquinas, etc., que influyen en la secreción de agua y electrolitos a través del epitelio intestinal. En el caso de la infección por *C. difficile*, podrían reducir la producción o la respuesta a la toxina (Anderson *et al.*, 2001). El hecho de que existan múltiples mecanismos de acción representa una importante ventaja frente a los agentes quimioterapéuticos, ya que dificulta el desarrollo de resistencias por parte de los agentes patógenos (Penna *et al.*, 2000).

Estudios en animales y, más recientemente, en humanos apoyan el efecto beneficioso de los probióticos en las **inflamaciones intestinales** en las que podría estar implicada una respuesta inmune anormal, determinada genéticamente, frente a la microflora normal que reduciría los niveles de lactobacilos y bifidobacterias (Cummings *et al.*, 2003). En concreto, la compleja mezcla probiótica VSL#3 (Yovis, Sigma Tau; que contiene $200 \times 10^{12}/g$ de bacterias viables pertenecientes a tres cepas de bifidobacterias, cuatro de lactobacilos y una de *S. thermophilus*) ha demostrado su eficacia en humanos con pouchitis (complicación frecuente tras intervenciones quirúrgicas en pacientes con colitis ulcerosa) (Mimura *et al.*, 2002). *E. coli* Nissle 1917 previene las recaídas de colitis ulcerosa (Kruis *et al.*, 1997).

Otros posibles efectos gastrointestinales beneficiosos que, sin embargo, requieren el apoyo de más estudios científicos controlados son: prevención de diarrea del viajero, síndrome del colon irritable, estreñimiento (Andersson *et al.*, 2001) y gastritis inducida por *Helicobacter pylori* (Hamilton-Miller, 2003). Por otra parte, los probióticos pueden influir en la flora endógena y en el sistema inmune, los cuales juegan un papel en la modulación de la carcinogénesis. En animales de experimentación se ha visto que algunos probióticos pueden disminuir las concentraciones fecales de enzimas, mutágenos y sales biliares secundarias que podrían estar implicados en el cáncer de colon (Wollowski *et al.*, 2001), aunque los estudios epidemiológicos realizados no son concluyentes (Rafter, 2002). Tampoco lo es el efecto de los probióticos en los niveles de colesterol sérico (Pereira y Gibson, 2002).

Otras actividades

Ciertos estudios epidemiológicos sugieren que la menor exposición a microorganismos y el subsiguiente menor número de infecciones durante la infancia podrían ser responsables del aumento de la prevalencia de las afecciones alérgicas en la sociedad occidental. De hecho, la primera y masiva exposición se asocia, sin duda, al establecimiento de la flora gastrointestinal y ésta determina el desarrollo del sistema inmune. En este sentido, los probióticos *B. lactis* Bb12 y *Lb. rhamnosus* GG se emplearon con éxito para disminuir el **eczema atópico** en lactantes (Isolauri *et al.*, 2000). *Lb. rhamnosus* GG administrado a las madres prenatalmente y durante la lactación, así como a los bebés durante 6 meses, disminuyó significativamente el riesgo de aparición de eczema atópico (Kalliomäki *et al.*, 2001). Un nuevo examen de estos niños mostró que el potencial preventivo de *L. rhamnosus* GG se extendía, al menos, hasta la edad de 4 años (Kalliomäki *et al.*, 2003), aunque se necesitan nuevos estudios para dilucidar el mecanismo de acción de estos microorganismos, que parece ser IgE-independiente (Nowak-Wegrzyn, 2003).

Debe destacarse que, en comparación con los numerosos estudios en pacientes, se han realizado muy pocos estudios controlados en personas sanas, con o sin síntomas gastrointestinales, por lo que la **mejora del estado general** producida por los probióticos no se ha comprobado hasta el momento (Marteau *et al.*, 2002). Una evidencia algo más directa sugiere que, al menos en niños, el consumo prolongado de probióticos podría disminuir el riesgo de infecciones (Hatakka *et al.*, 2001). Los probióticos se acompañan con frecuencia de la promesa de que promoverán el sistema inmune. Así, por ejemplo, se ha encontrado que *B. lactis* HN019 puede mejorar funciones inmunes inespecíficas (Chiang *et al.*, 2000). No obstante, esta función inmunomodulante puede tener escasa incidencia en individuos sanos cuyo sistema inmune trabaja ya en condiciones óptimas (Calder y Kew, 2002). Debe destacarse, sin embargo, que, en combi-

nación con vacunación oral, los probióticos aumentan los títulos de anticuerpos (Link-Amster *et al.*, 1994).

En el desarrollo de futuras cepas probióticas, ha de señalarse que se han hecho muy pocos estudios en probióticos no viables que podrían también ejercer efectos beneficiosos (Ouwehand *et al.*, 2002). También son interesantes sus aplicaciones alternativas en otras partes del cuerpo, como la cavidad oral. Se ha observado que el yogur reduce la colonización por *Streptococcus mutans*, responsable de caries dental (Petti *et al.*, 2001). Ciertos lactobacilos reducen la recurrencia de infecciones del tracto urinario, así como el riesgo de vaginitis (Reid *et al.*, 2001). Pero, en general, estos usos potenciales, así como en la piel, oídos o en la nasofaringe, se han estudiado todavía poco, a pesar de que el creciente aumento de las resistencias bacterianas a los antibióticos promueve la investigación y el empleo de terapias de reemplazo bacteriano (Tagg y Dierksen, 2003).

Una estrategia reciente se basa en utilizar a los microorganismos probióticos, naturales o genéticamente modificados, como un vehículo para “entregar” específicamente constituyentes biológicamente activos (enzimas, antígenos...) en los lugares donde deben actuar en el tracto gastrointestinal. Entre las ventajas potenciales se encuentra la protección frente a la digestión y los ácidos del estómago y la posibilidad de programar su liberación en el intestino (Marteau *et al.*, 2002). De modo similar, el desarrollo en ingeniería genética de microorganismos de grado alimentario hace posible fomentar o inducir la producción de ingredientes funcionales como vitaminas, oligosacáridos y polisacáridos, ácido linoleico conjugado (CLA), etc., lo que abre la puerta a la producción de nuevos alimentos fermentados con mejores propiedades (Hugenholtz y Smid, 2002).

En cualquier caso, la principal ambición de la investigación en probióticos sigue siendo la definición, a nivel molecular, de los mecanismos responsables de su actividad, que debe estar reforzada por el desarrollo de ensayos clínicos, de modelos experimentales *in vitro* y en animales, la caracterización y validación de marcadores de los efectos fisiológicos y de métodos para la resolución taxonómica de especies. Por otra parte, la incorporación del probiótico al alimento también modificará su eficacia dependiendo del tipo de alimento.

Administración de los microorganismos probióticos

Los alimentos lácteos empleados para diseminar microorganismos probióticos son, por lo general, productos fermentados como leche y queso, aunque también los incluyen leches infantiles o bebidas a base de suero. Además, pueden administrarse como

suplementos dietéticos en pastillas o cápsulas. En el caso de los alimentos fermentados, los productos lácteos, que constituyen el 65% de los alimentos funcionales del mercado europeo, han estado siempre a la vanguardia de los alimentos que contienen probióticos (Playne *et al.*, 2003). Desde 1990 han aparecido en Europa varias bebidas fermentadas como “Actimel” (*L. casei* inmunitas), “LC1” (*L. johnsonii*, La1), “Yakult” (*L. casei* Shirota), “Vifit” (*Lactobacillus* GG) y “Fyos” (*L. rhamnosus*). En productos lácteos es bastante común usarlos mezclados con otras bacterias para asegurar las características sensoriales óptimas y, en este caso, es de suma importancia una adecuada selección de las cepas y la tecnología de fermentación para lograr una adaptación óptima del probiótico al alimento y una viabilidad máxima (Saarela *et al.*, 2000).

En productos no lácteos, como alimentos infantiles o dulces, donde normalmente no se multiplican, su viabilidad depende de factores como el pH, la temperatura de almacenamiento y la presencia de microorganismos competidores e inhibidores. Así, el almacenamiento a temperatura ambiente compromete gravemente su viabilidad y estabilidad, lo que ha promovido la investigación de técnicas de encapsulación (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

A diferencia de los fármacos y aditivos químicos de uso alimentario, los criterios de calidad que deben cumplir los probióticos están poco definidos. Debe tenerse en cuenta que el procesado, el almacenamiento y el uso continuado de los microorganismos probióticos a lo largo de la cadena alimentaria pueden producir cambios en sus características y propiedades beneficiosas. Los criterios para evaluar tales cambios y determinar propiedades tan importantes como su grado de pureza, viabilidad o adherencia deberían incluirse en las regulaciones sobre alimentos funcionales (Tuomola *et al.*, 2001; Clancy, 2003). De especial importancia es la definición de un nivel eficaz de probióticos, pero no se sabe mucho sobre la mínima dosis o la frecuencia de consumo requerida para ejercer un efecto fisiológico. La mayor parte de los productos que contienen probióticos se estandarizan en función del contenido en células viables, lo que lleva implícita la presunción de que la eficacia está ligada a la viabilidad, aunque para asegurar esto debería conocerse con más profundidad el mecanismo de acción. En principio, se piensa que deberían alcanzar el intestino delgado alrededor de 10^8 - 10^9 bacterias vivas, para lo que se necesitaría un consumo diario de 10^9 - 10^{10} , aunque no se descarta que puedan crecer en el tracto gastrointestinal (Sanders y Veld, 1999). En cualquier caso, debe destacarse que en el caso de los alimentos no se proporcionan indicaciones de los contajes viables ni de la potencia, sino solamente del beneficio potencial para la salud. Un estudio sobre yogures europeos mostró que, en general, las especies encontradas eran las declaradas en la etiqueta, aunque ésta no declaraba los niveles de microorganismos. En el caso de suplementos secos, sólo 9 de 29 productos

estaban bien etiquetados (Hamilton-Miller *et al.*, 1999). Un estudio reciente sobre 14 leches fermentadas comercializadas en España mostró que todos los probióticos anunciados en la etiqueta estaban presentes en los productos, aunque en dos casos se encontró, además, un grupo adicional de microorganismos. Los recuentos de *Lactobacillus* spp. superaron siempre los 10^5 ufc/ml (el mínimo nivel terapéuticamente efectivo sugerido por algunos autores), mientras que la población de *Bifidobacterium* spp. estuvo por debajo de ese nivel en dos productos (Gueimonde *et al.*, 2004).

Entre los requisitos de seguridad que deben cumplir los probióticos, destacan la ausencia de actividades enzimáticas que produzcan desconjugación de sales biliares, degradación de la mucosa, agregación plaquetaria o formación de metabolitos indeseables. También es importante que no hayan protagonizado episodios de patogenicidad intestinal o endocarditis ni transporten genes transmisibles de resistencia a antibióticos. En la bibliografía sólo se recogen dos casos de infecciones causadas por bacterias probióticas (Saarela *et al.*, 2000), aunque se asume que, ocasionalmente, podrían dar lugar a infecciones en individuos inmunodeprimidos (Marteau, 2001; Borriello *et al.*, 2003).

De este modo, en el desarrollo y comercialización de productos probióticos hay todavía aspectos claves que abordar, como son: la identificación de biomarcadores que puedan emplearse para evaluar la eficacia de los probióticos en humanos (cepa, dosis, estado de crecimiento, etc.), la definición de su principio activo, de su estabilidad, y, por supuesto, la realización de estudios epidemiológicos y de intervención en humanos que confirmen científicamente su efectividad.

Prebióticos

El término prebiótico se refiere a “un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon” (Gibson y Roberfroid, 1995). Es decir, se trata de influir en la microflora intestinal a través de la dieta. Un ejemplo clásico lo constituye la leche humana, cuyo elevado contenido en oligosacáridos y la naturaleza dinámica de los mismos se considera responsable de la mayor proporción de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de los niños alimentados con leche materna respecto a los alimentados con fórmulas infantiles, lo que normalmente se correlaciona con un menor riesgo de sufrir infecciones gastrointestinales (Vandenplas, 2002).

La eficacia de los prebióticos está ligada a su capacidad de resistir la digestión en el intestino delgado y alcanzar el intestino grueso, donde serían utilizados selectivamente por un restringido grupo de microorganismos, fundamentalmente bifidobacterias y

lactobacilos. La tabla 2 muestra los carbohidratos que pueden cumplir estos requisitos y que son objeto de investigación. Entre ellos, la inulina y sus derivados, los fructo-oligosacáridos, han demostrado actividades prebióticas en un número aceptable de estudios y están disponibles comercialmente. Dentro de los prebióticos de origen lácteo destacan los galacto-oligosacáridos, la lactulosa, el lactitol y la lactosacarosa, todos derivados de la lactosa, con efectos bifidogénicos establecidos, aunque en un menor número de estudios que los anteriores (Playne *et al.*, 2003).

Tabla 2 Composición química y características de carbohidratos prebióticos y prebióticos potenciales

Componente	Composición	GP*
Inulina	β (2-1) fructano	2-65
Fructo-oligosacáridos	β (2-1) fructano	2-8
Galacto-oligosacáridos	oligogalactosa (85%)	
Oligosacáridos de soja	mezcla de rafinosa y estaquiosa	2-3
Xilo-oligosacáridos	xilosa con uniones β (1-4)	2-4
Isomalto-oligosacáridos	mezcla de oligómeros de glucosa con uniones α (1-6)	2-8
Oligosacáridos transgalactosilados	6' galactosil-lactosa	2-8
Lactulosa	galactosil β (1-4) fructosa	
* GP = grado de polimerización.		

La inulina y los fructo-oligosacáridos como la oligofructosa son β 2-1 fructanos lineales presentes en cantidades significativas en distintas frutas y vegetales. A pesar de su origen no lácteo, se usan con frecuencia en productos lácteos. La achicoria (*Cichorium intybus*) es la fuente más común de inulina, a partir de la cual la industria alimentaria obtiene, mediante hidrólisis enzimática, una variedad de productos, los fructo-oligosacáridos (FOS), con diferentes grados de polimerización (de 3 a 5, de media, para la oligofructosa a 25 para algunos tipos de inulina). La oligofructosa también puede obtenerse mediante transfructosilación enzimática empleando sacarosa como sustrato. Todos se clasifican como fibra alimentaria soluble y se usan, por sus propiedades tecnológicas y nutricionales, en una gran variedad de productos (Frank, 2002).

Debe destacarse que la estimulación de ciertos microorganismos por parte de diferentes carbohidratos *in vivo* parece no ser tan selectiva como indicaban los estudios *in vitro*. Así, por ejemplo, se ha visto que los almidones resistentes también pueden alcanzar el intestino grueso, estimular a las bifidobacterias *in vivo* y emplearse en la formulación de productos prebióticos y simbióticos (Priebe *et al.*, 2002; Topping *et al.*, 2003).

Actividades biológicas de los prebióticos

La inulina y la oligofruktosa resisten la acción de las enzimas del intestino delgado, específicas de enlaces α -glicosídicos, pero son fermentadas por las bacterias del colon produciendo lactato y ácidos carboxílicos de cadena corta, fundamentalmente acetato. Como consecuencia, varios estudios han mostrado **cambios en la composición de la flora fecal** de humanos que las consumían (Gibson *et al.*, 1995). Éstos se atribuyen a la disminución del pH que producen al estimular el crecimiento y la actividad bacteriana y la producción de ácidos grasos de cadena corta (Kolida *et al.*, 2002). El menor pH favorece el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias sobre el de otras bacterias no deseables (Blaut, 2002). La cuestión más importante pasaría a ser, entonces, el beneficio para la salud que aporta el aumento de la población de bifidobacterias (Andersson *et al.*, 2001). Por otro lado, el efecto bifidogénico depende de los niveles existentes de estos microorganismos. Así, la administración de galacto-oligosacáridos a adultos sanos con elevados niveles fecales de bifidobacterias no produjo cambio alguno (Playne *et al.*, 2003).

Como se muestra en la tabla 2, el hecho de que los distintos prebióticos potenciales varíen en cuanto a estructura molecular y longitud de cadena hace improbable que se fermenten a la misma velocidad o en la misma parte del colon. Esto abriría la posibilidad de producir efectos específicos que permitiesen modular el metabolismo del colon a diferentes niveles (Priebe *et al.*, 2002; Delzenne, 2003).

La inulina y la oligofruktosa poseen **efectos laxantes** dosis-dependientes. A diferencia de la fibra alimentaria insoluble, que aumenta la masa fecal al favorecer la retención de agua, en el caso de estos oligosacáridos este efecto se atribuiría, fundamentalmente, al aumento que producen en la biomasa microbiana como resultado de su fermentación en el colon (Andersson *et al.*, 2001; Roberfroid, 2002).

La lactulosa ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la **encefalopatía hepática** a través de la inducción al consumo de nitrógeno por parte de las bacterias y la reducción del pH, que disminuyen la formación de toxinas cerebrales (Dhiman *et al.*, 2000).

Por otra parte, los ácidos grasos de cadena corta pueden jugar un papel muy importante en el funcionamiento del epitelio del colon, favoreciendo el **transporte de cationes** como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} . El menor pH favorecería, además, la disolución del Ca^{2+} . De hecho, se ha confirmado en humanos el efecto promotor de la oligofructosa en la absorción del Ca^{2+} , aunque se necesitan estudios a largo plazo con dietas bien controladas para evaluar la persistencia de este efecto y, sobre todo, su impacto en la salud de los huesos (Schholz-Ahrens y Scherezenmeir, 2002).

Se ha postulado que un ambiente más ácido podría reducir la actividad de enzimas procarcinogénicas. Por otra parte, la estimulación del crecimiento bacteriano en el colon podría disminuir los niveles de metabolitos tóxicos, debido a los mayores requerimientos de nitrógeno y azufre por parte de la nueva biomasa, que, de otro modo, se metabolizarían en sustancias carcinogénicas. Así, se han encontrado efectos positivos de la inulina, FOS, lactulosa y galacto-oligosacáridos en biomarcadores del **cáncer de colon**, mientras que la inulina y la oligofructosa redujeron el número e incidencia de lesiones precancerosas y la incidencia de tumores en ratas tratadas con agentes carcinogénicos. Sin embargo, estos efectos todavía no se han confirmado en humanos (Priebe *et al.*, 2002). El mecanismo, todavía desconocido, de esta acción podría estar también relacionado con la producción de butirato o con la estimulación de la respuesta inmune (Tuohy *et al.*, 2003).

En animales, se ha demostrado que la administración de inulina **disminuye los lípidos séricos** debido a una inhibición de la síntesis de ácidos grasos. Esta ruta, sin embargo, es relativamente inactiva en humanos, cuyo metabolismo lipídico es mucho más complejo. De hecho, tras distintos estudios, no ha podido demostrarse un efecto convincente de la administración de inulina u oligofructosa en los niveles de colesterol o triglicéridos en sangre, por lo que es necesaria su confirmación (Tuohy *et al.*, 2003; Williams y Jackson, 2002).

La demostración de los efectos de los prebióticos requiere un intensivo análisis cualitativo y cuantitativo de la flora del colon y de su modulación mediante el tratamiento prebiótico. Para ello es necesario el desarrollo de nuevos métodos que permitan detectar leves cambios en la composición de dicha flora y correlacionarlos con los beneficios para la salud, que, como ya se ha explicado, no se limitan a la fisiología gastrointestinal (Roberfroid, 2001).

Administración de los prebióticos

El mercado de prebióticos se encuentra en rápida expansión, así como la demanda de nuevos compuestos distintos a los oligosacáridos que dominan el mercado actualmen-

te. La inulina y la oligofruktosa, legalmente clasificados como alimentos, se usan sin restricciones en múltiples productos como yogures o leches maternizadas, así como en productos no lácteos como bebidas, galletas, cereales y productos de bollería, etc., o formando parte de alimentos simbióticos. La inclusión de prebióticos en fórmulas maternizadas, de larga tradición en Japón, aunque mucho más reciente en Europa, ha permitido imitar los efectos de la leche humana en la flora de los lactantes. Debe señalarse, sin embargo, que algunos autores sugieren que no hay suficientes estudios sobre los efectos de los prebióticos en la salud de los lactantes, aunque, en principio, es altamente probable que sean seguros (Vandenplas, 2002; Ghisolfi, 2003).

Por lo general, han demostrado eficacia dosis de 4-20 g/día. Dosis superiores podrían causar flatulencia e hinchazón abdominal (Tuohy *et al.*, 2003). Debe tenerse en cuenta que una dieta normal en Europa o Estados Unidos ya aporta entre 1 y 10 g diarios (Playne *et al.*, 2003). Algunos autores destacan que muchas de las respuestas bifidogénicas obtenidas en estudios en animales se produjeron tras la administración de niveles excesivamente altos en la dieta (Playne *et al.*, 2003). Una cuestión importante, no resuelta todavía, es cuánto tiempo persiste el efecto bifidogénico cuando se interrumpe una dieta rica en prebióticos (Roberfroid, 2001).

Actualmente se está trabajando en una nueva generación de prebióticos para un desarrollo más racional que comprenda un mejor conocimiento de los factores que determinan su actividad, combinado con avances en métodos biotecnológicos para su obtención. Así se estudia la posibilidad de mejorar la funcionalidad de los prebióticos destinándolos a grupos de bacterias específicos o hacia probióticos de utilidad probada, o aumentando su persistencia en el colon (Rastall y Maitin, 2002).

Simbióticos

Para prolongar el efecto de los probióticos parece necesario potenciar su supervivencia, y así asegurar que mayores poblaciones alcancen el intestino grueso, y/o aumentar su tiempo de residencia en ese medio. Esto puede facilitarse mediante prebióticos, que cuando se combinan con probióticos se denominan simbióticos (Rastall y Maitin, 2002). Dado que la palabra alude a un sinergismo, debería reservarse a productos en los que el compuesto prebiótico favorece selectivamente al microorganismo probiótico, aunque podría argumentarse que el sinergismo también se conseguiría *in vivo* mediante la ingestión de un microorganismo y la promoción del crecimiento de otro (Schrezenmeir y De Vrese, 2001). En el mercado se encuentran, por ejemplo, yogures conteniendo inulina y bifidobacterias. Sin embargo, el desarrollo de estos productos es todavía escaso y apenas hay evidencias que prueben una mayor eficacia de los sim-

bióticos respecto a los pro y prebióticos. Un nuevo producto, prometedor, combina *Bifidobacterium lactis* (Lafti®B94) seleccionado para interactuar específicamente con Hi-Maize®, un almidón resistente alto en amilosa (Playne *et al.*, 2003).

II.3. Ingredientes funcionales de naturaleza proteica

Dentro de este grupo se incluyen distintas proteínas lácteas e hidrolizados de las mismas que pueden ejercer distintas actividades biológicas en el organismo, aparte de los beneficios propiamente derivados del valor nutritivo de estos compuestos. También se considerarán en este apartado otras proteínas de origen no lácteo que están siendo utilizadas como ingredientes funcionales en productos lácteos.

Proteínas lácteas

La leche y los productos lácteos son fuente de proteínas de alta calidad nutricional que proporcionan al organismo una amplia variedad de aminoácidos, de los cuales una gran proporción son aminoácidos esenciales. Además de por su elevado valor nutritivo, en los últimos años se ha prestado atención a distintos componentes lácteos para ser utilizados como ingredientes funcionales. Especialmente, el suero de quesería, un subproducto de la industria láctea, es un suplemento proteico muy popular en distintos alimentos funcionales con extensión a tratamientos alternativos de aplicación clínica. Las proteínas de suero lácteo contienen todos los aminoácidos esenciales y en concentraciones más elevadas que otras fuentes proteicas, como las proteínas de origen vegetal (soja, maíz o trigo), y son ricas en aminoácidos ramificados: leucina, isoleucina y valina. El aminoácido leucina está considerado un elemento clave en el proceso de síntesis proteica (Anthony *et al.*, 2001). Los avances de los procesos tecnológicos como la micro y ultrafiltración, ósmosis inversa y cromatografía han dado lugar a la aparición de distintos productos comerciales basados en la fracción de suero lácteo, como concentrados (con porcentajes de proteína que varían entre el 80-95%), suero bajo en lactosa, aislados de proteínas, suero desmineralizado, etc. La composición de estos productos varía, siendo éste un factor importante a la hora de seleccionarlos como ingredientes funcionales en distintas aplicaciones específicas.

La tabla 3 muestra las principales proteínas de suero lácteo, su proporción relativa respecto al contenido total de proteína y algunas de las actividades biológicas atribuidas a las mismas. Precisamente son las proteínas minoritarias, como las inmunoglobuli-

nas, lactoferrina y lactoperoxidasa, las que mayor atención han recibido en las investigaciones más recientes por su potencialidad para ser empleadas como ingredientes funcionales en alimentos o en preparaciones farmacéuticas.

Las **inmunoglobulinas** son anticuerpos o gamma-globulinas. Constituyen uno de los primeros sistemas de defensa descritos del organismo y han suscitado una gran cantidad de investigaciones. Existen cinco clases de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Las inmunoglobulinas IgG se transfieren de la madre al feto durante el embarazo y la lactancia y sirven como primera línea de defensa contra infecciones (la llamada inmunidad pasiva). Las inmunoglobulinas IgA se transfieren al lactante a través de la leche materna, dotándole de una mayor inmunidad que a los lactantes alimentados exclusivamente con fórmulas maternizadas (Bonang *et al.*, 2000). El calostro es particularmente rico en inmunoglobulinas, mientras que su concentración en leche decrece notablemente. Por ello, el calostro está siendo investigado profusamente para su utilización como ingrediente en alimentos dirigidos a mercados especialmente lucrativos, como el de nutrición para deportistas, que está sufriendo una gran expansión, sobre todo en Estados Unidos (Playne *et al.*, 2003). Las inmunoglobulinas bovinas pueden utilizarse por su actividad como anticuerpos no específicos, o bien producirse inmunoglobulinas frente a antígenos específicos empleando animales hiperinmunizados. Los anticuerpos no específicos de calostro bovino ofrecen protección frente a ciertos patógenos humanos como *Cryptosporidium parvum* (Okhuysen *et al.*, 1998), rotavirus (Scammell, 2001), bacterias cariogénicas (Wei *et al.*, 2002), *Helicobacter pylori*, etc. (Korhonen *et al.*, 2000). También se encuentran en el mercado distintos productos obtenidos de vacas hiperinmunizadas, que han demostrado eficacia en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales causados por protozoos, *Cryptosporidia*, *Helicobacter pylori*, rotavirus y distintas especies de *Shigella* (Kelly, 2004).

La **lactoferrina** es una glicoproteína quelante de hierro que ha recibido un gran interés científico desde la década de los sesenta debido a su elevada concentración en leche humana. Esta proteína tiene una probada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y levaduras, y ha demostrado poseer actividad antivírica (Floris *et al.*, 2003). A esta molécula se le han atribuido otras funciones biológicas, algunas de las cuales requieren la realización de más estudios para su confirmación, entre las que se incluyen: actividad inmunomodulante, antiinflamatoria y anticancerígena (Clare *et al.*, 2003). Además, existe cierta evidencia de la capacidad de la lactoferrina para mejorar la absorción del hierro en lactantes, disminuir intolerancias alimentarias e infecciones y favorecer el crecimiento de bifidobacterias a nivel intestinal. En un ensayo clínico utilizando una fórmula maternizada suplementada con lactoferrina, se observó un aumento en los niveles de bifidobacterias en las heces con respecto al grupo alimentado con una fórmula maternizada estándar, aunque

los niveles no alcanzaron los de los lactantes alimentados con leche materna (Roberts *et al.*, 1992). Las aplicaciones comerciales de la lactoferrina incluyen su uso como suplemento en alimentos como fórmulas maternizadas, algunos productos lácteos como yogur o chicles. Es prometedor su uso en alimentos para acuicultura, por su papel para prevenir infecciones bacterianas. En virtud de sus propiedades antibacterianas, también se está aplicando en productos de higiene personal (dentífricos y colutorios) y en cosméticos (Clare *et al.*, 2003).

La **lactoperoxidasa** es una enzima con actividad antibacteriana que se encuentra presente en calostro, leche y otros fluidos biológicos. Esta enzima cataliza la formación de oxitiocianato, que es un potente antimicrobiano. El sistema de lactoperoxidasa es activo contra una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo patógenos alimentarios, como *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, etc. Este sistema también es activo frente a bacterias de la cavidad oral (Ihalin *et al.*, 2003) y distintos tipos de virus (Tenouvu, 2002). Las aplicaciones comerciales de esta enzima se basan, por tanto, en su potente actividad antimicrobiana para la conservación de distintos alimentos (leches refrigeradas y no refrigeradas, fórmulas infantiles) y en productos de higiene bucal (dentífricos y colutorios).

El **caseinmacropéptido** (CMP) es el producto resultante de la acción del cuajo sobre el enlace 105-106 de la κ -caseína, que se encuentra en concentraciones de 1,2 a 1,5 g/L en el suero de quesería. El término CMP describe una heterogénea fracción de polipéptidos que exhiben modificaciones post-transduccionales, como glicosilación, fosforilación y variantes genéticas. Numerosos estudios han demostrado que se trata de péptidos multifuncionales con numerosas propiedades biológicas potenciales, como son unión a enterotoxinas del cólera y de *E. coli*, inhibición de la adhesión bacteriana y viral, supresión de la secreción gástrica, promoción del crecimiento de bifidobacterias, inmunomodulación, actividad antitrombótica e inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (Manso y López-Fandiño, 2004). Aquellas actividades que dependen de interacciones con componentes celulares están relacionadas con el número y contenido de residuos glicosídicos (Dziuba y Minkiewicz, 1996). Además, también se ha descrito la formación de péptidos bioactivos mediante hidrólisis del CMP con diferentes enzimas, a los que nos referiremos más adelante. Debe destacarse, sin embargo, que los datos existentes sobre sus propiedades beneficiosas se han obtenido en estudios *in vitro* y en animales de experimentación, por lo que sería necesaria su confirmación en humanos.

La leche contiene, además, otros componentes bioactivos minoritarios como distintas hormonas y factores de crecimiento. Los **factores de crecimiento** presentes en la leche podrían ser utilizados en distintas áreas de la biomedicina y la alimentación, aunque, de momento, habría que demostrar su eficacia en humanos. Se plantea su utiliza-

ción en el tratamiento tópico de úlceras (Regester y Belford, 1999), en cultivos celulares para la producción de hormonas y vacunas (Smithers *et al.*, 1996) y en la profilaxis y tratamiento de algunas patologías gastrointestinales (Regester y Belford, 1999). A pesar de que su producción a gran escala es bastante limitada, ya se comercializan distintos productos derivados de calostro bovino que contienen estos factores de crecimiento. En Estados Unidos, algunos productos utilizados en nutrición para deportistas basados en proteínas de suero también incluyen factores de crecimiento entre sus componentes (Playne *et al.*, 2003).

Tabla 3 Proteínas de suero lácteo y funcionalidad de las mismas (tomada de Marshall, 2004)

Proteína	Porcentaje relativo	Beneficios
β-Lactoglobulina	50-55	Fuente de aminoácidos esenciales y aminoácidos ramificados
α-Lactoalbúmina	20-25	Principal proteína en leche humana. Fuente de aminoácidos esenciales y aminoácidos ramificados
Inmunoglobulinas	10-15	Principales proteínas en calostro. Beneficios en el sistema inmune
Lactoferrina	1-2	Antioxidante. Antibacteriana, antiviral y antifúngica. Favorece el crecimiento de bacterias beneficiosas
Lactoperoxidasa	0,50	Antibacteriana
Seroalbúmina	5-10	Fuente de aminoácidos esenciales
Caseinmacropéptido	10-15	Fuente de aminoácidos ramificados. Ausencia de aminoácidos aromáticos. Ingrediente en dietas para fenilcetonúricos

Las actividades beneficiosas relacionadas con el consumo de concentrados proteicos o **proteínas derivadas de suero lácteo** sobre las que existen datos obtenidos en ensayos clínicos incluyen: actividad anticancerígena, actividad antivírica (hepatitis, HIV), efectos en la composición corporal y beneficios en el tracto gastrointestinal de lactantes.

Actividad anticancerígena

Se han llevado a cabo estudios con cultivos celulares y animales de experimentación que sugieren que la fracción sérica de la leche posee **propiedades anticancerígenas**. Esta

actividad estaría relacionada con los aminoácidos azufrados presentes en la secuencia de las proteínas séricas, que participan en la síntesis del glutatión, que es un potente antioxidante intracelular y agente xenobiótico (Parodi, 1998; Bounous, 2000). Otros autores han postulado que la capacidad de las proteínas séricas para secuestrar hierro del medio puede contribuir a esta actividad, dado que el hierro puede actuar como agente mutagénico al provocar un daño oxidativo en los tejidos (Weinberg, 1996).

Se han llevado a cabo estudios en animales de experimentación en los que se ha demostrado que, en animales a los que se había inducido un cáncer de colon, la administración de proteínas séricas dio lugar a una disminución significativa del número de tumores (Sekine *et al.*, 1997; Tsuda *et al.*, 1998; Hakkak *et al.*, 2000; Kuhara *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta la fecha, el número de ensayos clínicos relacionados con esta patología es limitado (tabla 2). En 1995 se llevó a cabo un ensayo clínico con siete pacientes con distintos tipos de cáncer, a los que se les administró diariamente 30 g de un concentrado de proteínas de suero (Immunocal®) durante 6 meses. Dos pacientes mostraron regresión de los tumores y otros dos estabilización del proceso cancerígeno (Kennedy *et al.*, 1995). Otro ensayo clínico más reciente, con 20 pacientes afectados de distintos procesos cancerígenos en estado avanzado, demostró que la administración intravenosa de una combinación de concentrado de proteínas de suero (Transfer Factor Plus®), ácido ascórbico, un complejo vitamínico y distintos extractos vegetales dio como resultado un aumento significativo en la actividad de las células *natural killer* (NK) y valores superiores de hemoglobina y hematocrito. Además, los pacientes notaron una mejora significativa de su calidad de vida durante la duración del estudio (See *et al.*, 2002). A pesar de los prometedores resultados de estos ensayos, se necesitaría la realización de ensayos clínicos con mayor número de voluntarios y la comparación con distintos tratamientos alternativos.

Tratamiento de la hepatitis y virus de inmunodeficiencia humana (HIV)

Las proteínas de suero lácteo han demostrado distintos efectos en pacientes infectados con el **virus de la hepatitis B o C**. Inicialmente se observó que la lactoferrina bovina previene la infección con el virus de la hepatitis C en un cultivo de células hepáticas humanas (Ikeda *et al.*, 1998). Estas observaciones llevaron a la realización de distintos ensayos clínicos que se resumen en la tabla 2. Los resultados de los ensayos clínicos efectuados con voluntarios infectados por el virus de la hepatitis B fueron muy prometedores, ya que 6 de cada 8 pacientes evolucionaron favorablemente en distintos parámetros bioquímicos y del sistema inmune (Watanabe *et al.*, 2000). Sin embargo, la utilización de lactoferrina bovina en el tratamiento de la hepatitis C proporcionó resultados moderados y no concluyentes (Tanaka *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2002).

La deficiencia de glutatión es un problema común en personas infectadas por el **HIV**. Por ello, se ha evaluado el efecto de la administración de distintos preparados de proteínas de suero a individuos infectados con el fin de aumentar los niveles de cisteína y, finalmente, de glutatión. En dos ensayos clínicos con una duración de 2 semanas y de 6 meses, respectivamente, se observó un aumento significativo de los niveles de glutatión con uno de los preparados ensayados (Protectamin®) (tabla 4) (Micke *et al.*, 2001 y 2002). También se han llevado a cabo otros ensayos clínicos que evaluaban la combinación de ejercicio físico y la administración de un preparado de proteínas de suero que proporcionaron resultados contradictorios en la medida de la composición corporal (Agin *et al.*, 2000 y 2001). En cualquier caso, los beneficios observados en los niveles de glutatión merecen la realización de otros ensayos clínicos en esta línea.

Efecto en la composición corporal: masa muscular, obesidad y osteoporosis

A pesar de la popularidad de los suplementos dietéticos basados en proteínas de suero, los ensayos clínicos que avalan el efecto beneficioso de estas proteínas en el **tamaño y la fortaleza muscular** son limitados (tabla 4). En principio, se postuló que la calidad de una determinada proteína para favorecer la hipertrofia y fortaleza muscular estaba relacionada con el contenido en leucina de la misma (Ha *et al.*, 2003). Las proteínas de suero contienen hasta un 26% de aminoácidos ramificados que actúan como eficaces sustratos en la síntesis de nuevas proteínas. En general, los resultados de los ensayos clínicos sugieren que los suplementos proteicos basados en proteínas de suero, junto con ejercicio físico, proporcionan una mejora significativa en la masa y/o en la fortaleza muscular, aunque en alguno de estos estudios no se encontraron diferencias significativas entre los efectos ejercidos por las proteínas séricas y los obtenidos con otras fuentes proteicas (Burke *et al.*, 2001; Lands *et al.*, 1999). Por otra parte, las proteínas séricas pueden aportar otros beneficios a deportistas sometidos a ejercicios intensos en los que se han observado fenómenos de inmunosupresión causados por la elevada producción de radicales libres y a una mayor actividad inflamatoria. Las proteínas de suero previenen del daño oxidativo de los radicales libres mediante el incremento de los niveles de glutatión y, además, son una fuente de lactoferrina, que también posee actividad antioxidante (Marshall, 2004).

La **obesidad** está alcanzando proporciones de epidemia en algunos países desarrollados y es un factor de riesgo importante a la hora de padecer ciertas patologías. Los preparados de proteínas de suero constituyen una fuente proteica muy atractiva en las dietas de adelgazamiento basadas en un alto consumo proteico. Además, se cree que el calcio puede influir en el metabolismo energético, ya que el calcio intracelular está

implicado en la regulación del metabolismo lipídico y en el almacenamiento de triglicéridos en el adipocito (Zemel, 2003). Se ha demostrado que este efecto es mayor para el calcio proveniente de los productos lácteos que para el calcio de otras fuentes, y, aunque las causas no han sido dilucidadas, podría deberse a que la fracción sérica de la leche actúa sinérgicamente con el calcio (Zemel, 2003). Sin embargo, aunque se cree que el consumo de suero y productos lácteos puede jugar un papel en la prevención y/o atenuación de la obesidad, no existen suficientes datos que avalen que el calcio proveniente de la leche o del suero tenga influencia en individuos obesos.

La leche y los productos lácteos están reconocidos como un alimento que ayuda a prevenir la aparición de **osteoporosis** debido a la elevada concentración de calcio y a la biodisponibilidad del mismo, así como a determinados péptidos derivados de la fracción caseínica de la leche que favorecen la absorción de minerales a nivel intestinal. También se ha investigado la posibilidad de que otros componentes del suero lácteo puedan influir en el metabolismo óseo. Además de distintos estudios con cultivos celulares y con animales de experimentación, un grupo japonés ha llevado a cabo tres ensayos clínicos para evaluar el efecto de una fracción de carácter básico obtenida a partir de suero lácteo sobre la formación del hueso y la prevención de osteoporosis. Los tres ensayos encontraron un aumento significativo de marcadores bioquímicos relacionados con la formación del hueso y un aumento de la densidad ósea administrando dosis de 40 mg/día del fraccionado sérico (Toba *et al.*, 2001; Aoe *et al.*, 2001; Yamamura *et al.*, 2002). Sin embargo, no se detalla la composición del fraccionado sérico utilizado ni se ha postulado un posible mecanismo de acción, por lo que la realización de más estudios sería imprescindible a la hora de considerar esta alegación funcional.

Efecto sobre el tracto gastrointestinal del lactante

Ya se ha mencionado que los **lactantes** alimentados con leche materna tienen una **flora intestinal** mucho más rica en bifidobacterias y lactobacilos que los lactantes alimentados con fórmulas maternizadas (Walzem *et al.*, 2002). La presencia de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal se ha asociado con la resistencia a la colonización por especies patógenas y con un aumento de la inmunidad gastrointestinal (Van Hooijdonk *et al.*, 2000). Se ha evaluado mediante ensayos clínicos el beneficio de la utilización de proteínas séricas en la formulación de leches maternizadas frente a leches maternizadas estándar (conteniendo proteínas de suero y caseínas). En un estudio doble-ciego con 102 bebés sanos se observó que, tras 12 semanas, el grupo que había recibido la fórmula maternizada basada en proteínas de suero parcialmente hidrolizadas presentaba niveles más altos de bifidobacterias en las heces que el grupo alimentado con la fórmula estándar (Schmelzle *et al.*, 2003). Además, las fórmulas basadas en proteínas de suero también mostraron su superioridad frente a las fórmulas

maternizadas estándar en la reducción de los cólicos del lactante, como se demostró en un ensayo con 43 bebés (Lucassen *et al.*, 2000).

Otros efectos

A las proteínas de suero también se les atribuye un efecto protector sobre la mucosa intestinal que ha sido demostrado en distintos estudios con animales de experimentación (Rosaneli *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2001). Además, la presencia en el suero lácteo de aminoácidos esenciales, minerales, grasas y proteínas funcionales lo hace útil en nutrición clínica (MacKay y Miller, 2003). También se ha propuesto la utilización de proteínas de suero lácteo e hidrolizados de las mismas como fuente proteica en niños con *short bowel syndrome* (Ksiazzyk *et al.*, 2002). Asimismo, se ha sugerido que el triptófano, aminoácido muy abundante en la secuencia de la α -lactoalbúmina sérica, podría actuar como sustrato en la síntesis de serotonina, lo que conferiría un efecto calmante y antiestrés a esta proteína sérica (Markus *et al.*, 2000; Markus *et al.*, 2002).

Tabla 4 Resumen de los ensayos clínicos realizados utilizando proteínas de suero lácteo (Marshall, 2004)

Alegación funcional	Dosis	Duración	Resultados
Actividad anticancerígena	30 g/día	6 meses	2 de cada 5 pacientes presentaron regresión del tumor. Sugieren un aumento en los niveles de glutatión en células sanas y disminución en células tumorales
	40 g/día en combinación con otros compuestos	6 meses	16/20 supervivientes Aumenta la actividad de las células natural killer Aumento de los niveles de glutatión Aumento de hemoglobina y hematocrito Mejora de la calidad de vida
Antivírica hepatitis C	1,8 ó 3,6 g/día de lactoferrina bovina	8 semanas	En pacientes con bajas cargas víricas iniciales disminuye significativamente la carga vírica y la alanina transaminasa sérica. En pacientes con cargas víricas elevadas no se encontraron diferencias significativas
	1,8; 3,6 y 7,2 g/día de lactoferrina bovina	8 semanas	4/45 pacientes negativizaron la carga vírica 8/45 pacientes tuvieron una disminución del 50% o superior de la carga vírica No se observó una respuesta dosis-dependiente

Tabla 4 Resumen de los ensayos clínicos realizados utilizando proteínas de suero lácteo (Marshall, 2004) (continuación)

Alegación funcional	Dosis	Duración	Resultados
Antivírica hepatitis B	12 g/día	12 semanas	Disminución de los niveles de peroxidasa lipídica sérica. Aumenta la actividad de IL-2 y células natural killer. Disminución de la actividad de alanina transferasa sérica. Aumento de los niveles séricos de glutatión
Antivírica HIV	45 g/día	2 semanas 6 meses	Aumento de los niveles de glutatión en ambos ensayos
Mejora de la masa y fortaleza muscular	1,2 g/Kg/día	12 semanas	Mejora de la masa muscular Mejora en una de las 4 medidas de fortaleza muscular
	10 g, 2 veces/ día	3 meses	Aumento significativo del pico de potencia Aumento significativo de la capacidad muscular Aumento de los niveles de glutatión de los linfocitos
Prevención de osteoporosis	300 mg/día fracción sérica básica	16 días	Niveles de Ca sérico y en orina permanecen inalterados Aumento de osteocalcina y pro-péptido procolágeno 1 carboxi-terminal indicando formación de hueso
	40 mg/día fracción sérica básica	6 meses	Aumento de la densidad ósea Inhibición de la pérdida gradual de hueso
	40 mg/día fracción sérica básica	6 meses	Aumento de la densidad ósea radial
Beneficios en lactantes	Fórmula infantil estándar frente a fórmula infantil de hidrolizado de proteínas de suero (distintas dosis)	12 semanas	Aumento en la proporción de bifidobacterias Aumento de la inmunidad gastrointestinal Disminución del riesgo de padecer enfermedades atópicas
		1 semana	Disminución de la incidencia de cólicos del lactante

Proteínas de otros orígenes como ingredientes funcionales en productos lácteos

Entre las distintas proteínas alimentarias de origen no lácteo, las que en mayor medida han demostrado su actividad biológica en distintos ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo ensayos clínicos en humanos, son las **proteínas de soja**. En concreto, las proteínas de soja han demostrado un efecto beneficioso en la reducción del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares. La fracción proteica de la soja ejerce en el organismo distintos **efectos antiaterogénicos**, puesto que disminuyen significativamente las concentraciones plasmáticas de colesterol-LDL, a la vez que tienden a aumentar los niveles de colesterol-HDL. Además, las **isoflavonas** de la soja, que normalmente acompañan a la fracción proteica, poseen propiedades antioxidantes, protegiendo a las lipoproteínas de baja densidad frente a la oxidación y ejerciendo, en general, un efecto favorable en la función cardiovascular. Estos efectos se han demostrado suficientemente en ensayos *in vitro* y en numerosos ensayos clínicos. Un meta-análisis realizado en 1995 (Anderson *et al.*, 1995) recogió los resultados de 38 ensayos clínicos llevados a cabo en 730 voluntarios, a los que se administraron distintos productos como fuente de proteínas de soja a dosis comprendidas entre 17 y 124 g/día. Los resultados obtenidos en estos estudios fueron coincidentes, ya que 34 de los 38 estudios demostraron una disminución significativa de la concentración sérica de colesterol total. Además, la ingestión de proteínas de soja se asoció con una disminución del colesterol-LDL, una reducción de los niveles séricos de triglicéridos y un aumento, aunque no significativo en todos los casos, de los niveles de colesterol-HDL. La intensidad de los efectos observados dependía de los niveles iniciales de lípidos séricos, de forma que los individuos con hipercolesterolemia severa mostraron mayor respuesta a la ingestión de proteína de soja. Además, no se encontraron diferencias significativas en el efecto observado en función del tipo de proteína de soja utilizado (aislado de proteína de soja frente a proteína de soja texturizada). Estos estudios dieron lugar a que, en 1999, la Food and Drug Administration (FDA) autorizara la utilización de la fracción proteica de la soja con la alegación funcional de disminución del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares (Food and Drug Administration, 1999), recomendándose una ingesta de 25 g/día.

En principio, estos efectos beneficiosos no se atribuyeron exclusivamente a la fracción proteica de la soja, puesto que también podrían participar otros compuestos que generalmente se encuentran acompañando a las proteínas, como fibra (Hunninghake *et al.*, 1994), isoflavonas (Clarkson, 2002) y saponinas (Oakenfull y Sidhu, 1990), entre otros. Hoy se acepta que los componentes de naturaleza proteica son los principales responsables de la actividad hipocolesterolémica (Demonty *et al.*, 2003), actuando

mediante la activación de los receptores LDL hepáticos. En concreto, esta actividad se ha atribuido a la subunidad α' de la globulina 7S, como se ha podido demostrar en estudios *in vitro* con cultivos celulares (Manzoni *et al.*, 2003) y en animales de experimentación (Duranti *et al.*, 2004).

Actualmente se comercializan diferentes productos lácteos suplementados con proteínas de soja. A este respecto, se ha publicado recientemente un ensayo clínico utilizando un yogur suplementado con proteína de soja que contenía una concentración estandarizada de isoflavonas. Los autores observaron una disminución significativa de los niveles de colesterol total, colesterol-LDL y de la relación colesterol total/colesterol-HDL en el grupo al que se le administró el yogur suplementado con proteína de soja, en concordancia con los resultados obtenidos previamente con productos basados exclusivamente en proteínas de soja (Puska *et al.*, 2004).

Además del efecto sobre los lípidos séricos, se han propuesto **otras actividades biológicas** para la fracción proteica de la soja, como la protección contra ciertos tipos de cáncer y la reducción de los síntomas de la menopausia. Muchos de estos efectos se han atribuido a la fracción de isoflavonas que generalmente acompaña a la fracción proteica (genisteína, daidzeína, gliciteína). Sin embargo, hasta la fecha no existe aprobación, por parte de la FDA u otro organismo competente, de estas alegaciones funcionales, ya que, en general, los datos que las apoyan no son concluyentes (Kurzer, 2003).

La alegación funcional más sólida para la fracción de isoflavonas de la soja es la reducción en la intensidad o la frecuencia de los sofocos que acompañan a la menopausia, aunque la disminución observada en la mayor parte de los estudios fue moderada (Messina y Hughes, 2003; Sun, 2003; Fugate y Church, 2004), e incluso en algunos ensayos clínicos no se encontraron cambios significativos (Penotti *et al.*, 2003). Los estudios sobre la influencia de la soja en el metabolismo óseo sugieren un cierto beneficio contra el avance de la osteoporosis. A este respecto, se han llevado a cabo ensayos con cultivos celulares, con animales de experimentación y estudios epidemiológicos y de intervención en humanos que sugieren que, en general, las dietas ricas en fitoestrógenos ejercen un efecto protector contra la osteoporosis, aunque la magnitud del mismo y los mecanismos implicados están todavía por determinar (Setchell *et al.*, 2003). Sin embargo, otros estudios clínicos recientes no han demostrado una influencia significativa de la ingestión de proteína de soja con isoflavonas en el metabolismo óseo en mujeres durante la menopausia (Gallagher *et al.*, 2004). La propiedad más discutida relacionada con la ingestión de soja es la prevención de ciertos tipos de cáncer. Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto el efecto protector que el consumo de soja puede desempeñar en el cáncer de próstata y de mama. Con el fin de

confirmar esta hipótesis se han realizado investigaciones con cultivos celulares (Bemis *et al.*, 2004), animales de experimentación (Ueda *et al.*, 2003) y ensayos clínicos en humanos (Hussain *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2004), con resultados contradictorios. Incluso algunos estudios sugieren que los fitoestrógenos de la soja podrían estimular el crecimiento de células cancerígenas en el tejido mamario bajo ciertas circunstancias (Messina y Loprinzi, 2001), por lo que sería necesario establecer la seguridad de la utilización de los suplementos de fitoestrógenos antes de hacer una recomendación generalizada de su consumo.

Péptidos e hidrolizados proteicos

Dentro de la secuencia de las proteínas alimentarias se encuentran determinadas regiones que, una vez liberadas mediante hidrólisis, pueden exhibir actividades biológicas. Las secuencias de las proteínas lácteas son particularmente ricas en estos péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos pueden generarse *in vivo*, durante la hidrólisis de las proteínas por acción de las enzimas gastrointestinales, o *in vitro*, mediante la acción de enzimas específicas o durante los procesos de elaboración de determinados alimentos, como, por ejemplo, durante la fermentación de la leche. Debido al interés que han suscitado estos péptidos, en los últimos años se han descrito numerosas secuencias derivadas de las proteínas lácteas con distinta funcionalidad. En la mayor parte de los casos la actividad ha sido demostrada en ensayos *in vitro* y, en menor medida, en ensayos *in vivo* en animales de experimentación, pero los datos de actividad biológica de estos péptidos en humanos son todavía escasos. Además de la verificación de la actividad en humanos, el reto en la comercialización de los péptidos bioactivos se encuentra en la producción de los mismos a escala industrial, en muchos casos debido a la falta de tecnología apropiada (Korhonen y Pihlanto, 2003). A continuación se detallarán los principales efectos biológicos que se han descrito para los péptidos derivados de proteínas lácteas, resaltando aquellos casos en los que existe una verificación de la actividad biológica en humanos.

Efecto sobre el sistema cardiovascular

Los péptidos derivados de las proteínas lácteas que han demostrado efectos sobre el sistema cardiovascular son principalmente péptidos que ejercen actividad antihipertensiva y péptidos con actividad antitrombótica. Los péptidos con **actividad antihipertensiva** constituyen uno de los grupos de péptidos bioactivos más intensamente estudiado en los últimos años, dada la importancia de la hipertensión en el desarrollo de distintas enfermedades cardiovasculares. La mayor parte de los péptidos con actividad antihipertensiva derivados de proteínas alimentarias descritos hasta el mo-

mento actúan inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que está implicada en el sistema renina-angiotensina. Este sistema es uno de los de mayor importancia en el control de la presión arterial y en el balance de electrolitos y participa en las funciones renal, neuronal y endocrina. Se han descrito numerosas secuencias derivadas de las proteínas lácteas, tanto de la fracción sérica como de la fracción caseínica, con actividad inhibitora de la ECA *in vitro* y, por tanto, con potencial actividad antihipertensiva *in vivo*. Estos péptidos se han identificado en hidrolizados de proteínas lácteas con proteinasas de distintos orígenes (enzimas gastrointestinales, proteinasas bacterianas y enzimas derivadas de plantas). Además, también se han identificado péptidos con esta actividad en productos lácteos fermentados tipo yogur o en quesos elaborados con distintos cultivos iniciadores. Las secuencias de estos péptidos han sido recogidas recientemente en distintas revisiones sobre el tema (FitzGerald *et al.*, 2004; Gobbetti *et al.*, 2004; Silva y Malcata, 2004). Para la mayor parte de estos péptidos descritos sólo se ha demostrado la actividad inhibitora de la ECA *in vitro*. Algunos de estos péptidos también han demostrado actividad hipotensora en ratas espontáneamente hipertensas, que constituyen un buen modelo animal para la evaluación de compuestos con actividad antihipertensiva. Sin embargo, los estudios llevados a cabo en humanos son mucho más limitados. Los resultados de estos ensayos clínicos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5 Efecto hipotensor en humanos de leches fermentadas y péptidos derivados de proteínas lácteas (tomado de FitzGerald *et al.*, 2004)

Producto	Secuencia peptídica ^a	Dosis	Duración (semanas)	Presión diastólica ^b (mm Hg)	Presión sistólica ^c (mm Hg)	Referencia
Hidrolizado tríptico de caseína		20 g/día	4	-4,6	-6,6	Sekiya <i>et al.</i> (1992)
Calpis	VPP/IPP	95 ml/día	8	-6,9	-14,1	Hata <i>et al.</i> (1996)
Leche fermentada	VPP/IPP	150 ml/día	8	-8,8	-14,9	Seppo <i>et al.</i> (2002)
Leche fermentada	VPP/IPP	150 ml/día	21	-3,6	-6,7	Seppo <i>et al.</i> (2003)
C12 peptide	FFVAPFEVFGK	> 0,2 g/Kg	4	-6,5	-4,5	Nimmagudda (2002)
Biozate	péptidos de proteínas séricas	20 g/día	6	-7,0	-11,0	Pins <i>et al.</i> (2002)

^a Aminoácidos indicados con el código de una letra.
^b Disminución de la presión diastólica.
^c Disminución de la presión sistólica.

En uno de los primeros ensayos clínicos se evaluó la actividad de una leche fermentada consumida habitualmente en Japón (Calpis®, Calpis Co., Japón) mediante un ensayo doble-ciego con placebo (Hata *et al.*, 1996). La actividad hipotensora de este producto se atribuyó a los péptidos Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro (Nakamura *et al.*, 1995). Estos mismos péptidos están presentes en una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* LBK-16H que se comercializa en Finlandia bajo el nombre de Evolus® (tabla 6).

Tabla 6 Productos comerciales con ingredientes antihipertensivos derivados de proteínas lácteas (tomado de FitzGerald *et al.*, 2004)

Tipo de producto	Nombre comercial	Compuesto activo	Fabricante
Leche ácida	Calpis	IPP, VPP	Calpis Co., Japón
Leche fermentada	Evolus	IPP, VPP	Valio, Finlandia
Hidrolizado de caseínas	Casein DP	FFVAPFPEVFGK	Kanebo Ltd., Japón
Hidrolizado de caseínas	C12 peptide	FFVAPFPEVFGK	DMV International, Holanda
Hidrolizado de proteínas de suero	BioZate	Péptidos de proteínas de suero	Davisco, USA

También se había observado actividad hipotensora en humanos tras la ingestión de un hidrolizado trípico de caseína (Sekiya *et al.*, 1992). Más recientemente se identificó en este hidrolizado un péptido de 12 residuos con potente actividad inhibitora de la ECA (Nimmagudda, 2002). Este hidrolizado se comercializa en Japón y en Holanda. Si bien todos los casos anteriores corresponden a péptidos derivados de la fracción caseínica, se ha demostrado la actividad hipotensora en humanos de un hidrolizado de proteínas de suero (Pins *et al.*, 2002). Además, en este estudio se observó un aumento del recuento de leucocitos y una disminución de los niveles de LDL séricos en el grupo que había recibido el hidrolizado.

Un resultado importante de los ensayos *in vivo*, tanto en animales como en humanos, es que los hidrolizados o los productos lácteos fermentados no afectaron a la presión arterial de animales o individuos normotensos. Además, no se detectaron efectos secundarios tras la administración oral de estos productos. Sin embargo, sería necesaria la realización de otros estudios que profundizaran en el mecanismo de acción de estos péptidos. Se ha propuesto que la acción de los mismos puede no deberse exclusiva-

mente a su actividad inhibidora de la ECA, sino que otros mecanismos, como la interacción con receptores opiáceos o un efecto vasodilatador directo y la presencia de calcio, podrían contribuir a la acción hipotensora observada.

Determinados fragmentos derivados de las proteínas lácteas han demostrado ejercer una **acción antitrombótica**. Estos péptidos actúan mediante diferentes mecanismos; por ejemplo, algunos péptidos derivados de la κ -caseína presentan cierta homología con una región de la cadena γ del fibrinógeno humano y compiten con éste por los receptores plaquetarios, inhibiendo así la agregación de las plaquetas. La actividad antitrombótica del caseinmacropéptido y otros fragmentos derivados de la κ -caseína y de la molécula de lactoferrina de distintas especies se ha demostrado *in vitro* mediante la utilización de plasma humano o animal enriquecido en plaquetas (Fosset y Tomé, 2000). Estudios en recién nacidos alimentados tanto con leche materna como con fórmulas maternizadas han revelado la presencia de péptidos con actividad antitrombótica en plasma, en concentración suficiente como para ejercer actividad (Chabance *et al.*, 1995). En adultos se ha detectado caseinmacropéptido tras la ingesta de leche o yogur en estómago, duodeno y plasma, lo que pone de manifiesto que péptidos de tamaño grande pueden atravesar la barrera intestinal en adultos (Chabance *et al.*, 1998). En ratas también se ha detectado caseinmacropéptido tras su administración oral, pero el mecanismo para atravesar la barrera intestinal y sus implicaciones biológicas todavía deben ser esclarecidos (Fosset y Tomé, 2000).

Efecto sobre el sistema nervioso

Los péptidos con **actividad opiácea** fueron los primeros péptidos bioactivos descritos a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias (Brantl *et al.*, 1979). La mayor parte de las secuencias conocidas derivadas de las proteínas lácteas proceden de la molécula de β -caseína humana (denominadas β -casomorfina), aunque también se han identificado péptidos opiáceos derivados de la α_{s1} -caseína, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Estos péptidos actúan por interacción con los receptores opiáceos presentes en el sistema nervioso, en células del sistema inmune y en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación han permitido demostrar que cuando se administran por vía intravenosa producen un efecto sedante y analgésico (Teschemacher, 1987; Paroli, 1988), y una dosis de 0,06 a 2 μ administrada a ratas mediante inyección intracerebral es suficiente para producir un efecto analgésico (Brantl *et al.*, 1981). Se han identificado β -casomorfina en sangre de terneros y cachorros de perro tras la primera ingestión de leche, poniéndose de manifiesto la capacidad de estos péptidos para atravesar la barrera gastrointestinal (Umbach *et al.*, 1985; Singh *et al.*, 1989). En humanos adultos se ha podido detectar la presencia de casomorfina en el intestino delgado (Svedberg *et al.*,

1985), estómago y duodeno (Chabance *et al.*, 1998), pero no se han podido detectar en sangre tras la ingestión de productos lácteos (Teschmacher *et al.*, 1986). Por lo tanto, se acepta que, en individuos adultos, la posible acción de los péptidos opiáceos quedaría limitada a la modulación de la función gastrointestinal, afectando al tránsito intestinal y a la absorción de agua y aminoácidos (Meisel, 1997). Sin embargo, en mujeres embarazadas o en periodo de lactación, el tejido mamario es permeable a las β -casomorfina y, por tanto, éstas podrían tener ciertas implicaciones biológicas (Clare y Swaisgood, 2000). Además de la realización de más estudios para conocer la importancia fisiológica de estos péptidos en lactantes y en individuos adultos, estudios recientes se plantean la seguridad de su utilización. Así, recientemente, Sun *et al.* (2003) han revisado los estudios que relacionan las β -casomorfina con la aparición de apnea y el síndrome de muerte súbita en lactantes.

Efecto sobre el sistema inmune

Los sistemas implicados en la defensa del organismo frente a agentes patógenos son bastante complejos, y actualmente se acepta que la dieta puede influir en estos sistemas. Las investigaciones sobre péptidos activos en este campo son recientes, pero arrojan resultados prometedores. Las dos funciones biológicas descritas para péptidos derivados de proteínas lácteas relacionadas con el sistema inmune son la actividad inmunomodulante y la actividad antimicrobiana.

Se sabía que la leche materna transfiere al neonato inmunidad activa gracias a las inmunoglobulinas, e inmunidad pasiva debido, principalmente, a factores antimicrobianos presentes en el suero lácteo, como la lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, etc. Sin embargo, las proteínas lácteas también han demostrado dar lugar, mediante hidrólisis enzimática, a péptidos con **actividad inmunomodulante**, que podrían actuar sinérgicamente junto con otros factores en la defensa contra infecciones víricas y/o bacterianas. Jollès *et al.* (1981) fueron los primeros en demostrar la actividad inmunestimulante en un hidrolizado tróptico de caseínas procedentes de leche humana. A partir de este momento se identificaron péptidos derivados de las fracciones de α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseína bovina y de la β -caseína humana capaces de estimular la proliferación de ciertas células específicas del sistema inmune *in vitro*, o de proteger frente a infecciones bacterianas a animales de experimentación (Silva y Malcata, 2004). Si bien estos resultados son muy prometedores, no existen datos concluyentes en humanos. En muchos estudios, los péptidos a ensayar no se administraron por vía oral a los animales de experimentación, por lo que se necesitan datos de biodisponibilidad antes de su utilización como ingredientes de alimentos funcionales. Sería necesario, por una parte, validar estos resultados en estudios en humanos y, por otra, conocer el mecanismo de acción implicado en la actividad de estos péptidos.

Además de las proteínas lácteas con actividad antimicrobiana, ciertos péptidos, derivados tanto de la fracción de proteínas de suero como de la fracción caseínica, han demostrado exhibir **propiedades antimicrobianas** frente a distintas bacterias, hongos y levaduras. Aunque los primeros factores antimicrobianos obtenidos por tratamiento de la leche con cuajo datan de 1930 (Jones *et al.*, 1930), su valor como producto antimicrobiano no ha sido explotado comercialmente. El descubrimiento de un fragmento derivado de la lactoferrina humana y bovina, llamado lactoferricina, con 10 veces mayor potencia antimicrobiana que la proteína intacta, renovó el interés por este grupo de péptidos (Bellamy *et al.*, 1992). A partir de ese momento, se han identificado péptidos con actividad antimicrobiana derivados de las proteínas de suero lácteo, lactoferrina, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, y derivados de la fracción caseínica, principalmente α_{s1} -, α_{s2} - y κ -caseína. Los péptidos descritos, su origen y los métodos de obtención propuestos han sido recogidos recientemente en varias revisiones sobre el tema (Floris *et al.*, 2003; Clare *et al.*, 2003; Gobetti *et al.*, 2004). La actividad de estos fragmentos ha sido demostrada casi exclusivamente mediante ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*. Solamente para el fragmento 1-23 de la α_{s1} -caseína (isracidina) y para la lactoferricina se han llevado a cabo ensayos en animales de experimentación, demostrándose, en ambos, una acción inmunoestimulante y protectora frente a infecciones recurrentes (Lahov y Regelson, 1996; Miyauchi *et al.*, 1998). Por lo tanto, este grupo de péptidos tiene un enorme potencial para su uso en alimentos o preparaciones farmacéuticas e, incluso, se ha sugerido que podrían tener implicaciones fisiológicas al formarse *in vivo* durante la digestión de las proteínas lácteas (Kuwata *et al.*, 1998; Recio y Visser, 1999).

Efecto sobre la absorción de nutrientes

Los péptidos correspondientes a las regiones fosforiladas de las caseínas se conocen con el nombre de caseinfosfopéptidos. Estos péptidos han demostrado, *in vitro*, su capacidad para prevenir la precipitación del calcio en presencia de fosfato a pH alcalino (Berrocal *et al.*, 1989; Holt, 2001). De hecho, la elevada **biodisponibilidad del calcio** en la leche y los productos lácteos se atribuye a las regiones fosforiladas de las caseínas, ya que estos péptidos facilitan la solubilidad del calcio al pH del íleon distal, donde tiene lugar la absorción de este mineral. Distintos estudios en modelos animales y en humanos han demostrado la formación de caseinfosfopéptidos tras la ingestión de leche, productos lácteos fermentados, caseínas o preparaciones de fosfopéptidos (Meisel y Frister, 1988; Chabance *et al.*, 1998). Recientemente, se ha descrito la presencia de estos péptidos en el intestino delgado de humanos tras la ingestión de leche o de preparaciones de fosfopéptidos (Meisel *et al.*, 2001, 2003). Estos estudios demuestran la formación de caseinfosfopéptidos por acción de las enzimas gastrointestinales *in vivo* y que, al menos en parte, son resistentes a la digestión hasta el íleon distal.

Sin embargo, los ensayos sobre biodisponibilidad de minerales en presencia de caseinfosfopéptidos llevados a cabo en animales arrojan resultados contradictorios (revisión en Meisel y FitzGerald, 2003). Los resultados de los ensayos de intervención en humanos tampoco son coincidentes. Algunos estudios han demostrado que los caseinfosfopéptidos producen un aumento en la absorción de calcio en mujeres durante la menopausia que presentaban niveles bajos de absorción de calcio (Heaney *et al.*, 1994), y sin embargo, en voluntarios sanos con dietas pobres en fitatos (Hansen *et al.*, 1997), otros estudios no han encontrado ningún cambio significativo en la biodisponibilidad de calcio (Meisel y FitzGerald, 2003). Esta variabilidad puede deberse a las complejas interacciones entre los caseinfosfopéptidos, el calcio y otros constituyentes de la dieta (Heaney *et al.*, 1994). Además, la absorción del calcio se ve afectada por la concentración de fosfato (relación calcio/fosfato) presente (Erba *et al.*, 2001) y por los niveles de caseinfosfopéptidos (Bennet *et al.*, 2000). Así, relaciones altas de caseinfosfopéptidos respecto al calcio pueden disminuir la biodisponibilidad del mismo debido al fuerte efecto quelante de estos péptidos. Es evidente la necesidad de realizar estudios adicionales en humanos para demostrar inequívocamente el potencial de estos péptidos en la biodisponibilidad de minerales de la dieta. Sin embargo, ya se pueden encontrar en el mercado japonés bebidas con hierro y calcio enriquecidas en caseinfosfopéptidos, así como galletas y dulces horneados enriquecidos en minerales y caseinfosfopéptidos en el mercado asiático.

A los caseinfosfopéptidos también se les atribuye **actividad anticariogénica** por su capacidad para aumentar el nivel de fosfato cálcico del esmalte dental y así influir en los procesos de desmineralización/remineralización (Reynolds *et al.*, 1995). Esta actividad se ha confirmado en modelos animales y en humanos, como han revisado recientemente Reynolds (2003) y Aimutis (2003). Los distintos estudios en animales han demostrado que la adición de leche en polvo o caseína a la dieta de animales de experimentación reduce la aparición de caries. También se ha podido demostrar la actividad anticariogénica del queso, que se ha correlacionado con los niveles de caseína y fosfato cálcico (Reynolds, 2003). Distintos estudios en humanos sobre la actividad anticariogénica de productos lácteos y preparaciones de caseinfosfopéptidos han confirmado de forma uniforme el efecto anticariogénico. Así, se ha observado cómo el extracto soluble en agua de queso reduce la desmineralización del esmalte dental debido a un aumento de la concentración de calcio de la placa (Silva *et al.*, 1987). El extracto soluble en agua del queso contiene caseinfosfopéptidos que se liberan durante el proceso de elaboración y maduración del queso (Grenby *et al.*, 2001). Los péptidos fosforilados se sitúan preferentemente en la superficie de los microorganismos de la placa dental y en la matriz extracelular del esmalte (Reynolds, 1998). Recientemente, dos ensayos en humanos han demostrado la capacidad de un preparado comercial de caseinfosfopéptidos (Recaldent[®]), en forma de chicle, para remineralizar las lesiones del esmalte dental (Shen *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2003).

II.4. Ingredientes funcionales de naturaleza lipídica

Lípidos lácteos

Desde un punto de vista funcional, la grasa láctea no ha sido muy apreciada debido a la presencia en ácidos grasos saturados y colesterol. Hoy se sabe que los ácidos grasos C12, C14 y C16 son los que más influencia tienen en el aumento de los niveles de colesterol sérico (Schaafsma, 1997) y que, por tanto, el 60% de los ácidos grasos presentes en la leche no tienen este efecto. La grasa láctea contiene aproximadamente un 10% de ácidos grasos de cadena media y corta (C4-C10), y esto, junto a otros factores, como la posición de los mismos en la cadena de glicerol y el hecho de que muchos de los ácidos grasos presentes en la leche sean rápidamente absorbidos, contribuye a su alta digestibilidad. Dado que la grasa láctea es el vehículo de vitaminas liposolubles A, D, E y K y carotenoides, su elevada digestibilidad favorece la biodisponibilidad de estos nutrientes. Además, en la grasa láctea se han identificado una serie de componentes que han atraído la atención de numerosas investigaciones por los beneficios que comportan para la salud.

Ácido butírico

Ya se ha mencionado que el ácido butírico, formado por las bacterias de la flora intestinal durante la fermentación de los carbohidratos en el colon, tiene un efecto trófico sobre las células de la mucosa intestinal (Mortensen *et al.*, 1996). Por ello, al butirato que se produce durante la digestión de la grasa láctea también se le ha atribuido un efecto beneficioso sobre las células de la mucosa gástrica e intestinal.

El ácido butírico de la grasa láctea ha sido especialmente estudiado en los últimos años por su posible **actividad anticancerígena** demostrada en cultivos celulares. El ácido butírico inhibe células cancerígenas prostáticas (Maier *et al.*, 2000), distintas células cancerígenas mamarias (Coradini *et al.*, 1997) y células cancerígenas colónicas (Wolter y Stein, 2002) en cultivos celulares. Sin embargo, el uso terapéutico del ácido butírico en pacientes con leucemia no tuvo éxito, probablemente debido a la corta vida media de este compuesto en plasma. Su administración como tributirina aumenta notablemente la concentración plasmática, tanto en animales de experimentación (Newmark y Young, 1995) como en humanos (Conley *et al.*, 1998). Este componente de la grasa láctea está siendo estudiado por su potencial actividad en la prevención de determinados tipos de cáncer, como el cáncer de mama, y ya existen resultados obtenidos en animales de experimentación (Yanagi *et al.*, 1993; Belobrajdic

y MacIntosh, 2000). Un aspecto interesante en la prevención del cáncer es que se ha sugerido que el ácido butírico podría actuar de forma sinérgica con otros componentes alimentarios, por lo que no serían necesarias concentraciones plasmáticas muy elevadas para proporcionar un efecto beneficioso (Parodi, 2004).

Productos de digestión de la grasa láctea

Se sabe que los ácidos grasos poseen **actividades antibacterianas y antivíricas**; sin embargo, se desconocía si ejercían también esta acción en el tracto gastrointestinal al consumirse esterificados como triglicéridos. Ya en 1984, Koopman *et al.* (1984) observaron que los niños alimentados con leche con bajo contenido en grasa sufrían cinco veces más enfermedades gastrointestinales agudas que aquellos alimentados con leche entera. Aunque en principio se observó la misma tendencia en niños de todas las edades, los resultados más relevantes se encontraron en los comprendidos entre 1 y 2 años de edad (se excluyeron del estudio los niños inferiores a 1 año de vida). La actividad antibacteriana de los triglicéridos presentes en leche y en fórmulas maternizadas se ha demostrado *in vitro*, tras el tratamiento de las mismas con lipasas (Isaacs *et al.*, 1992). Los ácidos grasos provenientes de la grasa láctea han demostrado potente actividad antibacteriana *in vitro* frente a distintas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sun *et al.*, 1998) y frente a distintos virus, incluyendo virus respiratorios, virus del herpes simple tipo I y *Haemophilus influenzae* (Isaacs *et al.*, 1992). Estos efectos también se han demostrado en ratas alimentadas con leche de distinto contenido en grasa, a las que se les indujo una intoxicación con *Listeria monocytogenes* (Sprong *et al.*, 1999). Además, se pudo concluir que los ácidos grasos C10, C12 y C14 y los monoacilglicérols de C12, C14 y C16 eran los principales responsables de esta actividad (Spong *et al.*, 1999). Estos y otros estudios confirman la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos de cadena media y corta provenientes de la digestión de la grasa láctea y sugieren un beneficio para la salud, sobre todo en los más jóvenes. En cualquier caso, sería necesario realizar ensayos clínicos en humanos para confirmar la importancia de la ingestión de grasa láctea en la salud intestinal.

Ácido linoleico conjugado (CLA)

CLA es una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico, que se forman por los microorganismos presentes en el rumen de las reses. La grasa láctea contiene de 5 a 7 mg de CLA/g. También está presente, aunque en menor concentración, en carne y marisco, mientras que su concentración en aceite vegetal es inferior a 1 mg/g. CLA ha demostrado ejercer distintos **efectos anticancerígenos**, siendo la inhibición de tumores epiteliales en animales de experimentación uno de los primeros beneficios descritos (Ha *et al.*, 1987). Desde este momento, los estudios sobre la acti-

vidad anticancerígena y de prevención de cáncer de estos compuestos han sido muy numerosos y se han recogido en revisiones recientes (Ip *et al.*, 2003; Parodi, 2004). Pero, además, a este conjunto de sustancias se le han atribuido otros efectos, como el de promover la pérdida de peso corporal, disminuir los niveles de glucosa sérica y ejercer actividad inmunoestimulante, entre otros, demostrados en numerosos estudios con cultivos celulares y animales de experimentación (revisiones en Pariza *et al.*, 2001; Roche *et al.*, 2001; Belury 2002a y b; Parodi, 2002). La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo utilizando mezclas de isómeros de CLA y solamente existen algunos datos sobre la actividad biológica de isómeros individuales. Los estudios en humanos no son tan abundantes, aunque en los últimos años se están realizando ensayos clínicos con estos compuestos. La tabla 7 recoge los principales resultados de las actividades biológicas de CLA investigadas en humanos.

Tabla 7 Principales resultados de los ensayos clínicos en humanos realizados con CLA

Efecto	Referencia
Aumento de isoprostanos	Basu <i>et al.</i> (2000)
Reducción de grasa corporal en obesos	Blankson <i>et al.</i> (2000)
Disminución transitoria de los niveles de leptina. No influye en los niveles de insulina o glucosa plasmática	Medina <i>et al.</i> (2000)
No influye en los niveles de insulina o glucosa plasmática	Pariza <i>et al.</i> (2001)
Actividad en los lípidos séricos y grasa corporal	Mougios <i>et al.</i> (2001)
Reducción del tejido adiposo abdominal en hombres obesos de mediana edad con signos de síndrome metabólico	Riserus <i>et al.</i> (2001)
Disminución de grasa corporal en individuos sanos y activos	Thom <i>et al.</i> (2001)
No existen efectos significativos en el metabolismo de los ácidos grasos o glicerol	Zambell <i>et al.</i> (2001)
En mujeres en periodo de lactación disminuye el contenido de grasa láctea	Masters <i>et al.</i> (2002)
Aumento de los niveles de leptina plasmática y peso corporal en diabéticos	Belury <i>et al.</i> (2003)
Aumento de la proteína C-reactiva en hombres obesos tras la administración de trans-10, cis-12 CLA.	Riserus <i>et al.</i> (2002a)
Aumento de la respuesta inmune	Riserus <i>et al.</i> (2002b)
Estudios epidemiológicos con mujeres con cáncer de mama (resultados contradictorios)	Aro <i>et al.</i> (2000) Voorrips <i>et al.</i> (2000) Chajes <i>et al.</i> (2002)

De los estudios llevados a cabo hasta la fecha en humanos se puede concluir que CLA puede ser beneficioso en la prevención de algunas enfermedades por su acción sobre el metabolismo lipídico y la respuesta inmune. Así, estos compuestos podrían inhibir o retrasar el avance de enfermedades tales como el **cáncer, la arterioesclerosis y la diabetes**. Mientras que no se han encontrado cambios significativos en distintos parámetros bioquímicos y fisiológicos cuando CLA se administra a individuos sanos (Kelley *et al.*, 2000; Zambell *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2000; Benito *et al.*, 2001a y b), los datos existentes son mucho más concluyentes en pacientes con factores de riesgo a padecer ciertas enfermedades como obesidad (Blankson *et al.*, 2000) e hiperglucemia (Belury *et al.*, 2003). Otro factor importante a tener en cuenta es que estos efectos fisiológicos pueden depender de los isómeros empleados en el estudio. Así, mientras que dosis de CLA de 3 g/día no produjeron ningún efecto beneficioso en los niveles plasmáticos de insulina y glucosa (Medina *et al.*, 2000; Pariza *et al.*, 2001), el isómero *trans*-10, *cis*-12 CLA aumentó la resistencia de la insulina plasmática (Riserus *et al.*, 2002a). Por tanto, habría que tener en cuenta la composición de isómeros de los suplementos dietéticos utilizados a la hora de llevar a cabo los ya de por sí complicados estudios en humanos, donde otros muchos factores van a influir en el resultado.

Los resultados de tres estudios epidemiológicos que evaluaban el efecto protector de CLA frente al cáncer de mama son contradictorios. Mientras que un estudio encontró un efecto protector en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama (Aro *et al.*, 2000), otros dos estudios no encontraron ninguna asociación (Voorrips *et al.*, 2000; Chajes *et al.*, 2002). El estudio de Voorrips *et al.* (2000) fue posteriormente cuestionado por falta de datos cuantitativos sobre la composición del suplemento utilizado. Por último, habría que diferenciar si el efecto deseable que se pretende conseguir con la administración de estos compuestos es un efecto farmacológico, utilizando dosis altas durante cortos periodos de tiempo, o, por el contrario, se pretende obtener un efecto preventivo, con dosis más bajas pero administradas durante periodos de tiempo más largos. En cualquier caso, es evidente la necesidad de la realización de más estudios en humanos para evaluar los beneficios de estos compuestos como suplementos dietéticos en alimentos funcionales.

Fosfolípidos

La grasa láctea contiene distintos fosfolípidos (20-50 mg/L) presentes en el glóbulo de grasa y en la membrana del glóbulo de grasa. La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos lácteos difiere de la de la grasa láctea, ya que el contenido en ácidos grasos insaturados es mayor en la fracción de fosfolípidos y los ácidos grasos de cadena corta están prácticamente ausentes. Se ha propuesto que, debido a la actividad

emulsionante de los fosfolípidos lácteos, éstos podrían favorecer la absorción de los lípidos a nivel intestinal y, de esta forma, mejorar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos liposolubles, como vitaminas y carotenoides (Renner *et al.*, 1989). También a esta fracción lipídica se le atribuyó un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico en sangre, aunque no existen evidencias de que estos efectos sean debidos a los fosfolípidos propiamente dichos y no deriven simplemente de su contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Knuiman *et al.*, 1989). Las actividades biológicas de los fosfolípidos que han recibido más atención en los últimos tiempos son su actividad protectora de la mucosa intestinal y el efecto protector contra microorganismos patógenos. Además, a ciertos componentes de la fracción de fosfolípidos se les atribuye una actividad anticancerígena.

El **efecto protector** de la leche **sobre la mucosa gástrica** es conocido desde hace más de un siglo. Esta actividad se atribuye fundamentalmente a la fracción de fosfolípidos por su capacidad para formar una capa hidrofóbica sobre el epitelio gástrico (Hills *et al.*, 1983). Este efecto se ha demostrado en animales de experimentación (Kivinen *et al.*, 1992a) y en un estudio en humanos en el que se coadministraban fosfolípidos lácteos y aspirina, demostrándose que los fosfolípidos protegían a la mucosa gástrica de las lesiones producidas por la aspirina (Kivinen *et al.*, 1992b). Además, algunos estudios *in vitro* sugieren que la fracción de fosfolípidos lácteos inhiben la interacción del *Helicobacter pylori* con sus receptores de las células epiteliales gastrointestinales (Bitzan *et al.*, 1998).

En cuanto a la protección frente a **infecciones entéricas**, se ha propuesto que ciertos fosfolípidos, en concreto los glicoesfingolípidos, podrían actuar como falsos receptores intestinales para algunas bacterias patógenas (Sprong *et al.*, 1998), virus (Fantini *et al.*, 1997) y toxinas (Laegreid *et al.*, 1986) y, de este modo, proteger frente a infecciones entéricas, sobre todo en niños.

A los **esfingolípidos** de la grasa láctea también se les atribuyen propiedades anticancerígenas en determinados tipos de cáncer, especialmente cáncer de colon. A pesar de existir una amplia documentación sobre esta actividad, basada en ensayos con cultivos celulares y animales de experimentación, revisada recientemente por Parodi (2003, 2004), no existen datos que confirmen este efecto anticancerígeno en humanos. En cualquier caso, los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* ofrecen resultados muy prometedores para el futuro empleo de esta fracción en la **prevención del cáncer de colon**.

A la fracción de grasa láctea también se le atribuyen **otras actividades** que actualmente están siendo objeto de investigación, como efectos sobre el crecimiento del

hueso, actividad anticariogénica y actividad antialérgica (Parodi, 2004). **Otros componentes minoritarios** de la fracción lipídica de la leche, como el ácido 13-metil-tetradecanoico, colesterol, éteres, vitamina A, β -caroteno y vitamina D, están siendo investigados por su posible papel como anticancerígenos o en la prevención de determinados tipos de cáncer (Parodi, 2004).

Lípidos de otros orígenes como ingredientes funcionales en productos lácteos

Ácidos grasos poliinsaturados omega-3

Los efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3, principalmente ácido eicosapentanoico y docosahexanoico, por su papel en la prevención de **enfermedades cardiovasculares**, están avalados por numerosos estudios epidemiológicos y estudios clínicos recogidos en varias revisiones sobre el tema (Sanderson *et al.*, 2004; Ruxton *et al.*, 2004). Los estudios epidemiológicos se iniciaron al observarse una menor tasa de enfermedades cardiovasculares en poblaciones que consumían de forma habitual dietas ricas en pescado. Posteriormente, estudios epidemiológicos han demostrado un bajo factor de riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares en grupos de población que consumen pescado de forma habitual (Bulliyya, 2002; Hu *et al.*, 2002). Además, se ha planteado que, aunque en general una dieta rica en pescado ofrece protección frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, los pescados azules o grasos confieren mayor cardio-protección que los pescados blancos o magros (Oomen *et al.*, 2000).

Además de los estudios epidemiológicos, numerosos estudios clínicos demuestran la relación entre el consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la protección frente a enfermedades cardiovasculares. Un metaanálisis llevado a cabo con los datos de 11 ensayos clínicos, con un total de 7.951 pacientes a los que se les administraron dosis comprendidas entre 0,3-6,0 g/día de ácido eicosapentanoico y 0,6-3,7 g/día de ácido docosahexanoico, concluyó que estos ácidos grasos disminuían la mortalidad debida a infarto de miocardio y muerte súbita en pacientes con enfermedades cardiovasculares (Bucher *et al.*, 2002). El mayor ensayo clínico llevado a cabo hasta el momento incluyó 11.324 pacientes que habían sobrevivido a un infarto de miocardio agudo (GISSI, 1999). Se hizo un seguimiento durante 3 años y medio, mientras se les administraron suplementos de ácidos grasos omega-3, con o sin vitamina E. El estudio reveló una reducción significativa de los fallos cardiacos en los grupos que habían recibido omega-3, independientemente de la inclusión o no de vitamina E.

Además de este efecto cardio-protector, en los últimos años se están llevando a cabo experimentos en modelos animales y en humanos para demostrar la relación entre la ingesta de ácidos poliinsaturados omega-3 y ciertos beneficios sobre enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios, desarrollo cerebral y salud mental. Existen evidencias crecientes que adjudican a los ácidos omega-3 un efecto inmunomodulador (Calder, 1996), lo que ha llevado a la investigación de su papel en enfermedades como la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, asma o fibrosis quística. De todas éstas, sólo existen datos concluyentes sobre las propiedades beneficiosas de los omega-3 en la **artritis reumatoide**, avaladas por suficientes ensayos clínicos (Ruxton *et al.*, 2004). Sin embargo, en el tratamiento de la artritis reumatoide se ha planteado que las dosis que ejercerían efecto en el tratamiento de la enfermedad no serían viables desde el punto de vista práctico (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2000).

Sobre el efecto de los ácidos grasos omega-3 en el desarrollo cerebral y la función mental existen datos en modelos animales (Wainwright, 2002), pero los estudios en humanos no son concluyentes. Se ha observado que la suplementación con ácido docosahexanoico beneficia a bebés prematuros durante los 4 primeros meses de vida, pero no existen suficientes evidencias del papel sobre el desarrollo mental tras este primer periodo (Simmer, 2003a y b). Otros estudios sugieren un cierto efecto positivo en ciertos desórdenes mentales, estados depresivos (incluyendo episodios de depresión postparto) y demencia senil. Si bien estos compuestos tienen un gran potencial en este campo, su efectividad necesitaría venir avalada por un mayor número de estudios de intervención en humanos (Ruxton *et al.*, 2004).

La ingesta de las cantidades de ácidos omega-3 propuestos (de 0,45 a 0,9 g/día) es difícil de alcanzar sin modificar drásticamente la dieta, sobre todo en poblaciones con bajo consumo de pescado azul. Por ello, se ha propuesto el enriquecimiento de distintos alimentos como huevos o carne mediante la manipulación de la dieta de animales. Asimismo, ya existen en el mercado productos de bollería y productos lácteos (margarinas y leche) enriquecidos en ácidos omega-3. Recientemente, se han publicado los resultados de ensayos de intervención en humanos sanos (Baró *et al.*, 2003) y en pacientes con hiperlipidemia moderada (Carrero *et al.*, 2004), en los que se confirma el efecto beneficioso de leche conteniendo omega-3 en la disminución de determinados lípidos séricos relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La grasa láctea puede sustituirse por aceites con niveles altos de omega-3 o modificarse incluyendo en las dietas de los animales aceites vegetales, aceites de pescado o algas. Desde un punto de vista tecnológico, es posible solucionar los problemas de sabor, textura o aceptabilidad de la leche así modificada o de los productos lácteos que se obtengan de ésta (Martín-Diana *et al.*, 2004).

Esteroles y estanoles

Los fitosteroles son esteroides naturales que están presentes en la fracción no saponificable de los aceites vegetales. Estructuralmente son similares al colesterol, excepto por las sustituciones en la posición C24 de la cadena lateral. Los principales son sitosterol, estigmasterol y campesterol, de los que las dietas normales aportan unos 200-400 mg/día. Relacionados con éstos están los estanoles, como el sitostanol y campostanol, que se obtienen mediante hidrogenación de los esteroides y que se esterifican con ácidos grasos (Tapiero *et al.*, 2003).

Estudios realizados con sitosterol o mezclas de esteroides vegetales (aproximadamente 1 g/día) demostraron que éstos reducen los niveles de **colesterol sérico** en humanos, aproximadamente en un 10%. Posteriormente, se demostró que el sitostanol (sitosterol α 5 saturado) era más potente para reducir la absorción de colesterol y sus niveles séricos (Heinemann *et al.*, 1986), lo que abrió la puerta al desarrollo de margarinas conteniendo ésteres de esteroides y estanoles con ácidos grasos procedentes de pasta de madera de pino (Benecol, comercializado por Raisio Inc. en Finlandia y por Johnson & Johnson fuera de Escandinavia) o de habas de soja (Take Control en Estados Unidos o Flora pro.activ en Europa, comercializados por Unilever) (Hilliam, 2003). Estas margarinas, administradas diariamente de modo que aporten 2-3 g/día de estanoles libres o esterificados, reducen en un 10% el colesterol total y en un 14% el colesterol-LDL, pero no modifican el colesterol-HDL ni los triglicéridos. Estos efectos se han comprobado en estudios cortos (Heinemann *et al.*, 1986) o de un año (Miettinen *et al.*, 1995) en pacientes con hipercolesterolemia moderada e incluso en pacientes que habían sufrido infarto de miocardio (Gylling *et al.*, 1997). Los ésteres de estanoles se mostraron más eficaces que los de esteroides en un estudio prolongado (Miettinen y Gylling, 2004). En septiembre de 2000, la FDA reconoció el uso de ésteres de esteroides y estanoles, aprobando sus alegaciones funcionales (Food and Drug Administration, 2000).

Posteriormente, se comprobó que retenían su actividad en productos más sanos, por su menor contenido en grasa, como yogures (Volpe *et al.*, 2001; Mensik *et al.*, 2002). Pero debe destacarse que los efectos reductores del colesterol de los ésteres de esteroides vegetales difieren según el alimento al que se incorporen, siendo aproximadamente tres veces más efectivos en leche baja en grasa que en pan o cereales (Clifton *et al.*, 2004). Un reciente estudio ha demostrado la eficacia en la reducción del colesterol LDL de una leche conteniendo un 1,2% de grasa, parcialmente reemplazada con aceite vegetal, que contenía esteroides no esterificados de soja (Thomsen *et al.*, 2004).

Los efectos de los esteroides y estanoles vegetales se deben a que interfieren con la absorción del colesterol, ya que compiten con éste desplazándolo de las micelas de sales

biliares, y alteran a las enzimas implicadas en su metabolismo y excreción, a pesar de que se puede producir un incremento compensatorio de la síntesis de colesterol endógeno (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Debe destacarse que sus efectos son aditivos con la dieta y la medicación. Así, cuando forman parte de una dieta baja en grasa y colesterol, se suprime la absorción tanto del colesterol biliar como del dietético, aumentando su excreción y disminuyendo el colesterol-LDL hasta un 20%. También son muy efectivos en combinación con fármacos reductores de colesterol. Cuando se complementa con esteroides y estanoles la medicación con estatinas, ésta resulta más efectiva que cuando se duplica la dosis (Katan *et al.*, 2003). La administración de fitoesteroides en una sola dosis o entre comidas es igualmente efectiva (Quílez *et al.*, 2003).

Un posible efecto adverso asociado a su consumo es la disminución de los niveles plasmáticos de carotenoides y tocoferoles, debido a que disminuyen su absorción, además de a otros mecanismos no identificados. Los niveles plasmáticos de retinol, 25-hidroxi vitamina D y vitamina K no se ven afectados por los ésteres de esteroides y estanoles vegetales. En cualquier caso, se ha calculado que el consumo habitual de fitosteroides podría reducir los carotenoides en plasma entre un 10-20%, lo que se encontraría dentro de las oscilaciones estacionales entre individuos, por lo que no supone un riesgo para la salud y podría compensarse con la ingesta de frutas y vegetales (Ntanios y Duchateau, 2002). En humanos normocolesterolémicos, los esteroides libres reducen la biodisponibilidad del β -caroteno significativamente menos que sus ésteres (Richelle *et al.*, 2004).

Diversos estudios han sugerido que los fitosteroides podrían proteger frente al desarrollo de cáncer de colon, pecho o próstata, alterando o retrasando la progresión de los tumores, al alterar las rutas de transducción de señales, aunque el mecanismo de protección potencial todavía se desconoce (Tapiero *et al.*, 2003). Otros estudios han indicado que podrían promover el cáncer de colon. En cualquier caso, con la evidencia disponible se promueve su uso en personas con riesgo de enfermedades coronarias (Katan *et al.*, 2003).

La investigación futura en fitoesteroides se centra en buscar fuentes alternativas y en perfeccionar los procesos industriales para su obtención, discriminar entre los distintos tipos y dilucidar las bases genéticas de sus mecanismos de acción. También deben definirse de modo preciso los efectos de su administración a largo plazo y minimizar sus efectos secundarios (Quílez *et al.*, 2003). Ensayos en animales sugieren que la administración de fitosteroides esterificados con ácidos grasos omega-3 podría reducir de modo eficaz los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, como colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos, pero se necesitan estudios en humanos para discernir sus efectos a largo plazo (Normen *et al.*, 2004).

II.5. Otros ingredientes funcionales

Calcio

La leche normal contiene aproximadamente 1,2 mg/ml de calcio. La proporción de calcio en otros productos lácteos varía, aunque, por lo general, es posible obtener el 100% de la cantidad diaria recomendada (aproximadamente 1 g) a través de un consumo razonable de productos lácteos. El calcio presente en la leche es particularmente biodisponible, en comparación con el que se encuentra en productos vegetales o en suplementos minerales, y, por ello, los ingredientes lácteos representan un excelente vehículo para enriquecer en calcio distintos alimentos procesados.

Previamente ya se mencionaron algunos efectos biológicos del calcio al referirnos a las proteínas de suero, los fosfopéptidos o los prebióticos. La evidencia científica de los beneficios del calcio en la **salud de dientes y huesos, prevención de la osteoporosis**, protección frente a la hipertensión y problemas cardiovasculares, infecciones gastrointestinales y piedras en el riñón está en expansión (Playne *et al.*, 2003). Pero, aunque se admite que una adecuada ingesta de calcio es importante para las mujeres postmenopáusicas, se necesitan más estudios para establecer su influencia a largo plazo en la reducción de fracturas o en la adquisición de masa ósea en la población adolescente (New, 2002). La evidencia sugiere que el mantenimiento de la salud de los huesos y la prevención de la pérdida ósea a través de la dieta es un tema complejo que incluye muchos nutrientes y otros constituyentes de los alimentos, sus interacciones y factores genéticos (Tucker, 2003). En cuanto a sus efectos sobre la presión arterial, los estudios clínicos muestran significativas **reducciones de la presión arterial** sistólica con la suplementación de calcio en la dieta, aunque el efecto es demasiado pequeño para apoyar su uso para prevenir o tratar la hipertensión (Allender, 1996).

El resultado se ha materializado en iniciativas comerciales dirigidas a grupos específicos como los niños o las mujeres. Se tiende a mezclar el calcio con minerales como magnesio o fósforo y vitaminas (sobre todo D, pero también K), y más recientemente con fosfopéptidos o prebióticos, para optimizar su absorción y su uso en el organismo (Hilliam, 2003). El mercado español es internacionalmente conocido por ser el más desarrollado de Europa, y probablemente del mundo, en leches enriquecidas en calcio. El primer producto, “Puleva Calcio”, se introdujo en 1993, y cinco años después aparecieron otros con ingredientes que favorecían la absorción del calcio, como la vitamina D. En 1999 se lanzó “Asturiana Calcio”, enriquecida en calcio y con oligofructosa (Hilliam, 2003).

Fibra alimentaria

La clasificación más simple de la fibra alimentaria, de acuerdo con su solubilidad y fermentabilidad por las bacterias, la divide en fibra soluble, fermentable en el colon (dentro de la que se encuentran los prebióticos, ya mencionados; la pectina, el salvado de avena, etc.), y fibra insoluble, que se fermenta muy lentamente en el colon (por ejemplo, el salvado de trigo). Ambos tipos pueden añadirse a los productos lácteos.

Entre los efectos beneficiosos de la fibra, comprobados con suficiente nivel de evidencia, está el **alivio del estreñimiento**, ejercido, en el caso de la fibra soluble, por un aumento de la proliferación bacteriana y, en el de la insoluble, a través de sus propiedades captadoras de agua que aumentan la voluminosidad de las heces, su motilidad, frecuencia y consistencia. La fibra insoluble ejerce un efecto de “esponja y fregona” en virtud del cual absorbe ciertas moléculas carcinogénicas y ácidos biliares, por lo que podría ejercer efectos anticancerígenos y reductores del colesterol (James *et al.*, 2003).

Ácido fólico

El ácido fólico y los folatos constituyen un grupo de vitaminas B que juegan un papel esencial en la replicación celular y el embarazo, pues son necesarios para la síntesis de purinas y pirimidinas. Las principales fuentes de folatos son los vegetales de hoja verde, los productos lácteos y los cereales. La suplementación con ácido fólico antes de la concepción disminuye marcadamente los riesgos de **defectos del tubo neural** en el feto. Por otra parte, niveles bajos de folato circulante dan lugar a elevadas concentraciones de homocisteína plasmática, que es un factor de riesgo para ciertas enfermedades cardiovasculares, infarto e incluso depresión y demencia. Existen dudas todavía sobre la biodisponibilidad de los folatos y sobre si es mejor su ingestión como suplementos, alimentos enriquecidos o folatos naturales, o sobre cuáles serían las consecuencias sobre algunos sectores de la población que consumen grandes cantidades de folatos (Finglas *et al.*, 2003).

Compuestos antioxidantes

Existe una evidencia epidemiológica creciente que asocia las dietas ricas en frutas y verduras con menores tasas de mortalidad debidas a enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Evidencias más limitadas sugieren que dichas dietas podrían

disminuir la incidencia de diabetes, cataratas, degeneración macular e hipertensión. La atención se centró en los componentes antioxidantes, que podrían proporcionar protección frente a enfermedades crónicas al disminuir el daño oxidativo en tejidos y moléculas clave mediante la prevención de la formación de radicales libres, su secuestro o su descomposición. La llamada “hipótesis antioxidante” se basa en que el daño oxidativo resulta de la acción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que se forman de modo natural en el organismo. Cuando las defensas antioxidantes son insuficientes tiene lugar la oxidación de DNA, lípidos, proteínas y otras moléculas, lo cual podría disminuirse mediante antioxidantes alimentarios (Ferrari y Torres, 2003).

Se sabe que el daño oxidativo del DNA juega un papel crucial en la iniciación de ciertos tipos de **cáncer**. Una vez producida la mutación, las especies reactivas de oxígeno intervienen también en la replicación y crecimiento de las células anormales (promoción), así como en el crecimiento del tumor y su propagación a otros tejidos (Ladas *et al.*, 2004). Por otra parte, la peroxidación de lípidos contribuye significativamente al desarrollo de la **arteriosclerosis**. Así, las pequeñas lesiones del endotelio vascular atraen y provocan la adherencia de monocitos que, posteriormente, se transforman en macrófagos que se cargan de partículas de LDL conteniendo lípidos oxidados. Al mismo tiempo, los macrófagos liberan factores que estimulan la proliferación de células musculares lisas, lo que da lugar al desarrollo de la placa que reduce la luz del vaso y restringe el flujo de sangre (Vega-López *et al.*, 2004). El daño oxidativo de las proteínas se asocia a afecciones crónicas ligadas al envejecimiento, como enfermedades inflamatorias o desarrollo de cataratas, y, normalmente, se debe a alteraciones en sus funciones catalíticas o de transducción de señales (Mares, 2004).

La posibilidad de que ciertas sustancias antioxidantes abundantes en las plantas como los polifenoles (por ejemplo, flavonoides) y terpenoides (carotenoides) ejerzan efectos positivos en la salud depende de su biodisponibilidad, de que se absorban pasando al torrente sanguíneo y de que alcancen en forma activa los tejidos implicados. Por otra parte, los antioxidantes no se encuentran de forma aislada en los alimentos, por lo que otros constituyentes pueden influir en su actividad. También debe tenerse en cuenta que sus metabolitos pueden tener más relevancia *in vivo* que la propia molécula, en términos de concentración o de actividad biológica. Además, se reconoce, por lo general, que la falta de biomarcadores adecuados del daño oxidativo dificulta la contrastación de la “hipótesis antioxidante” (Buttriss *et al.*, 2002).

Aunque la base científica parece racional y los estudios observacionales han sido convincentes, los estudios de intervención realizados hasta el momento no han podido demostrar que los suplementos antioxidantes como la **vitamina C, vitamina E y carotenoides, etc.**, proporcionen beneficios frente al riesgo cardiovascular o el cáncer,

enfermedad que incluso podrían agravar en algunos subgrupos, como el de fumadores (Eichholzer *et al.*, 2001; Clarke y Armitage, 2002). Las discrepancias entre los distintos estudios podrían deberse al tipo de población (general o de riesgo), las dosis de suplementación (niveles nutricionales o mayores), el número de antioxidantes ensayados y el tipo de administración (individual o combinada) (Hercberg *et al.*, 1998). La mayor parte de los ensayos se basan en la administración de un único antioxidante a elevadas dosis, por lo que se desconoce cuáles son las ingestas óptimas de los antioxidantes alimenticios y hasta qué punto son éstos intercambiables en cuanto a sus funciones (Johnson *et al.*, 2003; Stanner *et al.*, 2004). De hecho, todavía no se comprenden con exactitud los mecanismos en los cuales se basarían los efectos de los antioxidantes, puesto que, al ser la oxidación un proceso normal, aún se desconoce qué nivel de daño oxidativo aumenta el riesgo de enfermedad. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno intervienen también en la transmisión de ciertas señales de importancia en el funcionamiento y la supervivencia celular, pudiendo desencadenar fenómenos como la apoptosis (Møller y Loft, 2004).

De modo general, se reconoce que los estudios futuros sobre antioxidantes deberán darle más importancia al estudio de su biodisponibilidad (absorción, metabolismo y distribución celular y tisular), para establecer si los efectos *in vitro* son aplicables a la situación *in vivo*. Los ensayos en humanos deberían concentrarse en grupos específicos, con baja ingesta de las sustancias en cuestión o más susceptibles al daño oxidativo (Cooper, 2004). También es necesario clarificar ciertos aspectos de seguridad; por ejemplo, si los antioxidantes podrían actuar como pro-oxidantes bajo determinadas circunstancias (McKevith *et al.*, 2003).

La leche y los productos lácteos con frecuencia se enriquecen con vitaminas antioxidantes. Por lo general, estos productos apelan sobre todo a una mejora de la salud en general, más que a sus potenciales beneficios antioxidantes. Recientemente han aparecido en el mercado yogures conteniendo té. El té es muy rico en polifenoles, fundamentalmente catequinas, y algunos estudios epidemiológicos han asociado su consumo a una menor incidencia de cáncer, aunque en dosis muy elevadas y poblaciones de alto riesgo (Rafter, 2002). También podrían tener efectos prometedores en la protección de afecciones cardiovasculares e inflamatorias.

II.6. Conclusiones

Las investigaciones realizadas hasta el momento han demostrado que la dieta es uno de los factores que influyen significativamente en el riesgo y la severidad de nume-

rosas enfermedades. Los mecanismos que inician o promueven enfermedades de origen multifactorial, como la arteriosclerosis, las afecciones cardiovasculares, el cáncer, la obesidad o la osteoporosis, entre otras, son fundamentalmente metabólicos. La naturaleza misma de estas enfermedades crónicas sugiere que la aplicación constante de pequeñas medidas podría prevenirlas eficazmente, evitándose la necesidad de intervenciones médicas más drásticas en etapas más avanzadas. El empleo de alimentos funcionales proporciona la oportunidad de combinar alimentos de amplio uso, aceptabilidad y tolerancia con moléculas biológicamente activas como estrategia para corregir pequeñas disfunciones metabólicas que pueden conducir a enfermedades crónicas. Sin embargo, debe destacarse que, para que sean efectivos, estos alimentos deben estar formulados para cubrir las necesidades metabólicas de grupos específicos de consumidores, sus efectos deben estar comprobados científicamente, su formulación sometida a estrictas evaluaciones y han de poseer suficiente valor añadido como para que se mantenga su consumo durante periodos largos de tiempo.

De la información recogida en este trabajo se deduce que, si bien muchos de los resultados obtenidos hasta el momento son prometedores, todavía hay mucho que hacer en lo que concierne a la clarificación de los beneficios para la salud de los alimentos funcionales, la definición del alcance de tales beneficios y de los mecanismos de acción y la subsiguiente comunicación de esta información al consumidor. Por supuesto, deben solucionarse las cuestiones regulatorias y legales. Tampoco debe olvidarse que para que sean efectivos deberían influir en más de una ruta metabólica, y que es poco probable que los compuestos activos sean universalmente eficaces para todos los consumidores, por lo que los esfuerzos han de dirigirse a identificar perfiles metabólicos individuales.

II.7. Bibliografía

Adams, K. F.; Chen, C.; Newton, K. M.; Potter, J. D., y Lampe, J. W.

(2004) Soy isoflavones do not modulate prostate-specific antigen concentrations in older men in a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiolol. Biomarkers Prev.* 13, 644-648.

Agin, D.; Gallagher, D.; Wang, J.; Heymsfield, S. B.; Pierson, R. N., Jr., y Kotler, D. P.

(2001) Effects of whey protein and resistance exercise on body cell mass, muscle strength, and quality of life in women with HIV AIDS 15, 2431-2440.

Agin, D.; Kotler, D. P.; Papandreou, D.; Liss, M.; Wang, J.; Thornton, J.; Gallagher, D., y Pierson, R. N., Jr.

(2000) Effects of whey protein and resistance exercise on body composition and muscle strength in women with HIV infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 904, 607-609.

Aimutis, W. R.

(2003) Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *J. Nutr.* 134, 989S-995S.

Allender, P. S.; Cutler, J. A.; Follmann, D.; Cappuccio, F. P.; Pryer, J., y Elliot, P.

(1996) Dietary calcium and blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Ann. Intern. Med.* 124, 825-831.

Anderson, J. W.; Johnstone, B. M., y Cook-Newell, M. E.

(1995) Meta-analysis of effects of soy protein intake on serum lipids in humans. *N. Engl. J. Med.* 333, 276-282.

Andersson, H.; Asp, N.-G.; Bruce, A.; Roos, S.; Wadström, T., y Wold, A. E.

(2001) Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. *Scand. J. Nutr/Näringsforskning* 45, 58-75.

Anthony, J. C.; Anthony, T. G.; Kimball, S. R., y Jefferson, L. S.

(2001) Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* 131, 856S-860S.

Aoe, S.; Toba, Y.; Yamamura, J.; Kawakami, H.; Yahiro, M.; Kumegawa, M.; Itabashi, A., y Takada, Y.

(2001) Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 913-918.

Aro, A.; Mannisto, S.; Salminen, I.; Ovaskainen, M.-L.; Kataja, V., y Uusitupa, M.

(2000) Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr. Cancer* 38, 151-157.

Baró, L.; Fonollá, J.; Peña, J. L.; Martínez-Pérez, A.; Lucena, A.; Jiménez, J.; Boza, J. J., y López-Huertas, E.

(2003) n-3 fatty acid plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin. Nutr.* 22, 175-182.

Basu, S.; Smedman, A., y Vessby, B.

(2000) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett.* 468, 33-36.

Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K., y Tomita, M.

(1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121, 130-136.

Belobrajdic, D. P., y MacIntosh, G. H.

(2000) Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats. *Nutr. Cancer* 36, 217-223.

Belury, M. A.

(2002a) Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 505-531.

(2002b) Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J. Nutr.* 132, 2995-2998.

Belury, M. A.; Mahon, A., y Banni, S.

(2003) The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-cla, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr.* 133, 257S-260S.

Bemis, D. L.; Capodice, J. L.; Desai, M.; Buttyan, R., y Katz, A. E.

(2004) A concentrated aglycone isoflavone preparation (GCP) that demonstrates potent anti-prostate cancer activity *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 10, 5282-5292.

Benito, P.; Nelson, G. J.; Kelley, D. S.; Bartolini, G.; Schmidt, P. C., y Simon, V.

(2001a) The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 36, 229-236.

(2001b) The effect of conjugated linoleic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans. *Lipids* 36, 221-227.

Bennet, R. G.; Gorbach, S. L.; Goldin, B. R., et al.

(1996) Treatment of relapsing *C. difficile* diarrhea with *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today* 31, 35S-38S.

- Bennet, T.; Desmond, A.; Harrington, M.; McDonagh, D.; FitzGerald, R. J.; Flynn, A., y Cashman, K. D.
(2000) The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. *Br. J. Nutr.* 83, 673-680.
- Berrocal, R.; Chanton, S.; Juillerat, M. A.; Pavillard, B.; Scherz, J.-C., y Jost, R.
(1989) Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J. Dairy Res.* 56, 335-341.
- Bitzan, M. M.; Gold, B. D.; Philpott, D. J.; Huesca, M.; Sherman, P. M.; Karch, H.; Lissner, R.; Lingwood, C. A., y Karmali, M. A.
(1998) Inhibition of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* binding to lipid receptors by bovine colostrum. *J. Infect. Dis.* 177, 955-961.
- Blankson, H.; Stakkestad, J. A.; Fagertun, H.; Thom, E.; Wadstein, J., y Gudmundsen, O.
(2000) Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr.* 130, 2943-2948.
- Blaut, M.
(2002) Relationship of prebiotics and food to intestinal flora. *Eur. J. Nutr.* 41, S11-S16.
- Bonang, G.; Monintja, H. E.; Sujudi, y Van der Waaij, D.
(2000) Influence of breastmilk on the development of resistance to intestinal colonization in infants born at the Atma Jaya Hospital. Jakarta. *Scand. J. Infect. Dis.* 32, 189-196.
- Borriello, S. P.; Hammes, W. P.; Holzapfel, W.; Marteau, P.; Schrezenmeir, J.; Vaara, M., y Valtonen, V.
(2003) Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 36, 775-780.
- Bounous, G.
(2000) Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20, 4785-4792.
- Brantl, V.; Teschemacher, A.; Henschen, A., y Lottspeich, F.
(1979) Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360 (9), 1211-1216.

Brantl, V.; Teschemacher, H.; Henschen, A., y Lottspeich, F.

(1981) Opioid activities of β -casomorphins. *Life Sci.* 28, 1903-1909.

Bucher, H. C.; Hengstler, P.; Schindler, C., y Meier, G.

(2002) N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.* 112, 298-304.

Bulliyya, G.

(2002) Influence of fish consumption on the distribution of serum cholesterol in lipoprotein fractions: comparative study among fish-consuming and no-fish consuming populations. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11, 104-111.

Burke, D. G.; Chilibeck, P. D.; Davidson, K. S.; Candow, D. G.; Farthing, J., y Smith-Palmer, T.

(2001) The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 11, 349-364.

Buttriss, J. L.; Hughes, J.; Kelly, C. N. M., y Stanner, S.

(2002) Antioxidants in food: a summary of the review conducted for the Food Standards Agency. *Nutr. Bull.* 27, 227-236.

Calder, P. C.

(1996) Immunomodulation and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 737-774.

Calder, P. C., y Kew, S.

(2002) The immune system: a target for functional foods? *Br. J. Nutr.* 88, S165-S177.

Carrero, J. J.; Baró, L.; Fonollá, J.; González-Santiago, M.;

Martínez-Férez, A.; Castillo, R.; Jiménez, J.; Boza, J.J., y López-Huertas, E.

(2004) Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia. *Nutrition* 20, 521-527.

Chabance, B.; Jollès, P.; Izquierdo, C.; Mazoyer, E.; Francoual, C.;

Drouet, L., y Fiat, A. M.

(1995) Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br. J. Nutr.* 73, 582-590.

- Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J. C.; Migliore-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jollès, P., y Fiat, A. M.
(1998) Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80, 155-165.
- Chajes, V.; Lavillonniere, F.; Ferrari, P.; Jourdan, M.-L.; Pinault, M.; Maillard, V.; Sebedio, J.-L., y Bougnoux, P.
(2002) Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of French patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 11, 672-673.
- Chiang, B. L.; Sheih, Y. H.; Wang, L. H.; Liao, C. K., y Gill, H. S.
(2000) Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 849-855.
- Clancy, R.
(2003) Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 9-12.
- Clare, D. A.; Catignani, G. L., y Swaisgood, H. E.
(2003) Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Design* 9, 1239-1255.
- Clare, D. A., y Swaisgood, H. E.
(2000) Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.* 83, 1187-1195.
- Clarke, R., y Armitage, J.
(2002) Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials. *Cardiovascular Drugs Ther.* 16, 411-415.
- Clarkson, T. B.
(2002) Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 132, 566S-569S.
- Clifton, P. M.; Noakes, M.; Sullivan, D.; Erichsen, N.; Ross, D.; Annison, G.; Fassoulakis, A.; Cehun, M., y Nestel, P.
(2004) Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 503-509.

Conley, B. A.; Ererin, M. J.; Tait, N.; Rosen, D. M.; Sausville, E. A.; Dover, G.; Fram, R. J., y Van Echo, D. A.

(1998) Phase I study of the orally administered butyrate produg, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 4, 629-634.

Cooper, D. A.

(2004) Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J. Nutr.* 134, 221S-224S.

Coradini, D.; Biffi, A.; Costa, A.; Pellizzaro, C.; Pirronello, E., y Di Fronzo, G.

(1997) Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines. *Cell Prolif.* 30, 149-159.

Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T., y Macfarlane, S.

(2003) Intestinal bacteria and ulcerative colitis. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 4, 9-20.

De Vrese, M.; Stegelmann, A.; Richter, B.; Fenselau, S.; Laue, C., y Schrezenmeir, J.

(2001) Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 421S-429S.

Delzenne, N. M.

(2003) Oligosaccharides: state of the art. *Procc. Nutr. Soc.* 62, 177-182.

Demonty, I.; Lamarche, B., y Jones, P. J.

(2003) Role of isoflavones in the hypocholesterolemic effect of soy. *Nutr. Rev.* 61, 189-203.

Dhiman, R. K.; Sawheny, M. S.; Chawla, Y. K.; Das, G.; Ram, S., y Dilawari, J. B.

(2000) Efficacy of lactulose in cirrhotic patients with subclinical hepatic encephalopathy. *Dig. Dis. Sci.* 45, 1549-1552.

Dunne, C.; Murphy, L.; Flynn, S.; O'Mahony, L.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Morrissey, D.; Thorton, G.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.;

Quigley, E. M. M.; O'Sullivan, G. C.; Shanahan, F., y Collins, J. K.

(1999) Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human cllinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 279-292.

Duranti, M.; Lovati, M. R.; Dani, V.; Barbiroli, A.; Scarafoni, A.; Castiglioni, S.; Ponzone, C., y Morazzoni, P.

(2004) The alpha' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver beta-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr.* 134, 1334-1339.

Dziuba, J., y Minkiewicz, P.

(1996) Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of κ -casein. *Int. Dairy J.* 6, 1017-1044.

Eichholzer, M.; Luthy, J.; Gutzwiller, F., y Stahelin, H. B.

(2001) The role of folate, antioxidant vitamins and other constituents in fruit and vegetables in the prevention of cardiovascular disease: the epidemiological evidence. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 71, 5-17.

Erba, D.; Ciappellano, S., y Testolin, G.

(2001) Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate. *Nutr. Res.* 21, 649-656.

Fantini, J.; Hammache, D.; Delezay, O.; Yahi, N.; Andre-Barres, C.; Rico-Lattes, I., y Lattes, A.

(1997) Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp 120 and inhibit HIV-induced fusion and entry. *J. Biol. Chem.* 272, 7245-7252.

Ferrari, C. K. B., y Torres, E. A. F. S.

(2003) Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed. Pharmacother.* 57, 251-260.

Finglas, P. M.; Wrigth, A. J. A.; Wolfe, C. A.; Hart, D. J.; Wright, D. M., y Dainty, J. R.

(2003) Is there more to folates than neural-tube defects? *Proc. Nutr. Soc.* 62, 591-598.

FitzGerald, R.; Murray, B., y Walsh, D. J.

(2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134, 980S-988S.

Floris, R.; Recio, I.; Berkhout, B., y Visser, S.

(2003) Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Curr. Pharm. Design* 9, 1257-1275.

Food and Drug Administration

(1999) Food labeling health claims: soy protein and coronary heart disease. Interim Final rule. Fed. Register 64, 57699-57733.

(2000) Food labeling health claims: plant sterol/stanol esters and coronary heart disease. Interim Final rule. Fed. Register 65, 54685-54739.

Fosset, S., y Tomé, D.

(2000) Dietary protein-derived peptides with antithrombotic activity. IDF Bull. 353, 65-68.

Franck, A.

(2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. Br. J. Nutr. 87, S287-S291.

Fugate, S. E., y Church, C. O.

(2004) Nonestrogen treatment modalities for vasomotor symptoms associated with menopause. Ann. Pharmacother. 38, 1482-1499.

Gallagher, J. C.; Satpathy, R.; Rafferty, K., y Haynatzka, V.

(2004) The effect of soy protein isolate on bone metabolism. Menopause 11, 290-298.

Ghisolfi, J.

(2003) Dietary fibre and prebiotics in infant formulas. Proc. Nutr. Soc. 62; 183-185.

Gibson, G. R.; Beatty, E. R.; Wang, X., y Cummings, J. H.

(1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterol. 108, 975-982.

Gibson, G. R., y Roberfroid, M. B.

(1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125, 1401-1412.

GISSI. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico

(1999) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Lancet 354, 447-455.

Gobbetti, M.; Minervini, F., y Rizzello, C. G.

(2004) Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 173-188.

Grenby, T. H.; Andrews, A. T.; Mistry, M., y Williams, R. J.

(2001) Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations *in vitro*. *J. Dent.* 29, 83-92.

Gueimonde, M.; Delgado, S.; Mayo, B.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A., y De los Reyes-Gavilán, C. G.

(2004) Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Res. Int.* 37, 839-850.

Gylling, H.; Radhakrishnan, R., y Miettinen, T. A.

(1997) Reduction of serum cholesterol in postmenopausal women with previous myocardial infarction and cholesterol malabsorption induced by dietary sitostanol ester margarine. Women and dietary sitostanol. *Circulation* 96, 4226-4231.

Ha, E., y Zemel, M. B.

(2003) Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J. Nutr. Biochem.* 14, 251-258.

Ha, Y. L.; Grimm, N. K., y Pariza, M. W.

(1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.

Hakkak, R.; Korourian, S.; Shelnutt, S. R.; Lensing, S.; Ronis, M. J., y Badger, T. M.

(2000) Dietary whey proteins protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 555-558.

Hamilton-Miller, J. M.

(2003) The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22, 360-366.

Hamilton-Miller, J.; Shah, S., y Winkler, J.

(1999) Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutr.* 2, 223-229.

Hansen, M.; Sandström, B.; Jensen, M., y Sörensen, S. S.

(1997) Casein phosphopeptides improve zinc and calcium absorption from rice-based but not from whole-grain infant cereal. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24, 56-62.

Hata, Y.; Yamamoto, M.; Ohni, M.; Nakajima, K.; Nakamura, Y., y Takano, T.

(1996) A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 767-771.

Hatakka, K.; Savilahti, E.; Pökä, A.; Meurman, J. H.; Pousa, T.; Nässe, L.; Saxelin, M., y Korpela, R.

(2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: a double blind randomised trial. *Br. Med. J.* 322, 1327-1329.

Heaney, R. P.; Saito, Y., y Orimo, H.

(1994) Effect of casein phosphopeptide on absorbability of co-ingested calcium in normal post-menopausal women. *J. Bone Miner. Metab.* 12, 77-81.

Heinemann, T.; Leiss, O., y Van Bergmann, K.

(1986) Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 61, 219-223.

Hercberg, S.; Galán, P.; Preziosi, P.; Alfárez, M. J., y Vázquez, C.

(1998) The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. *Nutrition* 14, 513-520.

Hilliam, M.

(2003) Future for dairy products and ingredients in the functional foods market. *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 98-103.

Hills, B. A.; Butler, B. D., y Lichtenberger, L. M.

(1983) Gastric mucosal barrier hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am. J. Physiol.* 244, G561-G568.

Holt, C.

(2001) Calcium phosphate nanoclusters and their applications. World Patent WO0144106.

Hu, F. B.; Bronner, L.; Willett, W. C.; Stampfer, M. J.; Rexrode, K. M.;

Albert, C. M.; Hunter, D., y Manson, J. E.

(2002) Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *J. Am. Med. Assoc.* 287, 1815-1821.

Hugenholtz, J., y Smid, E. J.

(2002) Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 497-507.

Hunninghake, D. B.; Miller, V. T.; LaRosa, J. C.; Kinosian, B.; Jacobson, T.; Brown, V.; Howard, W. J.; Edelman, D. A., y O'Connor, R. R.

(1994) Long-term treatment of hypercholesterolemia with dietary fiber. *Am. J. Med.* 97, 504-508.

Hussain, M.; Banerjee, M.; Sarkar, F. H.; Djuric, Z.; Pollak, M. N.; Doerge, D.; Fontana, J.; Chinni, S.; Davis, J.; Forman, J.; Wood, D. P., y Kucuk, O.

(2003) Soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutr. Cancer* 47, 111-117.

Ihalin, R.; Pienihakkinen, K.; Lenander, M.; Tenovuo, J., y Jousimies-Somer, H

(2003) Susceptibilities of different *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains to lactoperoxidase-iodide-hydrogen peroxide combination and different antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21, 434-440.

Ikeda, M.; Sugiyama, K.; Tanaka, T.; Tanaka, K.; Sekihara, H.; Shimotohno, K., y Kato, N.

(1998) Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured humans hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 549-553.

Ip, M. M.; Masso-Welch, P. A., e Ip, C.

(2003) Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of stroma and the epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8, 103-108.

Isaacs, C. E.; Litov, R. E.; Marie, P., y Thormar, H.

(1992) Addition of lipases to infant formulas produces antiviral and antibacterial activity. *J. Nutr. Biochem.* 3, 304-308.

Isolauri, E.; Arvola, T.; Sutas, Y.; Moilanen, E., y Salminen, S.

(2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy* 30, 1604-1610.

Isolauri, E.; Juntunen, M.; Rautanen, T.; Sillanauke, P., y Koivula, T.

(1991) A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88, 90-97.

James, S. L.; Muir, J. G.; Curtis, S. L., y Gibson, P. R.

(2003) Dietary fibre: a roughage guide. *Intern. Med. J.* 33, 291-296.

Johnson, L. J.; Meacham, S. L., y Kruskall, L. J.

(2003) The antioxidants- vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. *J. Agromedicine* 9, 65-82.

Jollès, P.; Parker, F.; Floch, F.; Migliore, D.; Alliel, P.; Zerial, A., y Werner, G. H.

(1981) Immunostimulating substances from human casein. *J. Pharmacol.* 3, 363-369.

Jones, F. S., y Simms, H. S.

(1930) The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk. *J. Exp. Med.* 51, 327-339.

Kalliomäki, M.; Salminen, S.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Koskinen, P., e Isolauri, E.

(2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079.

Kalliomäki, M.; Salminen, S.; Poussa, T.; Arvilommi, H., e Isolauri, E.

(2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871.

Katan, M. B.; Grundy, S. M.; Jones, P.; Law, M.; Miettinen, T.; Paoletti, R.; Stresa Workshop Participants

(2003) Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin. Proc.* 78, 965-978.

Kelley, D. S.; Taylor, P. C.; Rudolph, I. L.; Benito, P.; Nelson, G. J.;

Mackey, B. E., y Erickson, K. L.

(2000) Dietary conjugated linoleic acid did not alter immune status in young healthy women. *Lipids* 35, 1065-1071.

Kelly, G. S.

(2004) Bovine colostrums: A review of clinical uses. *Altern. Med. Rev.* 8, 378-394.

Kennedy, R. S.; Konok, G. P.; Bounous, G.; Baruchel, S., y Lee, T. D.

(1995) The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical trial study. *Anticancer Res.* 15, 2643-2649.

Kivinen, A.; Salminen, S.; Homer, D., y Vapaatalo, H.

(1992a) Gastroprotective effect of milk phospholipids, butter serum lipids and butter serum on ethanol and acetylsalicylic acid induced ulcers in rats. *Milch-wissenschaft* 47, 573-575.

Kivinen, A.; Tarpila, S.; Salminen, S., y Vapaatalo, H.

(1992b) Gastroprotection with milk phospholipids: a first human study. *Milch-wissenschaft* 47, 694-696.

Knuiman, J. T.; Beynen, A. C., y Katan, M. B.

(1989) Lecithin intake and serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 266-268.

Kolida, S.; Tuohy, K., y Gibson, G. R.

(2002) Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87, S193-S197.

Koopman, J. S.; Turkish, V. J.; Monto, A. S.; Thompson, F. E.,
e Isaacson, R. E.

(1984) Milk fat and gastrointestinal illness. *Am. J. Public Health* 74, 1371-1373.

Korhonen, H.; Marnila, P., y Gill, H. S.

(2000) Bovine milk antibodies for health. *Br. J. Nutr.* 84, Suppl 1, S135-S146.

Korhonen, H., y Pihlanto, A.

(2003) Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 129-134.

Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.;
Binkoski, A. E.; Hilpert, K. F.; Griel, A. E., y Etherton, T. D.

(2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113, 71S-88S.

Kruis, W.; Schutz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G., y Stolte, M.

(1997) Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11, 853-858.

Ksiazek, J.; Piena, M.; Kierkus, J., y Lyszowska, M.

(2002) Hydrolyzed versus nonhydrolyzed protein diet in short bowel syndrome in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35, 615-618.

Kuhara, T.; Iigo, M.; Itoh, T.; Ushida, Y.; Sekine, K.; Terada, N.; Okamura, H., y Tsuda, H.

(2000) Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-8 in intestinal epithelium. *Nutr. Cancer* 38, 192-199.

Kurzer, M. S.

(2003) Phytoestrogen supplement use by women. *J. Nutr.* 133, 1983S-1986S.

Kuwata, H.; Yip, T.-T.; Tomita, M., y Hutchens, W.

(1998) Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1429, 129-141.

Ladas, E. J.; Jacobson, J. S.; Kennedy, D. D.; Teel, K.; Fleischauer, A., y Kelly, K. M.

(2004) Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *J. Clin. Oncol.* 22, 517-528.

Laegreid, A.; Kolslo Otnaess, A.-B., y Fuglesang, J.

(1986) Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatr. Res.* 20, 416-421.

Lahov, E., y Regelson, W.

(1996) Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* 34, 131-145.

Lands, L. C.; Grey, V. L., y Smountas, A. A.

(1999) Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J. Appl. Physiol.* 87, 1381-1385.

Link-Amster, H.; Rochat, F.; Saudan, K. Y.; Mignot, O., y Aeschlimann, J. M.

(1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 55-64.

Lucassen, P. L.; Assendelft, W. J.; Gubbels, J. W.; Van Eijk, J. T., y Douwes, A. C.

(2000) Infantile colic: crying time reduction with a whey hydrolysate: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Pediatrics* 106, 1349-1354.

MacKay, D., y Miller, A. L.

(2003) Nutritional support for wound healing. *Altern. Med. Rev.* 8, 359-377.

Maier, S.; Reich, E.; Martin, R.; Bachem, M.; Altug, V.; Hautman, R. E., y Gschwend, J. E.

(2000) Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 88, 245-251.

Manso, M. A., y López-Fandiño, R.

(2004) κ -casein macropeptides from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Rev. Int.* 20, 329-355.

Manzoni, C.; Duranti, M.; Eberini, I.; Scharnag, H.; Marz, W.; Castiglioni, S., y Lovati, M. R.

(2003) Subcellular localization of soybean 7S globulin in HepG2 cells and LDL receptor up-regulation by its α' constituent subunit. *J. Nutr.* 133, 2149-2155.

Mares, J. A.

(2004) High-dose antioxidant supplementation and cataract risk. *Nutr. Rev.* 62, 28-32.

Markus, C. R.; Olivier, B., y De Haan, E. H.

(2002) Whey protein rich in alpha-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 1051-1056.

Markus, C. R.; Olivier, B.; Panhuysen, G. E.; Van der Gugten, J.; Alles, M. S.; Tuiten, A.; Westenberg, H. G.; Fekkes, D.; Koppeschaar, H. F., y De Haan, E. E.

(2000) The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduced cortisol concentration, and improves mood under stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1536-1544.

Marshall, K.

(2004) Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* 9, 136-156.

Marteau, P.

(2001) Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Nutr.* 45, 22-24.

- Marteau, P. R.; De Vrese, M.; Cellier, C. J., y Schrezenmeir, J.
(2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 430S-436S.
- Marteau, P.; Seksik, P., y Jian, R.
(2002) Probiotics and health: new facts and ideas. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 486-489.
- Martín-Diana, A. B.; Janer, C.; Peláez, C., y Requena, T.
(2004) Effect of milk fat replacement by polyunsaturated fatty acids on the microbiological, rheological and sensorial properties of fermented milks. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1599-1605.
- Masters, N.; McGuire, M. A.; Beerman, K. A.; Dasgupta, N., y McGuire, M. K.
(2002) Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. *Lipids* 37, 133-138.
- Matsumoto, H.; Shimokawa, Y.; Ushida, Y.; Toida, T., y Hayasawa, H.
(2001) New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1104-1111.
- Mattila-Sandholm, T.; Myllärinen, P.; Crittenden, R.; Mogensen, G.; Fondén, R., y Saarela, M.
(2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12, 173-182.
- McFarland, L. V.; Surawicz, C. M.; Greenberg, R. N.; Elmer, G. W.; Moyer, K. A.; Melcher, S. A.; Bowen, K. E., y Cox, J. L.
(1995) Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am. J. Gastroenterol.* 90, 439-448.
- McFarland, L. V.; Surawicz, C. M.; Greenberg, R. N.; Fekety, R.; Elmer, G. W.; Moyer, K. A.; Melcher, S. A.; Bowen, K. E.; Cox, J. L.; Noorani, Z., *et al.*
(1994) A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile*. *JAMA* 171, 1913-1918.
- McKevith, B.; Kelly, C.; Stanner, S.; Hughes, J., y Buttriss, J.
(2003) The Food Standards Agency's antioxidants in food programme - a summary. *J. Hum. Nutr. Dietet.* 16, 257-263.

Medina, E. A.; Horn, W. F.; Keim, N. L.; Havel, P. J.; Benito, P.; Kelley, D. S.; Nelson, G. J., y Erickson, K. L.

(2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* 35, 783-788.

Meisel, H.

(1997) Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43, 119-128.

Meisel, H.; Bernard, H.; Fairweather-Tait, S.; FitzGerald, R. J.; Hartmann, R.; Lane, C. N.; McDonagh, D.; Teucher, B., y Wal, J. M.

(2001) Nutraceutical and functional food ingredients for food and pharmaceutical applications. *Br. J. Nutr.* 85, 635.

(2003) Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br. J. Nutr.* 89, 351-359.

Meisel, H., y FitzGerald, R. J.

(2003) Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Design* 9, 1289-1295.

Meisel, H., y Frister, H.

(1988) Chemical characterization of a caseinophosphopeptide isolated from in vivo digests of a casein diet. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 1275-1279.

Mensink, R. P.; Ebbing, S.; Lindhout, M.; Plat, J., y Van Heugten, M. M.

(2002) Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis* 160, 205-213.

Messina, M. J., y Hughes, C.

(2003) Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency. *J. Med. Food* 6, 1-11.

Messina, M. J., y Loprinzi, C. L.

(2001) Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J. Nutr.* 131, 3095S-3108S.

Micke, P.; Beeh, K. M., y Buhl, R.

(2002) Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur. J. Nutr.* 41, 12-18.

Micke, P; Beeh, K. M.; Schlaak, J. F., y Buhl, R.

(2001) Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 171-178.

Miettinen, T. A., y Gylling, H.

(2004) Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases. *Ann. Med.* 36, 126-134.

Miettinen, T. A.; Puska, P.; Gylling, H.; Vanhanen, H., y Vartiainen, E.

(1995) Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N. Engl. J. Med.* 333, 1308-1312.

Mimura, T.; Rizzello, F.; Schreiber, S.; Talbot, I. C.; Nicholls, R.; Gionchetti, P.; Campieri, M., y Kamm, M.

(2002) Once daily dose probiotic therapy maintains remission and improved quality of life in patients with recurrent or refractory pouchitis: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 122, abstract 667.

Miyauchi, H.; Hashimoto, S.; Nakajima, M.; Shinoda, I.; Fukuwatari, Y., y Hayasawa, H.

(1998) Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell. Immunol.* 187, 34-37.

Møller, P., y Loft, S.

(2004) Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutation Research* 551, 79-89.

Mortensen, P. B., y Clausen, M. R.

(1996) Short chain fatty acids in human colon: relation to gastrointestinal health and diseases. *Scand. J. Gastroenterol.* 31 (suppl 216), 145-150.

Mougiou, V.; Matsakas, A.; Petridou, A.; Ring, S.; Sagredos, A.; Melissopoulou, A.; Tsigilis, N., y Nikolaidis, M.

(2001) Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem.* 12, 585-594.

Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S., y Takano, T.

(1995) Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 78, 777-7783.

New, S.

(2002) Nutritional aspects of bone health: current focus and future directions. A review of conferences in 2000/2001. *Nutr. Bull.* 27, 23-33.

Newmark, H. L., y Young, C. W.

(1995) Butyrate and phenylacetate as differentiating agents: practical problems and opportunities. *J. Cell Biochem.* 22, 247-253.

Nimmagudda, R.

(2002) New bioactive peptides for the nutritional industry. Presentación oral en SupplySide West Trade Show and Conference, Las Vegas, NV, 4-6 diciembre.

Normen, L.; Shaw, C. A.; Fink, C. S., y Awad, A. B.

(2004) Combination of phytosterols and omega-3 fatty acids: a potential strategy to promote cardiovascular health. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 2, 1-12.

Nowak-Wegrzyn, A.

(2003) Future approaches to food allergy. *Pediatrics* 111, 1672-1680.

Ntanios, F. Y., y Duchateau, G. S.

(2002) A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterol-enriched spreads. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72, 32-39.

Oakenfull, D., y Shidu, G. S.

(1990) Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *Eur. J. Clin. Nutr.* 44, 79-88.

Okada, S.; Tanaka, K.; Sato, T.; Ueno, H.; Saito, S.; Okusaka, T.; Sato, K.; Yamamoto, S., y Kakizoe, T.

(2002) Dose-response trial of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1063-1069.

Okhuysen, P. C.; Chappell, C. L.; Crabb, J.; Valdez, L. M.; Douglas, E. T., y DuPont, H. L.

(1998) Prophylactic effect of bovine anti-*Cryptosporidium* hyperimmune colostrum immunoglobulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*. *Clin. Infect. Dis.* 26, 1324-1329.

Oomen, C. M.; Feskens, E. J. M.; Rasanen, L.; Fidenza, F.; Nissinen, A. M.; Menotti, A.; Kok, F. J., y Kromholt, D.

(2000) Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy and the Netherlands. *Am. J. Epidemiol.* 151, 999-1006.

Ouwehand, A. C.; Salminen, S., e Isolauri, E.

(2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279-289.

Pariza, M. W.; Park, Y., y Cook, M. E.

(2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40, 283-298.

Parodi, P. W.

(1998) A role for milk proteins in cancer prevention. *Aust. J. Dairy Technol.* 53, 37-47.

(2002) Health effects of conjugated linoleic acid. *Food Ind. J.* 5, 222-259.

(2003) Anti-cancer agents in milkfat. *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 114-118.

(2004) Milk fat in human nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.* 59, 3-59.

Paroli, E.

(1988) Opioid peptides from food (the exorphins). *World Rev. Nutr. Diet.* 55, 58-97.

Penna, F. J.; Filho, L. A. P.; Calçado, A. C.; Junior, H. R., y Nicolli, J. R.

(2000) Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *Jornal de Pediatria* 76, S209-S217.

Penotti, M.; Fabio, E.; Modena, A. B.; Rinaldi, M.; Omodel, U., y Vigano, P.

(2003) Effect of soy derived isoflavones on hot flushes, endometrial tickness and the pulsatility index of the uterine and cerebral arteries. *Fertil-Steril* 79, 1112-1117.

Pereira, D. I., y Gibson, G. R.

(2002) Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4689-4693.

Petti, S.; Tarsitani, G., y Simonetti d'Arca, A.

(2001) A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Arch. Oral. Biol.* 46, 705-712.

Pins, J. J., y Keenan, J. M.

(2002) The antihypertensive effects of a hydrolysed whey protein isolate supplement (BioZate® 1). *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16, 68.

Playne, M. J.; Bennett, L. E., y Smithers, G. W.

(2003) Functional dairy foods and ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 242-264.

Priebe, M. G.; Vonk, R. J.; Sun, X.; He, T.; Harmsen, H. J. M., y Welling, G. W.

(2002) The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *Eur. J. Nutr.* 41, S2-S10.

Puska, P.; Korpelainen, V.; Høie, L. H.; Skovlund, E., y Smerud, K. T.

(2004) Isolated soya protein with standardised levels of isoflavones, cotyledon soya fibres and soya phospholipids improves plasma lipids in hypercholesterolaemia: a double-blind, placebo-controlled trial of a yoghurt formulation. *Br. J. Nutr.* 91, 393-401.

Quílez, J.; García-Lorda, P., y Salas-Salvadó, J.

(2003) Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.* 22, 343-351.

Rafter, J. J.

(2002) Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br. J. Nutr.* 88, S219-S224.

Rastall, R. A., y Maitin, V.

(2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 490-496.

Recio, I., y Visser, S.

(1999) Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 25-32.

Regester, G. O., y Belford, D. A.

(1999) New therapeutics from a dairy byproduct cheese whey. *Drug Develop. Res.* 46, 286-291.

Reid, G.

(2001) Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 437S-443S.

Renner, E.; Schaafsma, G, y Scott, K. J.

(1989) Micronutrients in milk. En Renner E., ed. *Micronutrients in Milk and Milk based Food Products*. New York, NY: Elsevier Applied Science, 1-60.

Reynolds, E. C.

(1998) Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides. A review. *J. Spec. Care Dent.* 18, 8-16.

(2003) Dairy components in oral health. *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 79-81.

Reynolds, E. C.; Cai, F.; Shen, P., y Walker, G. D.

(2003) Retention in plaque and remineralisation of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse of sugar-free chewing gum. *J. Dent. Res.* 82, 206-211.

Reynolds, E. C.; Cain, C. J.; Webber, F. L.; Black, C. L.; Riley, P. F.; Johnson, I. H., y Perich, J. W.

(1995) Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J. Dent. Res.* 74, 1272-1279.

Richelle, M.; Enslin, M.; Hager, C.; Groux, M.; Tavazzi, I.; Godin, J.-P.; Berger, A.; Métairon, S.; Quaille, S.; Piguet-Welsch, C.; Sagalowicz, L.; Green, H., y Fay, L. B.

(2004) Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of β -carotene and α -tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 171-177.

Riserus, U.; Arner, P.; Brismar, K., y Vessby, B.

(2002a) Treatment with dietary trans 10, cis 12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese man with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25, 1516-1521.

Riserus, U.; Basu, S.; Jovinge, S.; Fredrikson, G. N.; Amlov, J., y Vessby, B.

(2002b) Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein. *Circulation* 106, 1925-1929.

Riserus, U.; Berglund, L., y Vessby, B.

(2001) Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int. J. Obes.* 25, 1129-1135.

Roberfroid, M. B.

(2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, S406-S409.

(2002) Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87, S139-S143.

Roberts, A. K.; Chierici, R.; Sawatzki, G.; Hill, M. J.; Volpato, S., y Vigi, V.

(1992) Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect of the infant faecal flora. *Acta Paediatr.* 81, 119-124.

Roche, H. M.; Noone, E.; Nugent, A.; Sewter, C.; McBennett, S.;

Savage, D.; Gibney, M. J.; O'Rahilly, S., y Vidal-Puig, A. J.

(2001) Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid. *Diabetes* 51, 2037-2044.

Rosaneli, C. F.; Bighetti, A. E.; Antonio, M. A.; Carvalho, J. E., y Sgarbieri, V. C.

(2002) Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. *J. Med. Food* 5, 221-228.

Ruxton, C. H. S.; Reed, S. C.; Simpson, M. J. A., y Millington, K. J.

(2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Dietet.* 17, 449-459.

Saarela, M.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Mättö, J., y Mattila-Sandholm, T.

(2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197-215.

Saavedra, J. M.; Bauman, N. A.; Oung, I.; Perman, J. A., y Yolken, R. H.

(1994) Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344, 1046-1049.

Salminen, S.; Isolauri, E., y Salminen, E.

(1996) Clinical uses of probiotics for establishing the gut mucosal barrier. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 251-261.

Sanders, N. E., y Veld, J. H. in't

(1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 293-315.

Sanderson, P.; Olthof, M.; Grimble, R. F.; Calder, P. C.; Griffin, B. A.;
De Roos, N. M.; Belch, J. J.; Muller, D. P., y Vita, J. A.

(2004) Dietary lipids and vascular function: UK Food Standards Agency workshop report. *Br. J. Nutr.* 91, 491-500.

Scammell, A. W.

(2001) Production and uses of colostrum. *Aust. J. Dairy Technol.* 56, 74-82.

Schaafsma, G.

(1997) The Western diet with a special focus on dairy products. Brussels, Belgium: Institute Danone. Danone Chair Monograph 4, 69-79.

Schholz-Ahrens, K. E., y Scherezenmeir, J.

(2002) Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. *Br. J. Nutr.* 87, S179-S186.

Schmelzle, H.; Wirth, S.; Skopnik, H.; Radke, M.; Knol, J.; Bockler, H. M.;
Bronstrup, A.; Wells, J., y Fusch, C.

(2003) Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 36, 343-351.

Schrezenmeir, J., y De Vrese, M.

(2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 361S-364S.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN)

(2000) Management of early rheumatoid arthritis: A National Clinical Guideline. Report number 48, December.

See, D.; Mason, S., y Roshan, R.

(2002) Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers. *Immunol. Invest.* 31, 137-153.

Sekine, K.; Watanabe, E.; Nakamura, J.; Takasuka, N.; Kim, D. J.;
Asamoto, M.; Krutovskikh, V.; Baba-Toriyama, H.; Ota, T.; Moore, M. A.;
Masuda, M.; Sugimoto, H.; Nishino, H.; Kakizoe, T., y Tsuda, H.

(1997) Inhibition of azosymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 523-526.

Sekiya, S.; Kobayashi, Y.; Kita, E.; Imamura, Y., y Toyama, S.

(1992) Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers (en japonés). *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.* 45, 513-517.

Seppo, L.; Jauhainen, T.; Poussa, T., y Korpela, R.

(2003) A fermented milk high in bioactive peptides as a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 326-330.

Seppo, L.; Kerojoki, O.; Suomalainen, T., y Korpela, R.

(2002) The effect of *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension - a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 57, 124-127.

Setchell, K. D., y Lydeking-Olsen, E.

(2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 593S-609S.

Shen, P.; Cai, F.; Nowicki, A.; Vincent, J., y Reynolds, E. C.

(2001) Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J. Dent. Res.* 80, 2066-2070.

Silva, M. F. D.; Burgess, R. C.; Sandham, H. J., y Jenkins, G. N.

(1987) Effects of water soluble components of cheese on experimental caries in humans. *J. Dent. Res.* 66, 38-41.

Silva, S. V., y Malcata, X.

(2005) Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* (15, 1-15).

Simmer, K.

(2003a) Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants (Cochrane Review). In *The Cochrane Library*, Issue 4. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd.

(2003b) Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants at term (Cochrane Review). In *The Cochrane Library*, Issue 4. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd.

Singh, M.; Rosen, C. L.; Chang, K., y Haddad, G. G.

(1989) Plasma β -casomorphin-7 immunoreactive increases after milk intake in newborn but not in adult dogs. *Pediatr. Res.* 26, 34-38.

Smithers, G. W.; Ballard, F. J.; Copeland, A. D.; De Silva, K. J.; Dionysius, D. A.; Francis, G. L.; Goddard, C.; Grieve, P. A.; McIntosh, G. H.; Mitichell, I. R.; Pearce, R. J., y Regester, G. O.

(1996) New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 79, 1454-1459.

Sprong, C.; Hulstein, M., y Van der Meer, R.

(1998) Phospholipids-rich butter milk decreases the gastro-intestinal survival and traslocation of *Listeria* in rats. *Gastroenterology* 114, A10090.

Sprong, R. C.; Hulstein, M. F. E., y Van der Meer, R.

(1999) High intake of milk fat inhibits intestinal colonization of listeria but not of salmonella in rats. *J. Nutr.* 129, 1382-1389.

Stanner, S. A.; Hughes, J.; Kelly, C. N. M., y Buttriss, J.

(2004) A review of the epidemiological evidence for the “antioxidant hypothesis”. *Public Health Nutrition* 7, 407-422.

Sun, C. Q.; O'Connor, J. O.; Turner, S. J.; Lewis, G. D.; Stanley, R. A., y Robertson, A. M.

(1998) The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: Implications for neonates fed on suckled milk. *Chemico-Biol. Interactions* 113, 117-131.

Sun, J.

(2003) Morning/evening menopausal formula relieves menopausal symptoms: A pilot study. *J. Altern. Complement. Med.* 9, 403-409.

Sun, Z.; Zhang, Z.; Wang, X.; Cade, R.; Elmir, Z., y Fregly, M.

(2003) Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides* 24, 937-943.

Surawicz, C. M.; Elmer, G. W.; Speelman, P.; McFarland, L. V.; Chinn, J., y Van Belle, G.

(1989) Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 96, 981-988.

Svedberg, J.; De Haas, J.; Leimenstoll, G.; Paul, F., y Teschemacher, H.

(1985) Demonstration of β -casomorphin immunoreactive material in *in vitro* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6, 825-830.

Tagg, J. R., y Dierksen, K. P.

(2003) Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. *Trends Biotechnol.* 21, 217-223.

Tanaka, K.; Ikeda, M.; Nozaki, A.; Kato, N.; Tsuda, H.; Saito, S., y Sekihara, H.

(1999) Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 367-371.

Tapiero, H.; Townsend, D. M., y Tew, K. D.

(2003) Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 57, 321-325.

Tenouvuuo, J.

(2002) Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Diseases* 8, 23-29.

Teschemacher, H.

(1987) Casein derived opioid peptides: physiological significance? *Adv. Biosci.* 65, 41.

Teschemacher, H.; Umbach, M.; Hamel, U.; Praetorius, K.;

Ahnert-Hilger, G., y Brantl, V.

(1986) No evidence for the presence of β -casomorphins in human plasma after ingestion of cow's milk or milk products. *J. Dairy Res.* 53, 135-138.

Thom, E.; Wadstein, J., y Gudmundsen, O.

(2001) Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J. Int. Med. Res.* 29, 392-396.

Thomsen, A. B.; Hansen, H. B.; Christiansen, C.; Green, H., y Berger, A.

(2004) Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 860-870.

Toba, Y.; Takada, Y.; Matsuoka, Y.; Morita, Y.; Motouri, M.; Hirai, T.;

Suguri, T.; Aoe, S.; Kawakami, H.; Kumegawa, M.; Takeuchi, A., e Itabashi, A.

(2001) Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1353-1357.

Topping, D. L.; Fukushima, M., y Bird, A. R.

(2003) Resistant starch as prebiotic and synbiotic: state of the art. *Procc. Nutr. Soc.* 62, 177-182.

Tsuda, H.; Sekine, K.; Nakamura, J.; Ushida, Y.; Kuhara, T.; Takasuka, N.; Kim, D. J.; Asamoto, M.; Baba-Toriyama, H.; Moore, M. A.; Nishino, H., y Kakizoe, T.

(1998) Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443, 273-284.

Tucker, K. L.

(2003) Dietary intake and bone status with aging. *Curr. Pharm. Design* 32, 2687-2704.

Tuohy, K. M.; Probert, H. M.; Smejkal, C. W., y Gibson, G. R.

(2003) Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov. Today* 8, 692-700.

Tuomola, E.; Crittenden, R.; Playne, M.; Isolauri, E., y Salminen, S.

(2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, S393-S398.

Ueda, M.; Niho, N.; Imai, T.; Shibutani, M.; Mitsumori, K.; Matsui, T., y Hirose, M.

(2003) Lack of significant effects of genistein on the progression of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Nutr. Cancer* 47, 141-147.

Umbach, M.; Teschemacher, H.; Praetorius, K.; Hirschäuser, R., y Bostedt, H.

(1985) Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul. Pept.* 12, 223-230.

Van Hooijdonk, A. C.; Kussendrager, K. D., y Steijns, J. M.

(2000) *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutr.* 84, S127-S134.

Vandenplas, Y.

(2002) Oligosaccharides in infant formula. *Br. J. Nutr.* 87, S293-S296.

Vega-López, S.; Devaraj, S., y Jialal, I.

(2004) Oxidative stress and antioxidant supplementation in the management of diabetic cardiovascular disease. *J. Investig. Med.* 52, 24-32.

Volpe, R.; Niittynen, L.; Korpela, R.; Sirtori, C.; Bucci, A.; Fraone, N., y Pazzucconi, F.

(2001) Effects of yoghurt enriched with plant sterols on serum lipids in patients with moderate hypercholesterolaemia. *Br. J. Nutr.* 86, 233-239.

Voorrips, L. A.; Brants, H. A. M.; Kardinaal, A. F. M.; Hiddink, G. J.; Van den Brandt, P. A., y Goldbohm, R. A.

(2000) Intake of conjugated linoleic acid, fat and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 873-882.

Wainwright, P. E.

(2002) Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 61-69.

Walzem, R. L.; Dillard, C. J., y German, J. B.

(2002) Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 353-375.

Watanabe, A.; Okada, K.; Shimizu, Y.; Wakabayashi, H.; Higuchi, K.; Niiya, K.; Kuwabara, Y.; Yasuyama, T.; Ito, H.; Tsukishiro, T.; Kondoh, Y.; Emi, N., y Kohri, H.

(2000) Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non-treated). *J. Med.* 31, 283-302.

Wei, H.; Loimaranta, V.; Tenovuo, J.; Rokka, S.; Syvaoja, E. L.; Korhonen, H.; Joutsjoki, V., y Marnila, P.

(2002) Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* strain GG or treated at ultra-high temperature. *Oral. Microbiol. Immunol.* 17, 9-15.

Weinberg, E. D.

(1996) The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 19-36.

Williams, C. M., y Jackson, K. G.

(2002) Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. *Br. J. Nutr.* 87, S261-S264.

Wollowski, I.; Rechkemmer, G., y Pool-Zober, B. L.

(2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 451S-455S.

Wolter, F., y Stein, J.

(2002) Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in Caco-2 colon cancer cells. *J. Nutr.* 132, 2028-2086.

**Yamamura, J.; Aoe, S.; Toba, Y.; Motouri, M.; Kawakami, H.;
Kumegawa, M.; Itabashi, A., y Takada, Y.**

(2002) Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 702-704.

Yanagi, S.; Yamashita, M., e Imai, S.

(1993) Sodium butyrate inhibits the enhancing effect of high fat diet on mammary tumorigenesis. *Oncology* 50, 201-204.

Zambell, K. L.; Horn, W. F., y Keim, N. L.

(2001) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on fatty acid and glycerol kinetics. *Lipids* 36, 767-772.

**Zambell, K. L.; Keim, N. L.; Van Loan, M. D.; Gale, B.; Bennito, P.;
Kelley, D. S., y Nelson, G. J.**

(2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans. Effect on body composition and energy expenditure. *Lipids* 35, 777-782.

Zemel, M. B.

(2003) Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J. Nutr.* 133, 252S-256S.

III. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales

Juan Carlos Espín y Francisco A. Tomás-Barberán

Grupo de Investigación en Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales, CEBAS (CSIC)

III.1. Introducción

III.2. Radicales libres y envejecimiento

Enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares

Cáncer

Enfermedades neurodegenerativas

III.3. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal

Polifenoles

Flavonoles (quercetina) y flavonas

Flavan-3-oles (procionidinas)

Isoflavonas

Estilbenos (resveratrol)

Hidroxitirosol

Ácido elágico y elagitaninos

Consideraciones globales sobre el metabolismo y la biodisponibilidad de los polifenoles

Terpenoides

Carotenoides

Fitosteroles

Compuestos azufrados

Glucosinolatos (Brassicaceas)

Compuestos azufrados de las Alliaceas

III.4. Relevancia de la biodisponibilidad y el metabolismo

Absorción y distribución en tejidos

Concepto de bioaccesibilidad

Biodisponibilidad y metabolismo

III.5. Factores que afectan al contenido cuali y cuantitativo de sustancias fitoquímicas

III.6. Estrategias para la elaboración de alimentos funcionales

Mejora del contenido o perfil de compuestos potencialmente bioactivos

Mejora de la biodisponibilidad

Mejora de la bioactividad

III.7. Conclusiones

III.8. Bibliografía

III.1. Introducción

En los últimos años ha ido surgiendo evidencia científica que apoya la relación que existe entre la alimentación y la salud. Esta relación ya era conocida desde la Grecia clásica, en la que Hipócrates, 500 años antes de Cristo, ya hizo pública su conocida máxima en la que recomendaba “que vuestra medicina sea vuestro alimento, y que vuestro alimento sea vuestro medicamento”. La evidencia científica incluye desde estudios epidemiológicos de distinto tipo y magnitud, dirigidos a diferentes grupos de población y evaluando el consumo de diferentes alimentos y patrones de hábitos alimentarios, hasta estudios de actividad biológica de determinados alimentos o sus constituyentes, en estudios *in vitro*, en animales modelo, o de intervención clínica. Por desgracia, estos últimos son los menos numerosos y se está haciendo actualmente hincapié en la necesidad de investigación clínica para completar aquellas lagunas que todavía existen y explicar las incongruencias y discrepancias que se observan entre diferentes estudios *in vitro* sobre el papel de los constituyentes de los alimentos en el mantenimiento de la salud. En los últimos años, el desarrollo de la metodología genómica está abriendo nuevas expectativas en este tema en el marco de lo conocido como Nutrigenómica.

Los efectos beneficiosos para la salud de los alimentos de origen vegetal en general, y de las frutas y hortalizas en particular, se han puesto de manifiesto por diferentes estudios epidemiológicos. Las bondades de la dieta mediterránea, rica en productos de la huerta y que además incluye vino y aceite de oliva, también han sido objeto de reconocimiento.

En un estudio en el que se revisaban las conclusiones de más de 160 estudios epidemiológicos sobre el efecto del consumo de frutas y hortalizas en la incidencia de diferentes tipos de cáncer, se concluyó que de una forma general se observa una disminución en la incidencia de la mayoría de los tipos de cáncer, y sobre todo los epiteliales, con un mayor consumo de frutas y hortalizas (Steinmetz y Potter, 1996). El cúmulo de evidencia en este sentido ha hecho que instituciones como la Organización Mundial de la Salud recomienden el consumo diario de al menos cinco raciones de frutas y hortalizas variadas para mejorar la salud, y asociaciones como la conocida como “5 al día” desarrollen campañas animando a cumplir esta recomendación. Aparte de las frutas, hortalizas y frutos secos, otros alimentos de origen vegetal tienen también la “etiqueta” de saludables, y entre ellos debemos mencionar los cereales integrales, las legumbres, el aceite de oliva virgen extra, el vino tinto, el cacao y el té.

Las propiedades beneficiosas para la salud que ejercen estos alimentos superan las que cabría esperar por sus nutrientes, vitaminas y sales minerales, por lo que se ha hi-

potetizado que estas propiedades beneficiosas adicionales se deban a los metabolitos secundarios que contienen estos alimentos, para los que se han demostrado diferentes actividades biológicas. Entre estas propiedades, la antioxidante ha sido la que ha recibido más interés, pues los procesos oxidativos son el origen de muchas enfermedades como las cardiovasculares, el cáncer y las neurodegenerativas (ver más adelante), cuya incidencia y virulencia puede verse disminuida gracias al consumo de alimentos de origen vegetal.

Estos efectos sólo tienen reflejo en la fisiología cuando forman parte de un hábito alimentario que hace que se ingieran estas sustancias durante un largo periodo de tiempo, cuando los síntomas de la enfermedad que ayudan a combatir todavía no han aparecido (Dragsted *et al.*, 1993). Esto se debe a que se trata de moléculas con relativamente baja actividad biológica, sobre todo cuando se comparan con fármacos, lo que dificulta considerablemente probar su actividad en experimentos que se lleven a cabo durante periodos limitados de tiempo, como es el caso de la mayoría de los experimentos farmacológicos. Para estudiar esta actividad, que sólo se hace evidente a largo plazo, es necesario recurrir a estudios de tipo epidemiológico, como los que ya se han mencionado.

Los principales metabolitos secundarios de estos alimentos, también denominados sustancias fitoquímicas o fitonutrientes, se pueden agrupar en tres grandes familias: los compuestos fenólicos (o polifenólicos) los terpénicos y los azufrados (figura 1). Muchos de éstos muestran, además de otras actividades, una actividad antioxidante *in vitro* que en algunos casos es incluso superior que la de las vitaminas antioxidantes, como la vitamina C y la vitamina E. Esto ha hecho que se haya correlacionado la actividad antioxidante de estos alimentos con sus propiedades beneficiosas para la salud, y de hecho una gran cantidad de artículos de investigación sobre la actividad antioxidante de distintos alimentos, y los efectos del procesado y conservación sobre los mismos, han sido publicados en los últimos años.

Aprovechando esta tendencia, es fácil encontrar distintos alimentos, especialmente en el mercado de Estados Unidos y Japón, que alegan en su publicidad y etiquetado afirmaciones respecto a su actividad antioxidante y su comparación con otros alimentos con una reconocida reputación como antioxidantes, como es el caso del vino tinto y del té verde. Entre los alimentos que han utilizado la alegación antioxidante se pueden encontrar determinados zumos, como es el de granada (ver más adelante) y el de arándano; frutos secos, como es el caso de las ciruelas pasas, y otros alimentos como el chocolate o el té. Alegaciones como “el superpoder antioxidante”, “el mejor destruyendo radicales libres”, etc., son frecuentes en alimentos de Estados Unidos y Japón. Sin embargo, la actividad antioxidante *in vivo* de estos alimentos no ha sido demostra-

da, y de hecho muchos de los compuestos antioxidantes de los alimentos son metabolizados *in vivo* a metabolitos que carecen de capacidad captadora de radicales libres, pero que pueden poseer otras actividades que actualmente pueden ser insospechadas (ver más adelante).

En el presente capítulo se pretende realizar una descripción de los principales constituyentes “bioactivos” de los alimentos de origen vegetal que ya están siendo utilizados en la elaboración de alimentos funcionales o que pueden llegar a ser utilizados en el futuro próximo. También se quieren evaluar críticamente lo que se conoce respecto a su metabolismo y biodisponibilidad, evidencias sobre actividad biológica y necesidades de investigación para apoyar alegaciones sobre la salud de alimentos funcionales que pudieran desarrollarse atendiendo al contenido en estas sustancias saludables.

Para ello se indicará en los siguientes aspectos:

- 1) Naturaleza química de estos metabolitos (¿qué son?).
- 2) Su distribución en distintos alimentos o productos vegetales (¿dónde se encuentran principalmente?).
- 3) Su actividad biológica (¿para qué sirven?).
- 4) Su biodisponibilidad y metabolismo (¿qué les pasa cuando se ingieren?).

Estos cuatro puntos son relevantes cuando se considera la posibilidad de elaboración de alimentos funcionales que contengan este tipo de metabolitos con actividad biológica, pues es necesario conocer la naturaleza química de estos compuestos, sus posibilidades de extracción y estabilidad en los alimentos, cuáles son las principales fuentes de estos compuestos con actividad biológica y que podrían ser utilizados como ingredientes de alimentos funcionales, qué tipo de alegaciones se podrían hacer cuando se demuestre debidamente en estudios clínicos específicos para cada alimento determinado, y de qué forma la elaboración del alimento funcional, los ingredientes que lo acompañan y su presentación pueden afectar al metabolismo y biodisponibilidad de los principios activos en estos alimentos.

III.2. Radicales libres y envejecimiento

Como ya se ha mencionado, detrás de muchas enfermedades crónicas, cuya aparición es retrasada y su gravedad disminuida por el consumo de alimentos de origen vegetal, se encuentran procesos de estrés oxidativo mediados por radicales libres.

El estrés oxidativo conduce progresivamente a una disfunción celular que acaba con la muerte de dichas células. Este estrés se podría definir como un desequilibrio entre los pro-oxidantes y/o radicales libres, por una parte, y los sistemas antioxidantes del organismo, por otra.

El oxígeno, que es necesario para la vida, es también indirectamente responsable de muchos efectos negativos. Éstos son debidos a la producción de las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS en inglés), que son tóxicas para las células, y entre las que se encuentran el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peroxilo, el peróxido de hidrógeno, los hidroperóxidos y peroxinitritos. Estas especies de oxígeno reactivas, incluidos los radicales libres, son responsables del daño celular que se podría producir indirectamente por procesos oxidativos sobre ácidos grasos insaturados, proteínas y ADN. Los sistemas de defensa del organismo incluyen a determinadas enzimas y a los neutralizadores (captadores) de radicales libres. Los últimos son moléculas fácilmente oxidables. Los sistemas neutralizadores de los radicales libres incluyen a las vitaminas (E y C), las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.) y otros captadores de radicales no-vitamínicos de la dieta, entre los que destacan los polifenoles. La eficacia de este sistema depende de factores relacionados con el genoma del individuo, como es el caso de los sistemas enzimáticos de defensa, y de la nutrición para los captadores de radicales libres de naturaleza vitamínica o no-vitamínica.

Los estudios epidemiológicos sugieren que los antioxidantes de la dieta pueden tener un efecto beneficioso en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como son arteriosclerosis, cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas e incluso enfermedades respiratorias (Shaheen *et al.*, 2002).

Debido a la carencia actual de suficientes datos, no se puede efectuar una recomendación sistemática del consumo de antioxidantes. Sin embargo, las dietas ricas en antioxidantes que incluyen abundantes frutas y hortalizas y alimentos derivados sí que parecen un hábito alimentario saludable que debería recomendarse (Bonefoy *et al.*, 2002).

Enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares

Durante el último cuarto de siglo, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos en un intento de evaluar el efecto de los hábitos dietéticos en el desarrollo y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Estos estudios han examinado la dieta de individuos en la década de los sesenta y han registrado la mortalidad por infarto de miocar-

dio durante los 25 años siguientes. En uno de estos estudios, utilizando técnicas analíticas modernas, se ha evaluado el promedio de la ingesta de flavonoides y otras sustancias fenólicas en 16 grupos que participaban en el conocido como Estudio de los Siete Países. Se encontró que la ingesta de flavonoides estaba inversamente asociada a la mortalidad por infarto de miocardio (Hertog *et al.*, 1995). Además, se llevaron a cabo varios estudios prospectivos sobre poblaciones concretas en las que se estudió el efecto de la dieta en las enfermedades coronarias y cerebrovasculares. Cuatro de ellos iban dirigidos a las enfermedades coronarias y se llevaron a cabo con poblaciones de Holanda (Hertog *et al.*, 1993), EE.UU. (Rimm *et al.*, 1996), Reino Unido (Hertog *et al.*, 1997) y Finlandia (Knekt *et al.*, 1996), y uno sobre enfermedades cerebrovasculares en Holanda (Keli *et al.*, 1996). En algunos de estos estudios se encontró un fuerte efecto protector de los polifenoles del grupo de los flavonoides frente a estas enfermedades, pero en otros el efecto fue menos significativo o incluso negativo, como en el caso del estudio británico (Hertog *et al.*, 1997). Estas discrepancias pueden ser debidas, entre otros factores, a defectos en los métodos de evaluación de la ingesta de flavonoides y otros polifenoles en estos estudios, las variedades de frutas y hortalizas ingeridas y diferencias con las analizadas, y efecto de tratamientos de postrecolección y cocinado, biodisponibilidad y metabolismo por bacterias del colon, etc. (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

La modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se cree que tiene un papel crucial en la aterogénesis, y estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de frutas y hortalizas, y el consumo regular y moderado de vino tinto, se correlacionan con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Renaud y De Lorgeril, 1992).

En un estudio reciente se ha confirmado que las personas con mayor ingesta de quercetina (un flavonol muy abundante en cebollas, pero también presente en manzanas, té, vino y muchas otras frutas y hortalizas) tienen menor tasa de mortalidad por infarto de micocardio, y la incidencia de enfermedades cerebrovasculares fue menor en aquellas personas con un mayor consumo de kaempferol (abundante en brócoli y en muchas frutas y hortalizas), naringenina y hesperetina (muy abundantes en cítricos) (Knekt *et al.*, 2002).

Otros estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto una relación directa entre el consumo de té y las enfermedades cardiovasculares. En estos casos también se ha hipotetizado que los efectos antioxidantes de los flavonoides del té, que podrían incluir la prevención del daño oxidativo del LDL, están entre los mecanismos potenciales que pudieran estar detrás de este efecto protector (Kris-Etherton y Keen, 2002). Otros posibles mecanismos que se han sugerido para explicar estos efectos beneficiosos inclu-

yen la atenuación de los procesos inflamatorios en la aterosclerosis, una reducción de la trombosis, una promoción de una función normal del endotelio y un bloqueo de la expresión de las moléculas que controlan la adhesión celular (Tomás-Barberán, 2003). Los flavonoides del chocolate (flavan-3-oles) también tienen un efecto antioxidante *in vitro* e *in vivo*; aumentando la capacidad antioxidante del plasma y la reactividad de las plaquetas. Los datos disponibles parecen indicar que 150 mg de estos flavonoides (cantidad presente en una taza de té de 235 mL hervida durante 2 minutos) son suficientes para producir un rápido efecto antioxidante en el plasma y cambios en la prostaciclina *in vivo* (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Sin embargo, las evidencias sobre el papel de los flavonoides en la prevención de enfermedades cardiovasculares son todavía motivo de conflicto. En un estudio reciente se ha estudiado la asociación entre la ingesta de flavonoides del té y la incidencia de infarto de miocardio en la población holandesa. Los resultados han indicado que la ingesta de flavonoides (quercetina + kaempferol + miricetina) está inversamente asociada con el infarto de miocardio fatal sólo cuando se comparan los individuos de mayor ingesta con los de menor ingesta. En este estudio se concluye que una mayor ingesta de flavonoides puede contribuir a la prevención primaria de las enfermedades cardíacas isquémicas (Geleijnse *et al.*, 2002).

Cáncer

En una revisión realizada por Steinmetz y Potter (1996) sobre datos procedentes de más de 160 estudios epidemiológicos, se ponía de manifiesto que un mayor consumo de frutas y hortalizas estaba relacionado con una menor incidencia de determinados tipos de cáncer, entre los que se incluían los de estómago, esófago, pulmón, cavidad oral y faringe, endometrio, páncreas y colon. Además, en este estudio también se concluye que un mayor consumo de frutas y hortalizas tendría también efectos beneficiosos sobre otras patologías, como son las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la trombosis cerebral, la obesidad, la diverticulosis y las cataratas. De acuerdo con este estudio, las hortalizas con mayor relevancia en este efecto protector serían las que se consumen crudas, seguidas por ajos y cebollas, coles, coliflores y brócoli, tomates y fruta en general. Entre los componentes de estos alimentos que podrían contribuir al eventual efecto protector se citan: los polifenoles en general, isotiocianatos, indol-3-carbinol (originados a partir de los glucosinolatos), compuestos azufrados de ajos y cebollas (aliína y alicina), isoflavonas, vitamina C, limoneno, luteína, β -caroteno, licopeno, vitamina E, ácido fólico y fibra dietética.

Los mecanismos a través de los que las sustancias fitoquímicas de los alimentos ejercerían su actividad anticarcinógena y preventiva de enfermedades no están aún definitivamente establecidos en la mayoría de los casos. En estudios de laboratorio o con animales de experimentación se han podido poner de manifiesto efectos y actividades biológicas muy variados, como cabe esperar para un grupo tan amplio y diverso de estructuras químicas. Así, hay sustancias que poseen propiedades antioxidantes y neutralizadoras de radicales libres, otras que influyen sobre los procesos de diferenciación celular, aumentan la actividad de enzimas relacionadas con la destoxificación de carcinógenos (enzimas de Fase II), bloquean la formación de nitrosaminas cancerígenas, actúan modulando la actividad y el metabolismo de los estrógenos, modifican el medio colónico (flora bacteriana, composición de ácidos biliares, pH, volumen fecal), preservan la integridad de las células, ayudan a mantener los mecanismos de reparación del ADN, aumentan la apoptosis (muerte celular programada) de las células cancerígenas o disminuyen la proliferación celular (Tomás-Barberán, 2003).

Las flavonas y las isoflavonas pueden jugar un papel destacado en la prevención del cáncer, ya que se encuentran en numerosos alimentos de origen vegetal que se asocian con tasas de cáncer reducidas. Esta aproximación ha sido especialmente útil en el caso de las isoflavonas, ya que se encuentran en especial abundancia en un número reducido de alimentos, y principalmente en los derivados de la soja. Se han identificado muchos posibles mecanismos de acción para estos flavonoides en la prevención del cáncer, que incluyen la actividad estrogénica/antiestrogénica, antiproliferativa, inducción del bloqueo del ciclo celular de las células cancerosas en una fase determinada y apoptosis, prevención de la oxidación, inducción de las enzimas de detoxificación (enzimas de Fase I y Fase II), regulación del sistema inmune y cambios en la señalización celular (Birt *et al.*, 2001). Se podría esperar que una combinación de estos mecanismos pueda ser la responsable del carácter preventivo del cáncer que tienen estos compuestos. Hay muchos estudios recientes que indican que las flavonas e isoflavonas contribuyen a la prevención del cáncer, aunque es necesario llevar a cabo investigaciones que clarifiquen la naturaleza del impacto e interacciones de estos constituyentes bioactivos con otros componentes de la dieta (Birt *et al.*, 2001).

En este sentido, en un trabajo reciente en el que se han seguido las enfermedades crónicas de 10.054 personas en Finlandia, se ha puesto de manifiesto que los hombres con una mayor ingesta de quercetina tenían una menor incidencia de cáncer de pulmón y los que ingerían más miricetina tenían menos incidencia de cáncer de próstata (Knekt *et al.*, 2002).

Muchos flavonoides e isoflavonoides poseen actividad estrogénica o antiestrogénica (Miksicek *et al.*, 1995), lo que supone que pueden tener un papel en la prevención de

la osteoporosis, mejorando los síntomas de la menopausia y disminuyendo los niveles de colesterol sérico, mediante mecanismos relacionados con esta actividad estrogénica. Muchas de estas sustancias pueden competir con las hormonas endógenas a través de una unión competitiva con los receptores estrogénicos, lo que podría ser de interés en la inhibición del desarrollo de tumores estrógeno-dependientes.

Otros polifenoles actúan inhibiendo la proliferación celular que se encuentra completamente des-regulada en los casos de cáncer. Esta inhibición de la proliferación ha sido demostrada *in vitro* en muchas líneas celulares tumorales. Por ejemplo, Kuo (1996) publicó el efecto antiproliferativo de los flavonoides sobre células de carcinoma de colon a través de mecanismos de inducción de la apoptosis. Aunque los efectos antiproliferativos de los polifenoles en general, y flavonoides e isoflavonoides en particular, en cultivos celulares parece bien demostrado, existen relativamente pocos datos en relación con la actividad antiproliferativa *in vivo*, y no se conoce prácticamente nada de la relevancia clínica de esta bioactividad (Birt *et al.*, 2001).

Este efecto antiproliferativo sugiere que los polifenoles pudieran tener un efecto regulando el ciclo celular o induciendo apoptosis en la células tumorales. De hecho, muchos trabajos están demostrando el efecto que tienen los polifenoles sobre el ciclo celular de células tumorales en cultivos *in vitro*. Esto ha sido demostrado en células de varios tipos de leucemia, cáncer de estómago, de pulmón, de colon, de vejiga, de próstata (Birt *et al.*, 2001) y de melanoma (Larrosa *et al.*, 2003a, 2004).

Los polifenoles también pueden proteger frente al cáncer mediante su inhibición del daño oxidativo del ADN (Omenn, 1995), oxidación que parece ser una importante causa de mutaciones que potencialmente podría ser reducida por los antioxidantes de la dieta. Los polifenoles, por su actividad antioxidante, que ha sido ampliamente demostrada *in vitro*, podrían prevenir esta oxidación si alcanzan aquellos tejidos donde estas oxidaciones se pueden producir. De nuevo, relativamente pocos datos han sido publicados sobre su papel *in vivo*.

Otro mecanismo para evitar la carcinogénesis es mediante la activación de las enzimas de detoxificación de carcinógenos, como es el caso de las enzimas de Fase II (Tallalay *et al.*, 1995). En otros casos, las enzimas conocidas como de Fase I lo que originan es la transformación de procarcinógenos para dar lugar a carcinógenos. La opinión actual de los científicos sugiere que las condiciones óptimas para la prevención de la activación del carcinógeno conllevaría una inhibición del metabolismo de Fase I que lleva a la activación de carcinógenos, a la vez que una activación de las enzimas de Fase II.

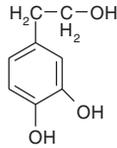
Enfermedades neurodegenerativas

Estudios de laboratorio sugieren que el estrés oxidativo puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, se ha hipotetizado que el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer podría reducirse por el consumo de antioxidantes que contrarresten el efecto negativo del estrés oxidativo. En este sentido se han llevado a cabo estudios epidemiológicos, como es el caso del conocido como “Estudio de Róterdam”, para evaluar el efecto de la dieta en la prevención de enfermedades neurodegenerativas y la demencia senil. En este caso se ha seguido a 5.395 individuos durante la década de los noventa y se ha estudiado si existe alguna relación entre la dieta y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, especialmente siguiendo el efecto de consumo de antioxidantes como es el caso de las vitaminas C y E el beta-caroteno y los flavonoides. En este estudio, un mayor consumo de vitaminas C y E fue asociado con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, y esta relación fue incluso más pronunciada en el caso de fumadores, y también se observó en el caso de beta-caroteno y flavonoides (Engelhart *et al.*, 2002). Sin embargo, en otro estudio epidemiológico llevado a cabo en EE.UU. se ha encontrado que sólo la vitamina E, pero no la C ni el beta-caroteno, se puede asociar con una reducción del riesgo de Alzheimer (Morris *et al.*, 2002). Es necesario realizar más investigaciones en este sentido para poder demostrar si los antioxidantes de la dieta pueden ejercer un efecto real en la prevención de las enfermedades neurodegenerativas.

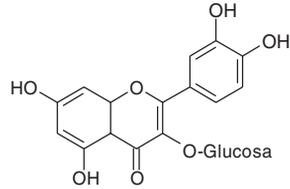
III.3. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal

Los principales constituyentes fitoquímicos de interés se pueden agrupar en sustancias polifenólicas o **polifenoles**, **terpenoides** y **compuestos azufrados** (figura 1). De todos los que se describirán aquí, sólo las isoflavonas de la soja y los fitosteroles (particularmente los estanoles) están siendo actualmente empleados en la elaboración de alimentos funcionales comercializados en España. Muchos otros de estos compuestos son los principios activos de extractos que se comercializan como suplementos o productos dietéticos dentro de lo que se consideraría como nutraceuticos, pero que serán susceptibles de formar parte en el futuro como ingredientes de alimentos funcionales, de la misma forma que ya se encuentran en otros países.

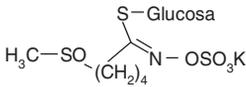
Figura 1 Ejemplos de algunos metabolitos bioactivos de las principales familias de metabolitos secundarios vegetales (polifenoles, terpenoides y compuestos azufrados)



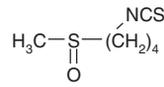
Hidroxitirosol
(aceituna, aceite de oliva...)



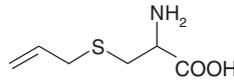
Flavonol
(quercetina-3-glucósido: uva, cebolla...)



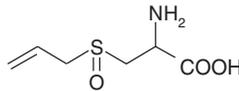
Glucosinolato
(glucorafanina: brócoli, coliflor...)



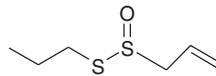
Isotiocianato
(sulforafano: brócoli, coliflor...)



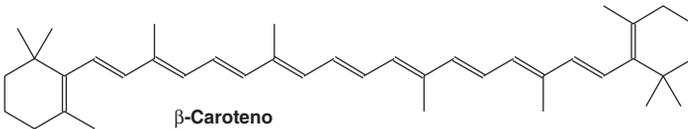
S-Alil-cisteína (SAC)



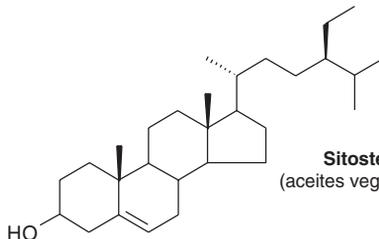
Aliína (azufrados: ajo, cebolla, puerro...)



Alicina



β-Caroteno
(zanahoria, espinaca, etc.)



Sitosterol
(aceites vegetales)

Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias con estructuras diversas (figura 2), desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados (figura 3). Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica. Los flavonoides, con estructura básica C₆-C₃-C₆, incluyen a las antocianinas, los flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles (figura 2). Otro subgrupo importante es el de los fenilpropanoides, que incluye a los derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico). También tienen importancia los estilbenoides (resveratrol y piceatanol) y los derivados del benzoico (ácido gálico y elágico, etc.). Tan sólo de flavonoides se conocían más de 5.000 compuestos diferentes en la naturaleza en el año 1994 (Harborne, 1994), cantidad que se ha incrementado considerablemente en la última década.

Muchos compuestos fenólicos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y, por tanto, tienen importancia en la calidad de los mismos (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Así, entre éstos hay pigmentos como las antocianinas, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos característicos de muchas frutas (fresas, ciruelas, uvas, etc.), hortalizas (berenjena, lombarda, rábano, etc.) y del vino tinto, o los flavonoles, de tonalidad crema-amarillenta, que están presentes principalmente en las partes externas de frutas y hortalizas (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). Hay polifenoles que tienen sabor amargo, como determinadas flavanonas de los cítricos (naringina de los pomelos, neohesperidina de las naranjas amargas) o la oleuropeína, presente en aceitunas. Las proantocianidinas (taninos condensados) y los taninos hidrolizables confieren astringencia a los frutos, y algunos fenoles sencillos tienen importancia en el aroma de determinadas frutas, como el eugenol en los plátanos. Los derivados de ácidos hidroxicinámicos, como cafeico, ferúlico y sinápico, están presentes en un buen número de frutas y hortalizas y alimentos derivados, en cereales, y en algunos casos constituyen los polifenoles mayoritarios; aunque no tienen un impacto directo sobre las características organolépticas de los alimentos que los contienen, indirectamente pueden afectar de modo negativo a la calidad si son oxidados por las enzimas oxidativas que se encuentran naturalmente en los tejidos vegetales, y dan lugar a la formación de polímeros pardos que imparten al producto un aspecto no siempre deseable (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Los que tienen más relevancia desde el punto de vista de su actividad biológica y/o contenido en la dieta son los flavonoles, los flavan-3-oles, las isoflavonas, los estilbe-

Figura 2 Diferentes familias de metabolitos de naturaleza polifenólica

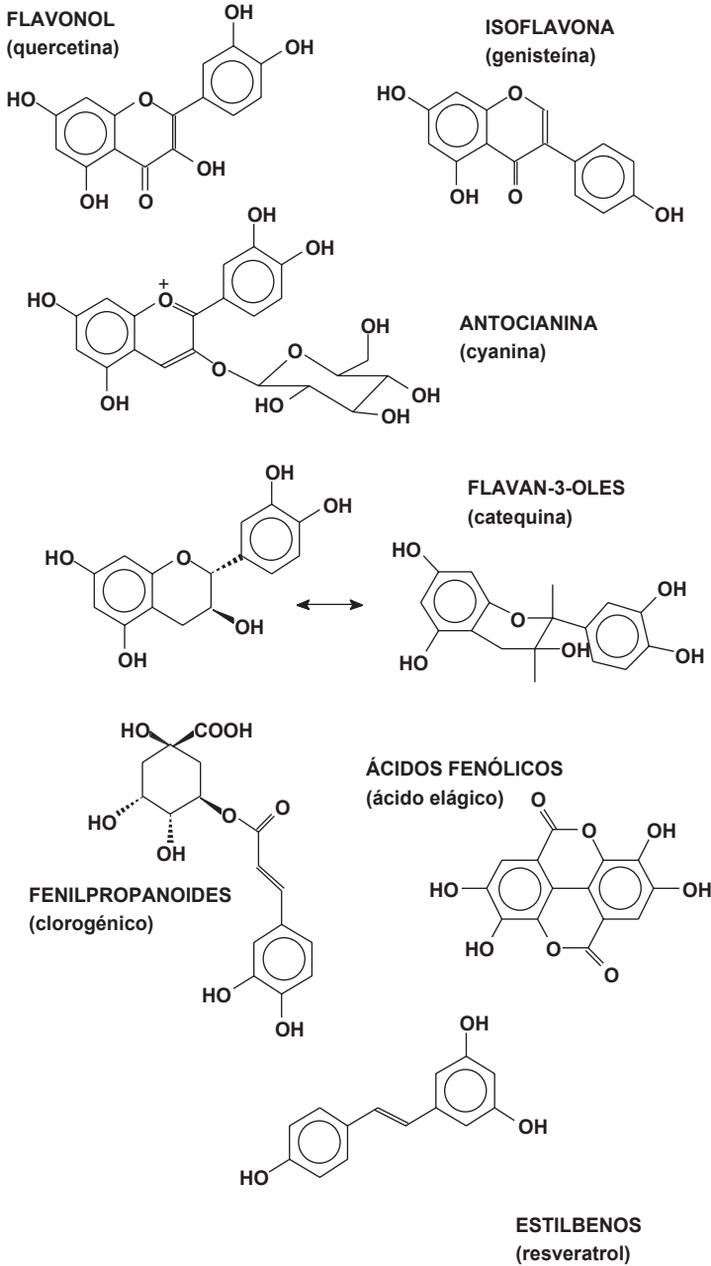
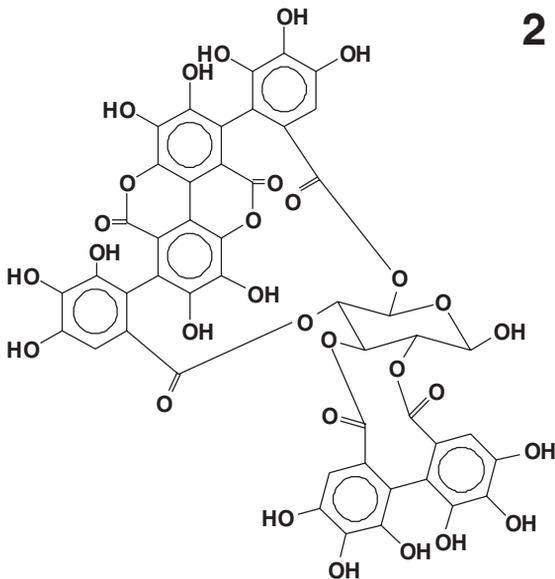
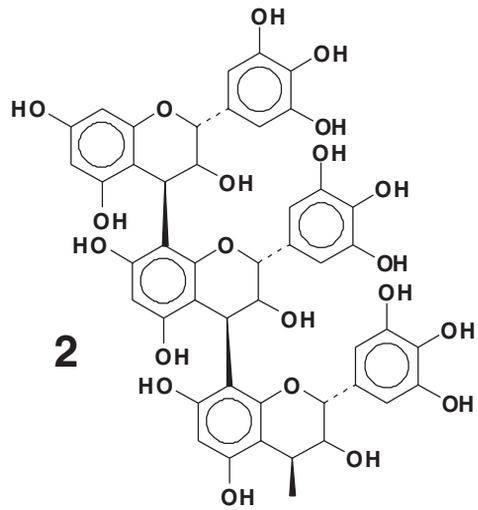
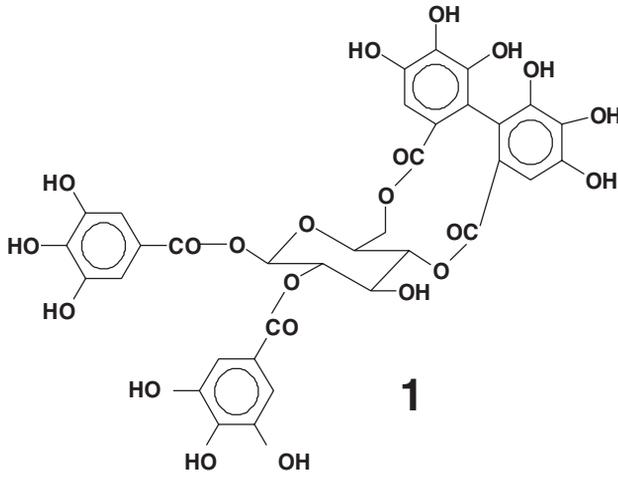


Figura 3 Ejemplos de polifenoles de naturaleza polimérica:
1) Elagitanino. 2) Trímero de prodelfinidina. 3) Punicalagina



noides, el hidroxitirosol y el ácido elágico, que serán contemplados de manera individual.

Flavonoles (quercetina) y flavonas

El metabolito más relevante de este grupo, debido a su distribución en los alimentos vegetales y a su actividad antioxidante, es la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona). Éste es el principal flavonol de las cebollas, las manzanas y el té, alimentos que se han asociado en diversos estudios epidemiológicos con propiedades saludables. Otros flavonoles como el kaempferol, la miricetina y la isorhamnetina, y flavonas como la luteolina y la apigenina, pueden ser también relevantes en determinados alimentos. Las flavanonas como la hesperidina, la naringina y la eriocitrina están presentes en muy pocos alimentos, pero adquieren relevancia por encontrarse en concentraciones muy significativas en los frutos cítricos y los alimentos derivados, lo que supone una ingesta diaria considerable de estos metabolitos (Tomás-Barberán y Clifford, 2000). La ingesta diaria de flavonoles (principalmente quercetina) se ha estimado entre 6 y 60 mg/día, dependiendo de los países (Hollman y Arts, 2000).

La quercetina ha sido el flavonol que ha despertado un mayor interés en relación con su actividad biológica, pues es el que está más ampliamente distribuido en alimentos de origen vegetal (tabla 1), se encuentra disponible comercialmente para ser estudiado en profundidad y muestra, además, el interés de que se le hubieran atribuido propiedades mutagénicas sobre bacterias en experimentos *in vitro* (Yu *et al.*, 1986).

La actividad biológica de la quercetina se ha asociado a su actividad antioxidante debido a que muestra propiedades neutralizadoras de los radicales libres *in vitro*, en algunas condiciones superiores a las que muestran las vitaminas antioxidantes. Sin embargo, la evidencia sobre efectos antioxidantes o neutralizadores de radicales libres *in vivo* es muy escasa, y probablemente se deba a la escasa biodisponibilidad de estos metabolitos.

Los estudios llevados a cabo sobre la biodisponibilidad y metabolismo de estos compuestos indican que los flavonoles son escasamente absorbidos en el intestino delgado, habiéndose detectado absorción de estos compuestos como aglicona y como determinados monoglucósidos, como es el caso de los metabolitos presentes en la cebolla (Hollman *et al.*, 1995). En la mayoría de los casos, los flavonoles se encuentran presentes en los alimentos en forma de combinaciones más complejas con azúcares y ácidos orgánicos alifáticos y aromáticos, lo que hace que disminuya sustancialmente su absorción en el intestino delgado, produciéndose el tránsito hasta el intestino grueso, donde la flora del colon metaboliza los flavonoles presentes naturalmente en el ali-

Tabla 1 Contenido en flavonoles de diferentes alimentos (mg/100 g de porción comestible)

Alimento	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
Albaricoque		2,55	
Alcaparras		180,77	135,56
Arándanos	1,09	3,04	
Brócoli		1,06	1,38
Cebolla		13,27	0,18
Cebollino		4,77	10,00
Cerezas		3,20	
Ciruelas		1,20	
Cranberry	4,33	14,02	0,09
Endibia			4,04
Grosella negra	1,86	1,15	
Judías verdes		2,73	
Lechuga (iceberg)		2,47	0,07
Lechuga (matecosa)		1,19	0,02
Manzana		4,42	
Pimiento dulce		0,65	
Pimiento picante		16,80	
Sidra		0,48	
Té	0,45	2,07	1,34
Uva blanca	0,45	0,87	
Uva tinta	0,45	2,54	
Vino tinto	0,73	0,84	0,05

Fuente: USDA database. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

mento para dar lugar a compuestos más sencillos, fundamentalmente derivados del ácido fenil-acético y fenil-propiónico, que son entonces parcialmente absorbidos y metabolizados en la pared intestinal o en el hígado u otros tejidos para dar lugar a derivados metilados, glucuronidados o sulfatados, que son los metabolitos que se encuentran principalmente en circulación plasmática, y que son excretados en esta forma en la orina (Manach *et al.*, 2004). Queda por conocer si se pueden producir *in vivo* des-conjugaciones (pérdida de los restos glucurónido o sulfato) en determinados tejidos para dar lugar a los metabolitos liposolubles sin conjugar, lo que permitiría la interacción de estas moléculas con distintos procesos celulares y ejercer algunas de las actividades biológicas puestas de manifiesto *in vitro* en los correspondientes tejidos diana.

Flavan-3-oles (prociandinas)

Las prociandinas se pueden encontrar en los alimentos en forma de monómeros (la forma que es más conocida), pero también se encuentran en diferentes grados de polimerización desde dímeros hasta decámeros (oligómeros), e incluso moléculas más grandes que se engloban como polímeros (figura 3). Avances recientes en los métodos de análisis y la disposición de equipos de HPLC acoplados a UV y MS han permitido poner de manifiesto aquellos alimentos que son especialmente relevantes por el contenido en este tipo de compuestos (tabla 2).

Alimento	1	2	3	4-6	7-10	Polímeros
Albaricoque	1,32	1,33	0,77	4,90	2,20	0,80
Alubias rojas	16,25	22,90	23,60	98,85	90,50	258,15
Arándanos	3,46	5,71	4,15	19,57	14,55	129,05
Avellanas	9,83	12,51	13,56	67,72	74,60	322,44
Cacao	1.381,28	831,29	785,70	2.690,78	2.224,21	1.568,49
Cerezas	5,11	3,25	2,39	6,51	1,87	0
Chirimoya	6,25	14,20	4,49			
Chocolate	198,54	206,51	130,88	332,62	216,39	551,00
Ciruelas	8,36	19,74	18,84	57,33	38,04	104,96
Dátiles	0	1,84	3,02	5,88		
Frambuesas	3,91	8,64	3,92	7,70	0,90	0
Fresas	3,71	5,26	4,90	28,14	23,88	75,78
Habas	80,84	73,48	0,13			
Mango	2,30	1,80	1,40	7,20	0	0
Manzana (Granny Smith)	5,68	12,76	8,24	32,90	30,10	46,31
Melocotones	4,48	12,24	4,41	17,66	10,94	22,02
Nectarinas	5,57	5,00	1,75	5,98	3,57	7,31
Nueces	6,93	5,65	7,19	22,05	5,41	20,02
Peras	2,03	2,73	2,03	5,99	5,36	14,16
Pistachos	10,94	13,26	10,51	42,24	37,93	122,46
Té	9,30	3,74	0,38			
Uva blanca	0,96	2,33	1,88	8,35	9,15	58,87
Uva tinta	1,36	2,38	1,01	6,07	6,23	44,56
Vino tinto	16,64	20,49	1,80	6,70	5,00	11,00
Zumo de manzana	4,96	4,04	2,74	0,38	0,10	0
Zumo de uva tinta	1,69	3,18	1,78	7,49	6,46	28,37

Fuente: Base de datos USDA. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

Estas sustancias son responsables de la astringencia de determinados alimentos y se encuentran en cantidades relevantes en el té, el vino, la uva y el chocolate. También se encuentran presentes en cantidades variables en diferentes frutas y frutos secos. Estos compuestos han sido objeto de numerosas investigaciones, en muchas ocasiones promovidas, e incluso financiadas, por las empresas que producen y comercializan alimentos como el chocolate y el té.

La actividad de estos compuestos se ha relacionado con su capacidad para interactuar con proteínas, para acomplejar metales y su capacidad antioxidante (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Algunos de los efectos de las proantocianidinas en la fisiología humana, tanto beneficiosos como perjudiciales, podrían ser explicados por esta capacidad de interactuar con las proteínas (enzimas, toxinas, hormonas, etc.). Se conoce desde hace tiempo que los animales monogástricos alimentados con dietas ricas en taninos pueden sufrir una reducción considerable del incremento de peso. Tal efecto ha sido atribuido a una interacción directa con las enzimas digestivas o con las proteínas de la dieta en el aparato digestivo. Sin embargo, estudios con proteínas de la dieta marcadas radiactivamente han puesto de manifiesto que los taninos no disminuyen la digestibilidad de estas proteínas, sino que más bien producen un incremento de la secreción de proteínas endógenas, como es el caso de las proteínas salivares (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Las proantocianidinas tienen también la propiedad de complejar algunos metales precipitándolos y disminuyendo su absorción. Este efecto está bien documentado en el caso del Fe (III), del Al (III) y del Cu (II), y depende del tipo de alimento ingerido y de otros componentes de la comida. Por ejemplo, la ingestión de proantocianidinas junto con ácido ascórbico hace que el Fe (III) se transforme en Fe (II), que tiene mucha menos capacidad de combinarse con los polifenoles, por lo que no se observan efectos en su absorción. En relación con la salud humana, sería recomendable que los grupos de población más susceptibles de padecer una deficiencia de hierro (niños, mujeres embarazadas) evitaran el consumo excesivo de bebidas ricas en proantocianidinas, o bien evitar su consumo durante las comidas.

Tanto las proantocianidinas monoméricas como las oligoméricas y poliméricas tienen una gran capacidad de neutralizar diferentes tipos de radicales libres *in vitro*. No se conoce la influencia que puede tener el grado de polimerización de estas moléculas en su actividad biológica. Sin embargo, su papel antioxidante *in vivo* es poco conocido, aunque sí que parece ser que los monómeros se absorben bien y en estudios *in vitro* protegen el LDL de la oxidación inducida por metales y otros iniciadores del proceso oxidativo. Sin embargo, la mayoría de los oligómeros y polímeros no son absorbidos,

siendo metabolizados por la flora bacteriana del colon para dar lugar a metabolitos de bajo peso molecular con una actividad antioxidante mucho menor, y en algunos casos inexistente.

La biodisponibilidad de los monómeros es relativamente buena por tratarse de agliconas, mientras que la de los dímeros es todavía objeto de controversia (Manach *et al.*, 2004). Los compuestos oligoméricos (de trímeros en adelante) no se absorben como tales, son degradados por la flora del colon para dar lugar a derivados de fenoles más simples, que pueden ser entonces absorbidos. Los monómeros que son absorbidos en el intestino delgado son metabolizados para dar lugar a derivados metilados (mediante la enzima COMT) o combinaciones con glucurónico o sulfato, lo que incrementa su solubilidad en agua y su excreción en orina.

Isoflavonas

Este tipo de compuestos, que se pueden englobar dentro de los conocidos como fitoestrógenos, se cree que pueden proporcionar terapias alternativas para un amplio rango de enfermedades o situaciones vitales relacionadas con las hormonas, entre las que se encuentran el cáncer, los síntomas de la menopausia, enfermedades cardiovasculares y osteoporosis. La evidencia epidemiológica reciente y los datos experimentales de estudios con animales sugieren determinados efectos beneficiosos de las isoflavonas para la salud humana (Setchell y Cassidy, 1999), pero la evidencia clínica que apoya estas actividades es todavía muy escasa y es necesario llevar a cabo estudios clínicos apropiados a gran escala para confirmar estas expectativas.

Las isoflavonas se encuentran casi exclusivamente en las legumbres. La soja es la fuente más abundante de estos compuestos, y todos los alimentos derivados de la misma podrían proporcionar *a priori* una fuente dietética considerable de estos constituyentes bioactivos. Estos metabolitos se encuentran principalmente como glicósidos relativamente hidrosolubles, y los diferentes alimentos relacionados con la soja contienen entre 0,1 y 3 mg/g. El germen de soja es el producto con un mayor contenido, que en ocasiones supera los 20 mg/g (Cassidy *et al.*, 2000). En la dieta occidental los principales productos derivados de la soja de utilización en alimentos son el aceite y la lecitina de soja, pero estos productos carecen prácticamente de isoflavonas, pues estos metabolitos se combinan con la fracción proteica durante los procesos de elaboración.

Actualmente se encuentran en el mercado un gran número de alimentos que contienen isoflavonas de soja como ingredientes, y que en algunos casos se pueden considerar alimentos funcionales, pues exhiben alegaciones sobre la salud, especialmente a nivel de beneficios sobre el sistema cardiovascular, y sobre la osteoporosis.

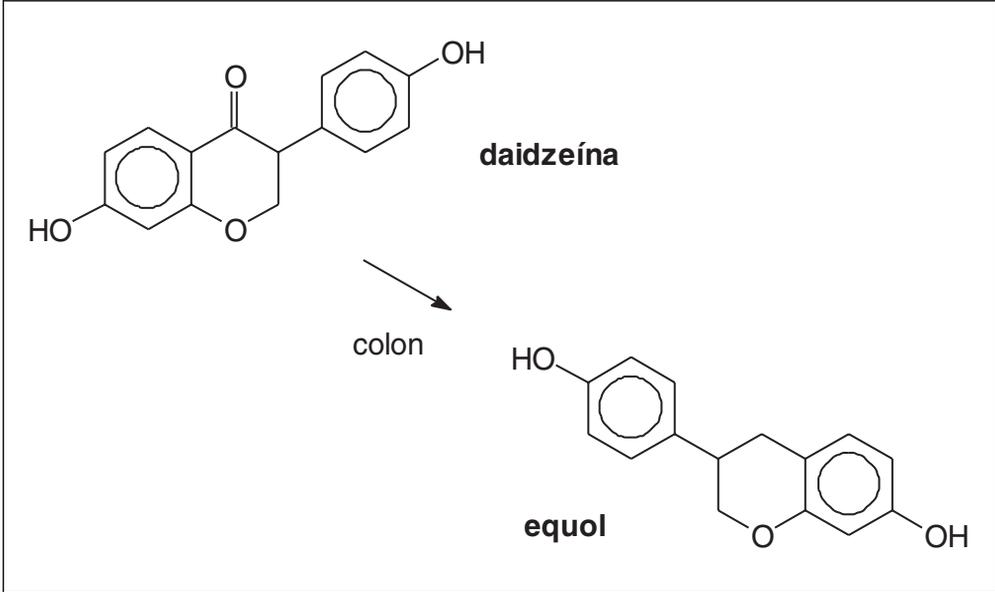
Las isoflavonas son estructuralmente muy similares a los estrógenos de los mamíferos, y esta similitud es incluso mayor cuando los comparamos con los metabolitos bacterianos de las isoflavonas, como es el caso del equol. Sobre la base de su estructura, no es extraño que las isoflavonas se unan a los receptores estrogénicos; sin embargo, sus acciones se parecen más a las de agonistas o antagonistas parciales de los estrógenos, un concepto que todavía es difícil de comprender pero que continúa fascinando a los bioquímicos y endocrinólogos. Para complicar más este asunto, los estrógenos pueden tener efectos no convencionales diferentes de sus clásicas acciones de interacción con los genes, como pueden ser efectos en las membranas plasmáticas y en las rutas de señalización celular. Lo que esto implica, desde una perspectiva clínica, es que a ciertas concentraciones, que dependen de muchos factores como son el número de receptores, su ocupación y la concentración del estrógeno competidor, en lugar de actuar como moléculas con actividad estrogénica, actúen como antagonistas para inhibir esta acción. Estos efectos pueden ser además específicos del tejido.

La existencia de al menos dos tipos de receptores estrogénicos complica aún más la comprensión del mecanismo de acción de las isoflavonas. Cada receptor tiene funciones diferentes en la regulación génica, y se encuentran distribuidos de diferente forma dependiendo del tejido, y esto podría explicar la acción selectiva de los estrógenos dependiendo del órgano que consideremos. La afinidad de las isoflavonas y otros xenoestrógenos parece ser mayor para los receptores β recientemente descubiertos que para los clásicos α , lo que sugiere que este nuevo receptor y otros todavía por descubrir pueden ser muy importantes en la acción no-esteroide de los estrógenos.

La forma química en que se encuentran las isoflavonas es de gran relevancia ya que puede afectar a su actividad biológica, su biodisponibilidad y, por tanto, a sus efectos fisiológicos. Ya se ha demostrado la importancia de las transformaciones que produce la flora intestinal en las isoflavonas (Setchell *et al.*, 1984). Tras su ingesta, las isoflavonas de la soja son hidrolizadas por las glucosidasas intestinales, que liberan las agliconas daidzeína, genisteína y gliciteína. Éstas pueden ser absorbidas o posteriormente metabolizadas para dar numerosos metabolitos, como es el caso del equol (figura 4). La extensión en que se produce este metabolismo bacteriano es muy variable dependiendo de los individuos y está influida por otros constituyentes de la dieta. Por ejemplo, un medio rico en carbohidratos que favorece la fermentación intestinal conduce a una biotransformación más extensa de los fitoestrógenos, llevando a una gran producción de equol, un metabolito de la daidzeína (Cassidy, 1991). Esta ruta metabólica puede ser clínicamente relevante para la eficacia de las isoflavonas de la soja y de los alimentos funcionales elaborados con isoflavonas de soja, pues la potencia estrogénica del equol es un orden de magnitud superior a la de su precursor, la daidzeína. La importancia de la microflora en el metabolismo de los fitoestrógenos se evidencia

en estudios en los que la administración de antibióticos a voluntarios bloqueó la producción de estos metabolitos.

Figura 4 Esquema del metabolismo de la isoflavona de la soja daidzeína por las bacterias del colon



En relación con la biodisponibilidad, se sabe que se pueden alcanzar concentraciones plasmáticas de entre 50 y 800 ng/mL de daidzeína, genisteína y equol, tras el suministro de cantidades realistas de alimentos a base de soja que proporcionan unos 50 mg/día de isoflavonas totales.

Se requiere investigación adicional para establecer la farmacocinética de las isoflavonas de la soja, y se desconoce la dosis óptima de estas sustancias para alcanzar efectos clínicos. Sin embargo, sí que se conoce que, en mujeres premenopáusicas, 50 mg/día de agliconas de isoflavonas son suficientes para producir efectos significativos (Casidy *et al.*, 1994).

En mujeres **premenopáusicas** se ha observado que una dieta rica en fitoestrógenos puede producir efectos estrogénicos, prolongando el ciclo menstrual. Este efecto no se produjo cuando se administró proteína de soja sin isoflavonas, demostrando un efecto modulador del sistema endocrino. La duración del ciclo menstrual, como muestran

los estudios epidemiológicos, es uno de los factores de riesgo para el cáncer de mama, aunque las razones para esta relación no están del todo claras (Wu *et al.*, 1996).

La concentración de fitoestrógenos en orina y plasma de mujeres asiáticas cuando consumen su dieta tradicional es muy superior a la de las mujeres occidentales, y estos niveles superiores se han correlacionado con una disminución en la incidencia de cánceres de mama, endometrio y ovario, aunque se necesita investigación adicional para confirmar estas hipótesis (Silva *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha demostrado que, en determinados casos de cáncer de mama, el consumo de isoflavonas con la dieta podría tener efectos perjudiciales (Ju *et al.*, 2002).

El interés en los fitoestrógenos como agentes anticancerígenos naturales se ha incrementado tras la publicación de una serie de estudios que han demostrado que, en modelos animales a los que se inducía químicamente cáncer de mama, la ingestión de proteína de soja con isoflavonas redujo significativamente la formación de tumores de una forma que dependía de la dosis. Este efecto desaparecía completamente cuando se administraba proteína de soja a la que se le habían separado las isoflavonas. Estos estudios con animales modelo han sido también apoyados por estudios *in vitro* que muestran que las isoflavonas inhiben la proliferación celular. Estos efectos no tienen por qué estar relacionados con su actividad estrogénica, pues las isoflavonas también muestran un fuerte efecto inhibitorio sobre distintas proteínas, como las proteínas quinasas, que están implicadas en la regulación del ciclo celular. También pueden estar relacionados con la expresión de genes relacionados con la apoptosis (muerte celular programada).

A pesar de la euforia sobre el potencial de los fitoestrógenos en la prevención del cáncer, todavía carecemos de datos clínicos que lo apoyen en el momento presente. Actualmente hay varios estudios a gran escala para evidenciar clínicamente el papel real de los fitoestrógenos en la prevención de estas enfermedades *in vivo* y en situaciones reales.

En mujeres **postmenopáusicas**, los datos epidemiológicos y la experiencia clínica indican que la terapia con estrógenos tras la menopausia ofrece protección frente a las enfermedades cardiovasculares, reduce la severidad de la osteoporosis, mejora la función cognitiva y evita los síntomas de la menopausia asociados con la pérdida de estrógenos ováricos (Col *et al.*, 1997). Hipotéticamente, el consumo de soja, e indirectamente el consumo de isoflavonas, puede proporcionar una fuente de estrógenos exógenos, que se correlaciona con la menor incidencia de osteoporosis, cáncer de mama y síntomas de la menopausia en mujeres de países que consumen soja de manera habitual.

Las isoflavonas también se han asociado con la **salud cardiovascular**. La deficiencia de estrógenos se asocia con alteraciones significativas en el metabolismo de las lipoproteínas y, consecuentemente, con concentraciones incrementadas de colesterol sérico en mujeres postmenopáusicas. Previene esta acumulación se podría reducir la incidencia de enfermedades coronarias (Zhang *et al.*, 2003). Las isoflavonas disminuyen los niveles de LDL y aumentan los de HDL, y además también tienen efectos directos sobre las paredes de los vasos sanguíneos (Zhuo *et al.*, 2004; Steinberg *et al.*, 2003).

También se han relacionado con beneficios a nivel de la **osteoporosis**. La Ipriflavona es un análogo estructural de las isoflavonas de la soja que carece de efectos estrogénicos y, sin embargo, evita la pérdida de masa ósea y aumenta la formación de hueso. Las isoflavonas estrogénicas también tienen el efecto de mitigar las consecuencias que produce la disminución natural de estrógenos en la menopausia sobre la pérdida de masa ósea (Atkinson *et al.*, 2004).

Estilbenos (resveratrol)

Los estilbenos son moléculas ampliamente distribuidas en plantas superiores. Sin embargo, las fuentes potenciales de estilbenos en nuestra dieta quedan esencialmente restringidas a la uva, vino tinto, cacahuets y algunas bayas (grosella negra, arándanos, etc.). Los estilbenos más representativos son el resveratrol y su glucósido piceido, el piceatanol, así como dímeros y trímeros de resveratrol que dan lugar a las viniferinas. De todos, es el resveratrol (figura 1), con diferencia, el que más ha atraído la atención, fundamentalmente por sus potenciales actividades promotoras de la salud.

Los estilbenos son fitoalexinas, es decir, metabolitos cuya concentración en la planta es normalmente muy baja (casi indetectable), pero que la planta sintetiza expresamente para hacer frente a agresiones externas o situaciones de estrés como puede ser el ataque de patógenos. Por ejemplo, el contenido de resveratrol en la uva es apenas detectable, excepto ante situaciones puntuales como puede ser el ataque del hongo *Botrytis* o cuando es irradiada con luz ultravioleta (Cantos *et al.*, 2001, 2002), donde puede aumentar hasta 2.000 veces respecto a su contenido inicial. Con el tratamiento mediante luz UVC se ha abierto la posibilidad de comercializar “*uvas funcionales*” debido al aumento considerable del contenido de resveratrol en estas uvas (en torno a 15 mg/Kg uva), así como productos con alto contenido en resveratrol (nutracéuticos) que pudieran derivarse de éstas. En el caso del vino, los niveles de resveratrol van a depender de la variedad de uva, de las condiciones climáticas, así como de los procedimientos enológicos empleados (tiempo y tipo de maceración, etc.), sin olvidar que, según la metodología analítica empleada, los niveles también pueden ser sub o sobreestimados sustancialmente. Se han descrito concentraciones de resveratrol de 0,3 a 8

mg/L en vino tinto, de 1,3 a 3 mg/L en vino rosado y de 0,1 a 1,2 mg/L en vino blanco (Lamuela-Raventós *et al.*, 1995). El contenido de resveratrol en cacahuetes es muy bajo, en el rango de 1 a 4 µg/g, y el descrito en distintas bayas es realmente simbólico, en el orden de ng/g.

Hoy en día existen numerosos preparados “nutracéuticos” fundamentalmente obtenidos a partir de subproductos de la uva (en la producción de zumo o vino), que alegan contener gran cantidad de resveratrol. Sin embargo, en multitud de casos, el contenido (si existe) dista de ser el expuesto en las etiquetas. Esto no es nada sorprendente partiendo del hecho de que la uva contiene niveles bajísimos de esta molécula y que, por tanto, sus correspondientes subproductos tampoco son ricos en este compuesto.

A pesar de que, debido a su escaso aporte en la dieta, se continúa debatiendo acerca de la potencial importancia del resveratrol en la salud, lo cierto es que en los últimos 5 años se han publicado casi un millar de artículos científicos acerca de esta molécula. Para el resveratrol se han descrito diversas actividades promotoras de la salud (Jang y Pezzuto, 1997; Sinha *et al.*, 2002), incluyendo actividad antioxidante, anticancerígena, cardioprotectora, neuroprotectora, antiinflamatoria, antibacteriana, antivírica, sin olvidar su actividad estrogénica/antiestrogénica en función de la concentración usada en los ensayos. Todas estas actividades se han observado en diferentes modelos, *in vitro*, celulares y animales. Es de destacar la nula toxicidad de esta molécula en experimentos llevados a cabo en ratas, durante cierto tiempo y con dosis miles de veces superiores a la ingesta normal de una persona (Juan *et al.*, 2002).

Hace unos años se apuntaba que la ingesta de dos vasos de vino de alto contenido en resveratrol podía aumentar los correspondientes niveles en plasma hasta concentraciones compatibles con los efectos observados en multitud de ensayos (Bertelli *et al.*, 1998). Actualmente se plantea un enigma en torno a la biodisponibilidad y la actividad biológica del resveratrol (Gescher y Steward, 2003). Se ha descrito actividad biológica, *in vivo* (anticancerígena), en ratas con dosis muy bajas (10 ppm) de resveratrol administradas vía oral (Banerjee *et al.*, 2002); en el mismo estudio, *in vitro*, sin embargo, se necesitan concentraciones de resveratrol mucho más elevadas (que no se alcanzan en tejidos diana) para ejercer el mismo efecto; por último, se ha descrito que el resveratrol se absorbe muy bien (en roedores y humanos, independiente del vehículo usado en la administración: agua, zumo, vino, etc.), pero que su nivel en plasma, como tal, es muy bajo, lo que se debe a su rápida conjugación con grupos sulfatos y/o glucurónidos (que es el procedimiento normal que sigue el organismo para “neutralizar” y facilitar la eliminación de moléculas “extrañas”), así como a la acción de la flora intestinal, que transforma al resveratrol ingerido en otros derivados (Asensi *et al.*, 2002; Waller *et al.*, 2004). Por tanto, la biodisponibilidad del resveratrol, de acuerdo a

los estudios más recientes, es muy baja, es decir, el resveratrol como tal, circulante en sangre, y que potencialmente puede alcanzar los tejidos, raramente puede justificar el efecto beneficioso que se le pretende achacar. Así pues, se han depositado muchas esperanzas en el resveratrol como molécula de extraordinaria versatilidad, capaz de interferir en multitud de procesos implicados en el desarrollo de numerosas patologías. Sin embargo, la relación entre dosis consumida y efecto biológico constituye aún un reto que hay que investigar.

Hidroxitirosol

El hidroxitirosol es un compuesto fenólico simple (figura 1), representativo de la oliva y sus derivados, especialmente del aceite virgen extra. Su relevancia en la dieta ha sido significativa a lo largo de la historia en países de la cuenca mediterránea que han consumido aceite de oliva como principal fuente de grasa y, por tanto, seguidores de la llamada “dieta mediterránea”. Los beneficios del aceite de oliva en la prevención de enfermedades cardiovasculares han sido contrastados en numerosos estudios, siendo achacable este beneficio tanto al perfil lipídico de este aceite como a la presencia de una fracción “antioxidante”, conformada por la vitamina E y, sobre todo, por varios compuestos fenólicos entre los que destaca, por su cantidad y actividad biológica, el hidroxitirosol (Marrugat *et al.*, 2004). Su concentración en el aceite de oliva puede ser muy variable, dependiendo de la variedad de oliva, condiciones climáticas y, muy especialmente, de que esté o no refinado; se pueden encontrar valores de 40 a 150 mg/L, etc., para el virgen extra, y muy bajos, de 0 a 0,5 mg/L (o indetectables), en el refinado. En el mercado existen numerosos preparados nutracéuticos (a partir de extractos de hoja de olivo) que pueden contener cantidades significativas de hidroxitirosol junto con otros compuestos fenólicos (tirosol, oleuropeína, ácido vanílico, etc.). No se encuentra disponible comercialmente el compuesto puro, si bien existen distintos enfoques tecnológicos para su obtención (Espín *et al.*, 2001; Fernández-Bolaños *et al.*, 2002) y posterior uso en la “funcionalización” de alimentos (Larrosa *et al.*, 2003b).

El hidroxitirosol se absorbe de manera dosis-dependiente y alcanza picos máximos en plasma en sólo 32 minutos tras su ingesta (como parte de aceite de oliva virgen extra) (Miro-Casas *et al.*, 2003). Hay que tener en cuenta que, en el caso del hidroxitirosol, se ha constatado la distinta absorción en función del vehículo o matriz usado en la administración de la molécula. De hecho, cuando se ha administrado como parte de aceite de oliva virgen se absorbe más que cuando se añade al aceite refinado, y bastante más que si se administra en un yogur, donde la absorción disminuye sustancialmente (Visioli *et al.*, 2003). En cualquier caso, el hidroxitirosol es extensivamente metabolizado puesto que sólo el 5% aproximadamente es excretado en orina como hidroxitirosol. Sus metabolitos más representativos son el ácido homovanílico y el alcohol homovaní-

lico, ambos con la parte del hidroxitirosol más reactiva “bloqueada” como estrategia normal del organismo para eliminar compuestos potencialmente tóxicos. Al igual que en el caso del resveratrol, la biodisponibilidad del hidroxitirosol no justifica la actividad biológica observada para esta molécula (Vissers *et al.*, 2004). Por tanto, nuevamente, se repite una laguna existente en la correcta determinación de estos compuestos (posiblemente extensible a otros) en fluidos biológicos y potenciales tejidos diana.

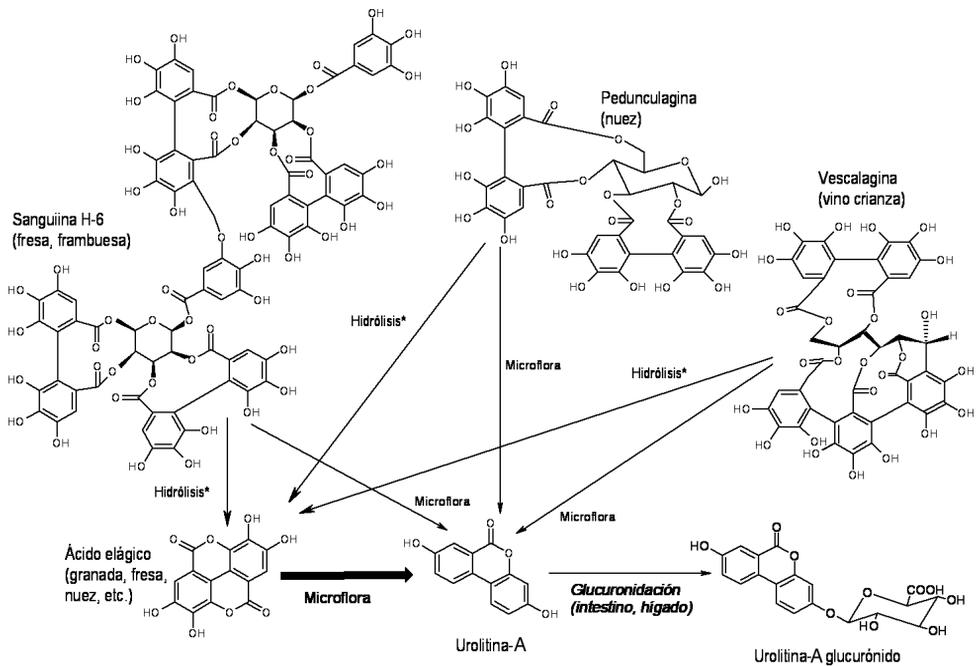
La principal actividad biológica atribuida al hidroxitirosol (entre otras) es su capacidad para captar radicales libres (antioxidante). El hidroxitirosol ha atraído especialmente la atención por su capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales, en su estado oxidado, contribuyen críticamente al desarrollo de arteriosclerosis y sus posteriores consecuencias. Esto se había demostrado fundamentalmente en experimentos *in vitro*. Posteriormente, se verificó en ratas alimentadas con distintas dosis de hidroxitirosol el aumento de la capacidad antioxidante del plasma, proporcional al hidroxitirosol consumido (Visioli *et al.*, 2001). Hoy día se sabe que la fracción fenólica del aceite de oliva virgen, especialmente el hidroxitirosol, en ensayos clínicos con voluntarios, y de manera dosis-dependiente, disminuye la presencia de partículas LDL oxidadas, hace más resistentes a la oxidación al resto de LDL, aumenta el contenido de HDL (el aumento de lipoproteína de alta densidad disminuye el riesgo cardiovascular), aumenta la capacidad antioxidante del plasma de los voluntarios y disminuye varios marcadores de riesgo cardiovascular tales como el tromboxano A₂ y los isoprostanos, que son marcadores fiables de estrés oxidativo (Marrugat *et al.*, 2004; Visioli *et al.*, 2004). Por tanto, el consumo de alimentos que contienen hidroxitirosol, o los que se pudieran formular con éstos (alimentos funcionales con hidroxitirosol), o los nutracéuticos que contienen cantidades significativas de éste, son firmes candidatos a poder demostrar con bases científicas posibles alegaciones sobre la salud referentes a su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares.

Ácido elágico y elagitaninos

Los elagitaninos son moléculas de alto peso molecular, que pueden ser solubles o insolubles en agua dependiendo de sus estructuras, y que tras tratamientos enzimáticos, térmicos, básicos, ácidos, etc., se pueden hidrolizar (por lo que también son llamados “taninos hidrolizables”), dando lugar, tras un reordenamiento químico, al ácido elágico libre (figura 5). La cuantificación del contenido de elagitaninos en alimentos es muy complicada (salvo en algunos casos como en la granada), por lo que suelen ser caracterizados en alimentos sometidos a hidrólisis y cuantificando el ácido elágico libre resultante. Los elagitaninos y derivados del ácido elágico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, si bien las principales fuentes de la dieta son las fresas, frambuesas, zarzamora, granada (y los correspondientes derivados como zumos,

mermeladas, etc.), las nueces y, de manera menos significativa, también pueden encontrarse en vinos envejecidos en barrica de roble (vinos crianza o reserva). El contenido de elagitaninos (cuantificado como ácido elágico libre, AE) puede variar en función de la variedad en cada fruta, del método analítico empleado. Se pueden encontrar valores de 20 a 80 mg de AE/100 g en fresas, según variedades; hasta 200 mg AE/100 g en frambuesa, 16 mg AE/10 g en nuez, 2 g/L elagitaninos en zumo de granada, y 18 mg AE/L en vino reserva. El efecto del procesado es de especial relevancia en los elagitaninos, pues se potencia la ruptura de los polímeros en monómeros potencialmente más biodisponibles y se incrementa la extracción de elagitaninos de la matriz en el alimento elaborado. Por ejemplo, el contenido de ácido elágico libre es mayor en las mermeladas de fresa y frambuesa que en la fruta fresca (Zafrilla *et al.*, 2001). En el caso de la granada, cuando se elabora el zumo por prensado directo del fruto, los elagitaninos (principalmente la punicalagina) pasan al zumo, enriqueciéndolo extraordinariamente en estos polifenoles (Gil *et al.*, 2000).

Figura 5 Transformaciones metabólicas de los elagitaninos en el aparato digestivo



*Hidrólisis: tratamiento con ácido, base, enzimático, térmico, etc.

Los elagitaninos han sido reconocidos tradicionalmente como “antinutrientes” que podían provocar algunas patologías en el ganado que se alimenta de plantas con gran cantidad de derivados del elágico. Sin embargo, existe controversia en este aspecto y diversos estudios recientes avalan la ausencia de toxicidad de estas moléculas y, por tanto, apoyando su uso como nutraceuticos o como potenciales ingredientes en el diseño de alimentos funcionales (Cerdá *et al.*, 2003a).

El consumo de alimentos ricos en elagitaninos ha venido asociado a propiedades beneficiosas para la salud, como, por ejemplo, en el caso de las plantas medicinales chinas, el consumo de zumo de granada en Japón, las frutas del bosque y la gran cantidad de derivados comerciales preparados bien a partir de éstos o bien que contienen ácido elágico (nutraceuticos con alta concentración de elagitaninos o ácido elágico a partir de extractos de estas frutas).

Dentro de las actividades promotoras de la salud presuntamente asociadas a los elagitaninos y al ácido elágico destacan su actividad anticancerígena (Castonguay *et al.*, 1997) y la prevención de enfermedades cardiovasculares (Aviram *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2001). En el caso de la granada, sus zumos concentrados se comercializan en Japón debido a sus propiedades estrogénicas en la prevención de trastornos de la menopausia y su potencial en la prevención del cáncer de mama (Kim *et al.*, 2002). También sus extractos se comercializan con éxito en Estados Unidos e Israel, debido especialmente a sus supuestas propiedades beneficiosas en la prevención de enfermedades cardiovasculares, y preparados conocidos como, por ejemplo, “Cardiogranate®” se encuentran en el mercado. Se ha descrito que el suministro de zumo de granada a ratones que desarrollan espontáneamente arteriosclerosis reduce la acumulación celular del colesterol, la peroxidación lipídica en los macrófagos y el desarrollo de la arteriosclerosis (Aviram *et al.*, 2000). Además, el zumo de granada también inhibe la actividad del enzima convertidor de la angiotensina (ACE) y reduce la presión arterial (Aviram y Dornfeld, 2001). Hay que destacar que los efectos beneficiosos de los alimentos o derivados con alto contenido en elagitaninos y ácido elágico se vienen asociando fundamentalmente a la altísima actividad antioxidante del ácido elágico, y muy especialmente de los elagitaninos. También están disponibles en el mercado innumerables suplementos nutraceuticos usando en su formulación extractos de frambuesa, fresa, etc., que se apoyan en estudios de actividad antioxidante *in vitro* para usarlos como poderosas armas de *marketing* para incrementar las ventas.

La potencial actividad anticancerígena del ácido elágico y los elagitaninos merece ser resaltada. La mayoría de los estudios que avalan este efecto han sido realizados *in vitro*, en cultivos celulares, pero también algunos en ratones y ratas con ácido elágico puro (Dorai y Aggarwal, 2004; Maciel *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios más

fiables y completos, que demuestran una sustancial inhibición en la progresión de tumores del tracto gastrointestinal en ratas cuando se les alimentaba con fresas y frambuesas (Harris *et al.*, 2001; Kresty *et al.*, 2001), no han podido establecer (aunque sí sugerir) la implicación de estos polifenoles como principales agentes anticancerígenos.

Sin embargo, a pesar de las presuntas propiedades beneficiosas atribuidas, hay que destacar que la caracterización de elagitaninos en alimentos (o suplementos), su aportación a la dieta, absorción, metabolismo y efecto detallado en humanos no han sido completamente elucidados, siendo ahora cuando se han empezado a publicar resultados en este sentido (Cerdá *et al.*, 2003b, 2004, 2005).

Constituyen un serio toque de atención en este último aspecto los estudios recientemente publicados en ratas y humanos (Cerdá *et al.*, 2003b, 2004, 2005) donde se demuestra que la altísima actividad antioxidante (*in vitro*) asociada a los polifenoles del zumo de granada (fundamentalmente elagitaninos y ácido eláxico) virtualmente desaparece *in vivo* como consecuencia del metabolismo de la flora intestinal. Dicho de otro modo, la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*, de polifenoles en general y de elagitaninos en particular, de alimentos ha de ser tomada con mucha precaución. En la literatura científica existe una ingente cantidad de publicaciones acerca de la actividad antioxidante *in vitro* de alimentos, que ahora quedan en gran medida en entredicho; lo cual está siendo avalado cada vez más por las sucesivas investigaciones que se vienen produciendo a escala mundial. Muchos de los constituyentes de alimentos que muestran actividad antioxidante no se absorben como tales, sino que son transformados (metabolizados) por la flora del colon para producir metabolitos con escasa o nula actividad antioxidante. En realidad, estos metabolitos son los que se absorben, pasan a la circulación y pueden mostrar efectos biológicos interesantes pero no relacionados con la actividad antioxidante. Por tanto, la microflora del colon tiene un papel muy relevante en la actividad de los polifenoles de los alimentos, pues dependiendo de los individuos (de su flora específica) pueden metabolizar los polifenoles (elagitaninos en este caso) en mayor o menor medida, afectando a los niveles plasmáticos e intestinales de los metabolitos y, por tanto, influyendo directamente sobre su actividad biológica. Es decir, esta flora es crítica para que un individuo “produzca” más o menos metabolitos biodisponibles y, por tanto, se puede postular que, dependiendo de la flora intestinal de cada cual, un mismo alimento rico en polifenoles puede tener efecto distinto en la salud. El papel de la flora en el metabolismo de polifenoles promotores de la salud ha sido también escasamente estudiado.

En el caso concreto de alimentos ricos en elagitaninos (granada, fresa, frambuesa, nuez, vino envejecido en roble, bellota) se ha constatado por primera vez en la litera-

tura científica que éstos son transformados por la flora intestinal en derivados de la dibenzopirano, siendo el metabolito más representativo el llamado “urolitina-A” (figura 5) (Cerdá *et al.*, 2005). Esto ha sido demostrado en ratas (granada), cerdos (en el caso de la bellota) y humanos (granada, fresa, frambuesa, nuez y vino reserva). Por tanto, la urolitina-A puede considerarse como un biomarcador de exposición (con potencial aplicación para el desarrollo de métodos analíticos que certifique el consumo de alimentos que contengan elagitaninos). La urolitina-A fue descrita anteriormente en las heces de una ardilla originaria de China que se alimenta de bayas ricas en elagitaninos. Estas heces son ampliamente usadas por la medicina tradicional china como remedio para problemas de la coagulación y alergias, abriendo un nuevo campo de investigación actual que intentará desvelar la potencial actividad biológica de este metabolito que se produce en el organismo en cantidades importantes a partir de distintos alimentos con elagitaninos.

Los alimentos ricos en elagitaninos y ácido elágico, así como los suplementos nutracéuticos que contienen una alta concentración de estas moléculas, o bien los potenciales alimentos funcionales que se pudieran diseñar usando como ingredientes estos compuestos, podrían ser fuentes de la dieta muy prometedoras en la lucha contra el cáncer. Los elagitaninos y el ácido elágico pueden tener importante acción local al acumularse en gran cantidad en el colon y durante muchas horas, tiempo en el que pueden tener un papel crucial en la prevención o retraso de la progresión de tumores. Respecto a la potencial acción sistémica del consumo de alimentos ricos en elagitaninos y ácido elágico, parece razonable pensar que puede deberse o bien a otros constituyentes de esos alimentos o a los metabolitos de la flora intestinal que pasan a la circulación.

Consideraciones globales sobre el metabolismo y la biodisponibilidad de los polifenoles

No existe una ingesta diaria recomendada para este tipo de compuestos. La ausencia de buenas tablas de composición, y el hecho de que la ingesta de cualquier fenol individual será muy dependiente de los tipos de alimentos vegetales ingeridos, significa que no es posible proporcionar valores definitivos de ingesta en poblaciones humanas. Sin embargo, como una estimación a *grosso modo*, la ingesta total de polifenoles generalmente se podría encontrar entre los 150 y los 1.000 mg por día.

Como todos los constituyentes celulares, los fenoles se encuentran almacenados en diferentes compartimentos celulares en las plantas, y necesitan ser mecánicamente liberados para ser posteriormente absorbidos. Algunos fenoles pueden reaccionar irreversiblemente con proteínas y con otros fenoles. Cuando los tejidos originales son masticados o procesados, los fenoles originales pueden sufrir oxidación, ya sea direc-

tamente o mediante el concurso de enzimas (polifenol oxidasas). Los eventos previos a la absorción pueden ser muy relevantes, ya que determinarán los tipos de compuestos que estarán expuestos a la absorción en el intestino delgado y en el grueso. Los dos principales fluidos biológicos que afectan a los polifenoles antes de alcanzar el intestino delgado son la saliva y los jugos gástricos. Estos fluidos no ejercen ningún efecto sobre los glicósidos de flavonoides ni sobre los derivados de ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, sí que se ha descrito que pudieran tener algún efecto sobre la transformación de las formas poliméricas de flavan-3-oles (proantocianidinas), pues se ha demostrado su transformación *in vitro* en monómeros y dímeros que sí que podrían ser absorbibles y afectar considerablemente a la biodisponibilidad (Manach *et al.*, 2004). Sin embargo, estas afirmaciones necesitan confirmación *in vivo*, pues pueden verse muy afectados por otros constituyentes de la dieta que afectarían a las condiciones de pH del jugo gástrico.

Los glicósidos de flavonoide se pueden absorber en el intestino delgado o intestino grueso, dependiendo de la naturaleza de los azúcares ligados al flavonoide. Así, los β -glucósidos de la quercetina, que se encuentran presentes en la cebolla, pueden ser absorbidos en el intestino delgado, mientras que los rutinósidos de las manzanas, té verde y muchos otros alimentos no se absorben en el intestino delgado y alcanzan el intestino grueso, donde pueden absorberse en una menor proporción tras ser liberadas las agliconas y, en la mayor parte de los casos, son degradados por la flora del colon (Stahl *et al.*, 2002).

El conocimiento sobre el efecto de la matriz del alimento en la absorción de polifenoles es muy limitado. La interacción de los polifenoles con las proteínas es algo esperable y que *a priori* podría afectar a su absorción. Sin embargo, se ha demostrado en humanos que la adición de leche al té negro no afecta a la absorción de flavonoles y flavan-3-oles (Hollman *et al.*, 2001), aunque sí que parece que afecta a los flavan-3-oles del chocolate (Serafini *et al.*, 2003).

Los principales factores que afectan al nivel de absorción de los fenoles son los siguientes:

- 1) Su incorporación y conjugación en células del intestino delgado.
- 2) El potencial para ser metabolizado por las bacterias del colon y la subsecuente absorción de los metabolitos producidos.
- 3) La excreción biliar tras transformación hepática y/o conjugación.

La absorción en el intestino delgado está influida por factores físico-químicos tales como el tamaño molecular, lipofilicidad, solubilidad, pKa, y factores biológicos como

el tiempo de tránsito gástrico e intestinal, el pH del lumen, la permeabilidad de las membranas y la excreción biliar tras una primera transformación metabólica. Estudios recientes han demostrado que una de-glicosilación en la membrana de las microvellosidades intestinales puede facilitar la absorción de determinados glucósidos (Day *et al.*, 2000).

Terpenoides

Dentro de los terpenoides se incluyen aquellos metabolitos producidos a partir de la ruta del ácido mevalónico en las plantas. Los más relevantes desde el punto de vista de constituyentes de alimentos con actividad biológica son los carotenoides y los fitosteroles.

Carotenoides

Se trata de unos pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos vegetal y animal. Las concentraciones de estos pigmentos en los tejidos vegetales dependen de las condiciones agronómicas, especialmente exposición a la luz y aporte de nitrógeno. Los principales carotenoides en alimentos son α y β -caroteno, luteína, licopeno, β -cryptoxantina y zeaxantina. Los carotenoides de los alimentos vegetales generalmente se encuentran en la forma *trans*, y los hidroxí-carotenoides en la forma libre.

Se ha publicado una base de datos europea sobre carotenoides en la que se recoge el contenido de las frutas y hortalizas más comunes (O'Neill *et al.*, 2001). Generalmente, el perfil de los carotenoides presentes en el plasma humano depende de la variedad de frutas y hortalizas ingeridas en la dieta. Las concentraciones plasmáticas determinadas en varios estudios reflejan valores medios de 0,33 nmol/ml de luteína y zeaxantina, 0,21 nmol/ml de β -cryptoxantina, 0,47 nmol/ml de licopeno, 0,08 nmol/ml de α -caroteno y 0,03 nmol/ml de β -caroteno (Stahl *et al.*, 2002). Estos datos indican que los carotenoides son bastante biodisponibles.

Los carotenoides se encuentran en los tejidos vegetales formando parte del aparato fotosintético, disueltos en gotitas de aceite, en el caso de los frutos, o como sólidos unidos a membranas en forma semicristalina, como en el caso del tomate o la zanahoria. Estas diferencias en localización y forma afectan considerablemente a la absorción, y explican la aparentemente mayor absorción de β -caroteno a partir de los frutos anaranjados, donde se encuentra en gotitas de aceite, que a partir de las hortalizas de hoja, donde se encuentra formando parte del complejo sistema fotosintético (Stahl *et al.*, 2002).

Para los carotenoides, su localización en los tejidos y determinadas características físicas son más importantes como determinantes de la bioaccesibilidad que la forma química. Los ésteres de carotenoides con ácidos grasos, como en el caso de la luteína y la cryptoxantina presentes en algunos frutos (ej., melocotón, papaya, pimiento, etc.), se hidrolizan en el lumen intestinal antes de ser absorbidos, muy probablemente mediante esterasas segregadas por el páncreas. Sin embargo, parece que la esterificación no influye en la extensión de la absorción, a no ser que la cantidad de grasa presente pueda afectar a este proceso (Roodenburg *et al.*, 2000).

El procesado de los alimentos es el que tiene más relevancia en aumentar la bioaccesibilidad de los carotenoides. La transferencia de los carotenoides a la fase lipídica durante el procesado (ej., cocción en presencia de aceite) o disrupción de la arquitectura celular y ruptura de las células (ej., durante la masticación) tiene efectos medibles en la disponibilidad de los carotenoides para ser absorbidos. Estudios utilizando simulación de la digestión gastrointestinal han demostrado una muy baja bioaccesibilidad para los carotenoides de la zanahoria cruda (<1%), pero ésta aumenta hasta un 25% si las zanahorias son masticadas intensamente. Para zanahorias cocidas ligeramente masticadas fue de un 5%, pero mediante la elaboración de pasta de zanahoria ésta aumentó hasta casi el 60%. Para las espinacas (hojas de espinaca congelada ligeramente cocinadas) y tomates crudos la bioaccesibilidad de los carotenoides fue del 12 y el 21%, respectivamente, mientras que la bioaccesibilidad del β -caroteno en pasta de tomate alcanzó más del 80%. En el caso de la luteína, ésta fue bioaccesible en un 21% en el caso de las espinacas ligeramente cocinadas, y en el caso del licopeno fue tan baja como el 1% en tomates frescos o en conserva.

En el caso del β -caroteno, la degradación enzimática de la estructura de la pared celular de la espinaca condujo a una mayor biodisponibilidad, pero el mismo efecto no se observó en el caso de la luteína. La biodisponibilidad del licopeno de los tomates es mayor en tomates hervidos y/u homegeneizados que a partir de tomates enteros. Sin embargo, el efecto directo del procesado sobre los carotenoides debe ser también considerado. Los tratamientos térmicos de alimentos que contienen carotenoides conducen a una transformación parcial de los isómeros *trans* en la forma *cis*. Aunque los isómeros *cis* son aparentemente mejor incorporados en las micelas que los *trans*, no hay evidencia de una mayor absorción en humanos de los isómeros *cis* respecto a los *trans*, como se ha demostrado en el caso del β -caroteno (Levin *et al.*, 1994). De hecho, algunos estudios han mostrado una mayor absorción de los isómeros *trans* (Stahl *et al.*, 1993).

La acidez gástrica también juega un papel importante en la transformación *trans-cis* del licopeno. Se ha sugerido una acumulación preferencial de los isómeros *cis* en plas-

ma, isómeros producidos por el tratamiento térmico y la acidez del estómago, transformación que se produce con mayor intensidad y rapidez que en el caso del β -caroteno (Holloway *et al.*, 2000). Estudios más recientes han demostrado que la isomerización se produce aparentemente tras la absorción.

El factor más importante de la dieta que afecta a la disponibilidad de los carotenoides es la co-ingestión de grasas. Dietas ricas en grasa frente a dietas pobres en grasa han puesto de manifiesto este requisito. Sin embargo, esta afirmación no es válida para todos los carotenoides. La presencia de fibra dietética también puede afectar a la absorción de carotenoides, pues puede afectar a la formación de micelas y a las condiciones de absorción presentes alrededor de las microvellosidades intestinales.

Fitosteroles

Los esteroides vegetales, también conocidos como fitosteroles, agrupan a unos 250 compuestos, de los que los más comunes son el sitosterol, el stigmasterol y el campesterol. Los estanoles son análogos estructurales en los que el doble enlace presente se encuentra hidrogenado, de forma similar al colesterol (figura 1). Todos estos compuestos son análogos estructurales del colesterol, del que difieren en su cadena lateral. Estos compuestos y sus glicósidos y ésteres juegan un papel importante en la estructura y función de las membranas vegetales, de una forma similar al colesterol en células animales.

La dieta humana incluye actualmente unos 200-300 mg/día de esteroides vegetales. Se sabe que cuanto mayor es la ingesta de esteroides vegetales, menor es la absorción del colesterol y menores los niveles plasmáticos de colesterol.

Se ha demostrado que el consumo de ésteres de estanol en forma de margarina o mayonesa puede llegar a reducir en un 10-15% el colesterol sérico (Miettinen y Gylling, 1998).

Estas observaciones han renovado el interés en la investigación sobre los esteroides vegetales, así como los intentos para desarrollar alimentos funcionales, especialmente aquellos con un contenido incrementado en esteroides vegetales para disminuir el colesterol sérico, pues éste se correlaciona con la formación de placas de ateroma y la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Por estos motivos es interesante conocer las principales fuentes de fitosteroles.

En general, los aceites vegetales y los productos derivados de aceites son considerados las principales fuentes de esteroides, seguidos de los cereales y los frutos secos. La

ingesta diaria depende del tipo de alimentación, pero puede ser tan alta como un gramo diario en el caso de algunos vegetarianos. El contenido de los aceites vegetales se encuentra en el rango de 1 a 15 gramos de fitosteroles por kilogramo de aceite. El contenido total de esteroides en maíz, centeno, trigo, cebada y avena es de 1.780, 1.100, 760, 830 y 520 mg/Kg, respectivamente, principalmente en la forma de sitosterol.

Debido a su alto contenido en agua, las frutas y hortalizas no son generalmente consideradas una fuente tan buena de esteroides como son los cereales. Sin embargo, algunos productos sí que aportan cantidades significativas a la dieta. Por ejemplo, en el caso de las hortalizas se han descrito contenidos entre 250 y 4.100 mg/Kg de peso seco, siendo la coliflor la hortaliza más rica. El contenido en frutas se encuentra entre 60 y 2.900 mg/Kg de peso seco, habiendo excluido de las porciones comestibles semillas y pieles, que suelen ser bastante más ricas en estos compuestos.

Existe una base de datos del US Department of Agriculture en la que se recoge el contenido en esteroides de diferentes alimentos, destacando el contenido de los cacahuets y almendras, que contienen 2,20 y 1,43 g/Kg, respectivamente.

El principal efecto metabólico de los esteroides vegetales de la dieta es la inhibición de la absorción y la consecuente estimulación compensatoria de la biosíntesis del colesterol. El efecto final es la disminución de los niveles de colesterol sérico debido al incremento en la eliminación de colesterol en las heces. Los ésteres de esteroides son hidrolizados eficazmente por las enzimas de la parte superior del intestino y transferidos a la fase micelar. Cuanto mayor es el contenido de esteroides en la fase micelar, mayor es la cantidad de colesterol que se queda en la fase oleosa, retardando su transferencia a la fase micelar y, consecuentemente, su absorción final. Éste parece ser el mecanismo por el cual se inhibe la absorción del colesterol por los estanoles, y podría también aplicarse a los esteroides vegetales.

Estudios llevados a cabo con humanos indican que la cantidad ingerida de fitosteroides en la dieta está inversamente relacionada con la absorción de colesterol y con el LDL-colesterol sérico. En los setenta ya se demostró, mediante experimentos con estanoles en animales modelo, que estos metabolitos son virtualmente inabsorbibles, inhiben la absorción del colesterol y disminuyen el colesterol sérico más eficientemente que los esteroides. Éstos también reducían los niveles séricos de esteroides vegetales, su acumulación en tejidos y la formación de ateromas (Sugano *et al.*, 1976, 1977; Ikeda *et al.*, 1981).

La aplicación de estanoles vegetales libres en humanos reveló su potencial para disminuir el colesterol sérico con dosis relativamente pequeñas y seguras (1,5 g/día), dando

lugar al desarrollo de los ésteres de estanoles liposolubles a comienzos de los noventa, y actualmente se encuentran en el mercado en forma de margarinas y derivados de lácteos. Un requisito para la actividad es que sean liposolubles, y tanto los ésteres de estanoles y los ésteres de esteroides son altamente liposolubles y producen este efecto.

Compuestos azufrados

Glucosinolatos (Brassicaceas)

Los glucosinolatos sólo se encuentran en un número restringido de plantas del orden Capparales y más del 80% han sido identificados en la familia Brassicaceae, y especialmente en el género *Brassica*. Éstos son de gran importancia como hortalizas (coles, coliflores, brócoli, coles de Bruselas, etc.). Se ha publicado una revisión extensa sobre la distribución de glucosinolatos en plantas (Fahey *et al.*, 2001). El perfil de glucosinolatos y sus concentraciones dependen de la especie y de la variedad, el tipo de tejido, la edad fisiológica del mismo, la salud del tejido, las prácticas agronómicas y la nutrición de la planta. Los niveles en tejidos reproductivos (flores y semillas) son muy superiores (hasta un 10% del peso seco) a los de los tejidos vegetativos (1-5.000 ppm) (Rosa *et al.*, 1997; Mithen *et al.*, 2000).

La gran variabilidad biológica de los tipos de glucosinolatos y la concentración en el material vegetal de partida, junto con los efectos del almacenamiento y el procesado, y una amplia pero no ubicua distribución en la dieta de los humanos, hacen muy difícil llevar a cabo una estimación de la ingesta diaria de estos compuestos. Ésta se ha estudiado recientemente para la glucobrasicina y la neoglucobrasicina en la población finlandesa y danesa, mediante una estimación de la ingesta diaria de hortalizas de la familia Brassicaceae. La ingesta de los daneses se ha estimado en una media de 5 mg y 0,5 mg de glucobrasicina y neoglucobrasicina respectivamente al día; la dieta finlandesa es de sólo 2,5 mg y 0,3 mg, respectivamente (Vang y Dragsted, 1996). Estos valores pueden ser excedidos fácilmente en determinados individuos y, por el contrario, parte de la población, que no le gusta el sabor característico de los productos de degradación de los glucosinolatos, puede no ingerirlos en absoluto.

En relación con la digestión y absorción no hay datos fiables sobre el destino de estos metabolitos en sangre, ya que los isotiocianatos, los principales metabolitos de degradación de los glucosinolatos, reaccionan con los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino y, por tanto, se unen al glutatión, proteínas plasmáticas, sulfhidrilos celulares y proteínas.

Estudios con animales, utilizando diferentes especies, muestran sólo una baja recuperación de glucosinolatos intactos y productos asociados de degradación en heces, sugiriendo una sustancial absorción, distribución y metabolismo. Además, se ha demostrado que la absorción de glucosinolatos intactos no depende necesariamente de la degradación microbiana en el colon y, por tanto, estos compuestos pueden pasar a través de la pared intestinal.

Ya que los glucosinolatos están embebidos en la matriz vegetal, la desintegración del tejido, la disolución de los glucosinolatos y la formación de sus productos de hidrólisis dependen grandemente de los siguientes factores (Stahl *et al.*, 2002):

- 1) Procesado del material vegetal que permita la liberación de la enzima que degrada los glucosinolatos, la mirosinasa, cuya concentración es elevada en el material vegetal fresco.
- 2) Calor, especialmente el cocinado en microondas, que inactiva la mirosinasa.
- 3) La extensión de la degradación de las estructuras celulares con la masticación.
- 4) La digestión gástrica.
- 5) Procesos intestinales.
- 6) Fermentación colónica.

No se conoce en profundidad el efecto del procesado, la masticación y las condiciones fisiológicas del aparato digestivo sobre estas sustancias. La digestión de otros constituyentes de la comida conduce a una mayor disponibilidad de grupos hidroxilo, sulfhidriilo y amino libres que podrán unirse de manera extensiva a los isotiocianatos liberados.

La absorción de los glucosinolatos intactos es muy pequeña, pues son moléculas bastante hidrófilas y con un pKa bastante bajo, lo que haría tan sólo posible su absorción por difusión pasiva en el estómago.

La disponibilidad de los isotiocianatos en los tejidos es aproximadamente seis veces mayor que la de los glucosinolatos que los originan. A diferencia de los compuestos de partida, los isotiocianatos no tienen grupos ácidos o básicos, y su absorción no encontró un nivel de saturación, lo que apoyó su difusión pasiva. Su naturaleza química está de acuerdo con una absorción por difusión pasiva.

La principal actividad biológica se debe a los isotiocianatos. Éstos, como productos de degradación de los glucosinolatos, son los compuestos activos *in vivo*. Estas sus-

tancias eran consideradas bociógenas y mutagénicas en el pasado. Sin embargo, estudios epidemiológicos como el llevado a cabo por The World Cancer Research Fund (1997), concluyeron que dietas ricas en hortalizas de la familia Brassica-ceae (la principal fuente de glucosinolatos en la dieta) protegen específicamente frente a cánceres de colon, recto y tiroides, y cuando son consumidas dentro de una dieta rica en otras frutas y hortalizas, también frente a otros tipos de cáncer, y son consistentes con estudios en modelos animales que indican el papel anticarcinogénico de los isotiocianatos. Parece ser que el efecto que ejercen se debe a un bloqueo de la acción de los carcinógenos, antes de producir un daño en el ADN (efecto de bloqueo). También se ha demostrado un efecto supresor que puede llevar a cabo su efecto anticancerígeno tiempo después de haber sido ingerido el carcinógeno. Estos efectos parecen estar relacionados con la modulación de la actividad de las enzimas de Fase I y Fase II, responsables del metabolismo de los carcinógenos.

Compuestos azufrados de las Alliaceas

Merecen mención especial los compuestos azufrados de las plantas de la familia Alliaceae (ajo, cebolla, puerro, etc.). Por los estudios realizados y por la abundancia de estos compuestos, la fuente más representativa es el ajo. En el ajo destacan compuestos como la alicina, el dialil sulfuro, la aliína, la S-alil-cisteína (SAC) y la S-alil-mercapto-cisteína, entre otros (figura 1). El más abundante es la aliína (alrededor de 4 mg/g), la cual, como consecuencia del procesado del ajo en fresco (corte, trituración...), se convierte (en la presencia de la enzima aliinasa, presente también en el propio ajo) en alicina, la cual a su vez también puede degradarse para dar lugar a diferentes compuestos azufrados como el dialil sulfuro, dialil disulfuro, etc. Por tanto, el procesado puede influir críticamente en la composición de estos organosulfurados del ajo, y se ha constatado que el contenido de éstos varía sustancialmente según hablemos de aceite esencial de ajo (sin alicina), polvo de ajo (sin alicina), extracto de ajo envejecido (rico en SAC), etc.

Los potenciales beneficios del ajo han sido reconocidos desde hace más de 5.000 años. Culturas como las de los fenicios, babilonios, egipcios, etc., lo usaban como remedio para enfermedades de la piel, estados febriles, síntomas de envejecimiento, etc. (Block, 1985). El ajo no es habitualmente consumido crudo, sino cocinado, formando parte de diferentes platos, tradicionalmente más comunes en países del área mediterránea, donde se usa como condimento saborizante. Sin embargo, el consumo de ajo en forma de suplementos se encuentra muy extendido. De hecho, es el suplemento más consumido en Estados Unidos (el 28% del total de nutraceuticos consumidos), más del doble que algunos productos tan conocidos como el Ginseng (Wyngate, 1998).

La principal actividad biológica atribuida a los compuestos azufrados del ajo ha sido la de conferir protección frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (disminuye el riesgo de trombosis, favorece la circulación y mejora el perfil de marcadores de riesgo cardiovascular). Sin embargo, también son conocidas otras actividades atribuidas a estos organosulfurados no menos importantes: actividad bactericida, hipoglucémica, antimicótica, antioxidante y anticancerígena. A pesar del gran número de publicaciones científicas que avalan estos efectos beneficiosos (ensayos *in vitro*, en animales, clínicos en humanos y epidemiológicos), sin embargo, sí existen discrepancias a la hora de discernir cuál o cuáles de estos constituyentes (o sus derivados, como consecuencia del procesado) son los responsables de los beneficios asociados a la ingesta de ajo. Varios estudios clínicos avalan el poder del ajo para bajar los niveles de colesterol en el hombre (10% de disminución con la ingesta de un diente de ajo al día), lo cual llevó a una concienciación pública de los efectos beneficiosos del ajo (Warshafsky *et al.*, 1993). Sin embargo, otros estudios han puesto de relieve que no todos los preparados formulados con ajo presentan estas propiedades, lo cual se explica por la conversión-degradación de estos compuestos como consecuencia del procesado y almacenamiento del ajo (corte, secado, temperatura de almacenamiento, etc.), pudiendo, además, influir otros componentes de la dieta en el efecto último de estos constituyentes. Por ejemplo, existen ensayos que demuestran la disminución de cáncer de mama en ratas tras la ingesta de ajo crudo (más del 60% de disminución). Sin embargo, la cocción de los ajos elimina por completo este potencial anticancerígeno (Amagase *et al.*, 1993).

A pesar de los contrastados efectos promotores de la salud de los constituyentes azufrados del ajo, su absorción y biodisponibilidad no ha sido aún totalmente elucidada. Sí se sabe que la alicina no se absorbe (no se detecta en plasma ni orina), sino que queda “atrapada” en la pared intestinal, donde es degradada (Freeman y Kodera, 1995), por lo que actualmente se acepta que el efecto beneficioso no se puede atribuir a la alicina *per se*. Tampoco se ha detectado dialil sulfuro ni dialil disulfuro en plasma u orina. Sin embargo, numerosos estudios coinciden en apuntar a la S-alil-cisteína (SAC) como marcador de exposición de ingesta de ajo, pues se ha detectado de manera dosis-dependiente en plasma y orina tras consumo de ajo en humanos. Por tanto, se puede decir que el consumo de ajo es beneficioso para la salud, pero que la biodisponibilidad y metabolismo de sus compuestos azufrados constituye aún una asignatura pendiente (Amagase *et al.*, 2001). Sin embargo, no es éste el único aspecto poco conocido en cuanto al consumo de ajo. Los estudios preclínicos y clínicos recomiendan el consumo de ajo durante largo tiempo para que los potenciales efectos para la salud tengan lugar. Además, su consumo en forma de nutracéutico se encuentra muy extendido. De estos dos últimos aspectos surge la necesidad de ampliar las investigaciones relacionadas con la posible toxicidad derivada del alto consumo durante largo tiempo.

Además, hay que considerar que los preparados comercializados derivados del ajo varían sustancialmente en su composición de compuestos azufrados, lo que complica aún más el tema. El excesivo consumo de ajo se ha asociado a determinados desórdenes tales como asma, dermatitis, dolor de estómago, diarrea, etc. Existen preparados comerciales encapsulados que liberan alicina directamente al intestino, lo cual se ha sugerido como potencialmente peligroso, pues la alicina puede ser pro-oxidante a alta concentración y también dañar la mucosa intestinal (Kodera, 1997). La nota optimista en el potencial de los compuestos azufrados como posibles ingredientes de alimentos funcionales o nutraceuticos la constituye la S-alil-cisteína (SAC), la cual, aparte de su contrastada biodisponibilidad y actividad biológica, no presenta efectos adversos y es mucho menos tóxica que la alicina o el dialil disulfuro a dosis altas (Amagase *et al.*, 2001).

Por tanto:

- 1) El ajo posee muchos efectos beneficiosos, descritos desde tiempos remotos y avalados por numerosos estudios epidemiológicos y clínicos. Hoy día, se acepta el potencial cardioprotector y anticancerígeno asociado al consumo habitual de ajo.
- 2) La química del ajo es compleja, y la calidad y composición de los preparados derivados del ajo se ven afectadas críticamente por la manipulación y el procesado industrial.
- 3) La alicina, organosulfurado abundante y característico, no puede justificar el efecto beneficioso asociado al consumo de ajo.
- 4) La aparente controversia que puede observarse en la distinta eficacia de los suplementos de ajo puede deberse al distinto procesado al que se ven sometidos, pues puede implicar un cambio sustancial en su composición cuali y cuantitativa de constituyentes azufrados.

III.4. Relevancia de la biodisponibilidad y el metabolismo

Para poner de manifiesto los mecanismos de acción de los antioxidantes y otras sustancias bioactivas no-nutricionales presentes en los alimentos, su papel en la prevención de enfermedades y su posibilidad de incorporación como ingredientes de alimentos funcionales, es crucial conocer los factores que afectan a su liberación desde las

matrices alimentarias que los contienen, en qué extensión son absorbidos y su destino en el organismo (interacción con los tejidos diana). Todos estos temas son incluidos bajo la etiqueta de biodisponibilidad, un término que ha sido tomado del campo de la farmacología, donde fue originariamente un concepto de la “proporción y extensión de un principio activo determinado que alcanza el sitio de acción”. Este concepto es generalmente física y éticamente inalcanzable en humanos, con el resultado de que la definición farmacológica ha sido redefinida como “la fracción de una determinada dosis oral (compuesto original o sus metabolitos) de una preparación determinada que alcanza la circulación sistémica” (Stahl *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista de la nutrición, la biodisponibilidad se expresa como la porción de la dosis ingerida que es excretada en orina, comparada con la excretada en heces (Rechner *et al.*, 2002).

A pesar de la dificultad práctica de cuantificar la llegada de determinados constituyentes de alimentos a lugares específicos donde puedan ejercer su actividad biológica, muchos investigadores en nutrición han resaltado su importancia y lo han incluido en el concepto de biodisponibilidad. Hay autores que consideran que una vez que un determinado compuesto es absorbido es inevitablemente bioactivo, independientemente de si es o no químicamente inerte *in vivo*. Por tanto, el concepto de biodisponibilidad no se puede separar de la bioactividad, sino que la incluye (Stahl *et al.*, 2002). Esta propuesta ha sido construida sobre las siguientes consideraciones:

- 1) Cualquier compuesto que entra en el sistema altera la concentración de estas sustancias, lo que tendrá un impacto en la concentración de otros metabolitos y puede ser, por tanto, considerado bioactivo (ej., tiene un efecto en el metabolismo).
- 2) Concentraciones de compuestos que no son biológicamente esenciales (ej., carcinógenos, toxinas fúngicas, constituyentes minoritarios de plantas) son biodisponibles, y por tanto bioactivos, pues tienen un impacto metabólico, incluso si éste es sólo la estimulación de los procesos de detoxificación y la utilización de energía para su excreción.

Por tanto, algunos autores han considerado que un compuesto que es absorbido será bioactivo, ya que tiene consecuencias metabólicas, aunque esta actividad puede variar extraordinariamente en su impacto (Stahl *et al.*, 2002). El concepto de “biodisponibilidad” incorpora, por tanto:

- i) Disponibilidad para su absorción o “bioaccesibilidad” (también conocido como “disponibilidad”).

- ii) Absorción.
- iii) Distribución en tejidos.
- iv) Bioactividad.

Es importante resaltar que los antioxidantes no necesitan entrar en la circulación sistémica para ser bioactivos. De hecho, muchos de estos compuestos pueden jugar un papel relevante limitando el daño potencial causado por los radicales libres o el estrés oxidativo en el tracto gastrointestinal sin ser necesariamente absorbidos. Es posible que los antioxidantes presentes en el colon protejan las células epiteliales intestinales de la oxidación y, por tanto, reducir el daño oxidativo del ADN. Poco se conoce sobre los procesos de oxidación en el ambiente del colon y, por tanto, parece claro que debe haber una considerable capacidad antioxidante en la digesta. La relación entre la protección del cáncer de colon y esta capacidad antioxidante merece un estudio detallado.

Absorción y distribución en tejidos

Un compuesto antioxidante de un alimento se ve sometido a las siguientes fases durante su tránsito por el organismo humano: ingestión, cambios en el lumen del aparato digestivo, absorción y distribución.

Las técnicas de análisis instrumental disponibles hoy en día permiten describir la complejidad de la naturaleza química de los alimentos con niveles cada vez mayores de sensibilidad y precisión. Sin embargo, los tipos y cantidades de compuestos antioxidantes en los alimentos consumidos pueden tener muy poco que ver con la contribución a la salud. Esto se explica porque sólo una porción (frecuentemente muy variable, dependiendo de la matriz de alimento, el procesado y el almacenamiento) de estos constituyentes es absorbida y utilizada. La comprensión del concepto de biodisponibilidad es esencial para todos los implicados en la producción de alimentos funcionales, la valoración nutricional y la determinación de la relación entre dieta y salud.

Concepto de bioaccesibilidad

Ésta se define como la cantidad de un compuesto ingerido que está realmente disponible para su absorción en el tracto gastrointestinal. Es, por tanto, una integración de todos los eventos lumenales. La cantidad que se vuelve bioaccesible puede ser igual o menor que la cantidad de antioxidante liberado desde la matriz del alimento, ya que

no toda puede convertirse en especies absorbibles, parte puede transferirse a especies no-absorbibles, parte puede interactuar con otros componentes del lumen gastrointestinal transformándose en no-absorbible.

Para que los antioxidantes y otros constituyentes de los alimentos sean absorbibles deben ser liberados de la matriz del alimento, y alcanzar las microvellosidades del intestino delgado en una forma que puedan ser absorbidos por el enterocito por difusión pasiva o por los sistemas de transporte activo. Se puede entonces producir una modificación metabólica, transformación, o almacenamiento en el enterocito antes de su secreción en una forma biocompatible a través de membrana basal del enterocito, sea en la sangre portal (constituyentes solubles en agua) o en la linfa torácica (compuestos liposolubles). Difusión pasiva paracelular, a través de las uniones intercelulares, también se puede producir, pero ésta no es una ruta principal de absorción.

Éste es un proceso complejo que depende de un gran número de variables que incluye:

- 1) Estado del alimento (ej., crudo o procesado).
- 2) Tamaño de partícula.
- 3) Modo de disgregación (rotura o separación de células).
- 4) Enzimas digestivas y productos de digestión.
- 5) Composición de la comida (ej., grasa/carbohidratos/proteína).
- 6) Presencia de ácidos/sales biliares.
- 7) Tiempo.

Todo esto tendrá efecto sobre la forma en que un constituyente determinado es liberado a la circulación sistémica y a su destino metabólico.

A pesar de esta complejidad, la mayor parte de la absorción se produce normalmente en el primer tercio del íleon, pues el resto se dedica a recuperación de nutrientes y señalización endocrina para regular el vaciado gástrico y los procesos digestivos. Diferentes elementos del proceso de digestión y absorción afectarán a la absorción de distintos compuestos (ej., la estructura del alimento y la penetración de enzimas digestivas pueden ser limitantes en la velocidad de liberación de los componentes a partir de la pared celular vegetal).

Biodisponibilidad y metabolismo

Los constituyentes bioactivos no-nutricionales de los alimentos que han mostrado un posible papel en la disminución del riesgo de padecer determinadas enfermedades en estudios llevados a cabo *in vitro*, sólo podrán tener aplicación real si alcanzan los tejidos donde han de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Es, por tanto, esencial conocer la absorción y el metabolismo de estos compuestos en el organismo humano mediante estudios de su biodisponibilidad *in vivo*.

Como ya se ha mencionado, la biodisponibilidad, desde el punto de vista de la nutrición, se expresa frecuentemente como la proporción de la dosis ingerida que es excretada en orina (Rechner *et al.*, 2002). Sin embargo, los compuestos liposolubles no serán directamente excretados en orina, sino que aparecerán como metabolitos hidrosolubles de los mismos. Principalmente, en el caso de compuestos liposolubles, parte de estas sustancias pueden almacenarse en los tejidos adiposos, de forma que la ingesta menos la excreta no reflejará la historia real del destino biológico de estos metabolitos. Tanto el contenido plasmático como el urinario de un compuesto determinado pueden ser usados para reflejar su absorción en el tracto gastrointestinal. Muchos compuestos son muy metabolizados, y su biodisponibilidad total se ve reflejada en la cantidad del compuesto de partida más la de todos sus metabolitos. Muchos compuestos pueden sufrir una gran modificación en el tracto gastrointestinal antes de la absorción inicial o tras la excreción biliar previa a la reabsorción, posterior metabolismo, posible degradación y para terminar con la excreción. Los flavonoides, por ejemplo, no son muy solubles ni en solventes orgánicos ni acuosos y se encuentran presentes generalmente en alimentos en combinaciones con azúcares en forma de glicósidos, que son más solubles que las correspondientes agliconas, y que pueden necesitar una hidrólisis enzimática de la porción glicídica mediante glicosidasas bacterianas o humanas antes de la absorción (Rechner *et al.*, 2002).

Las agliconas de estos compuestos pueden ser conjugadas por UDP-glucuronosiltransferasas para formas glucurónidos y por sulfotransferasas para dar lugar a sulfatos (Birt *et al.*, 2001). Éstos son mucho más fácilmente transportados en sangre y excretados en bilis u orina que sus correspondientes agliconas. El espectro de productos de conjugación depende de la especie e incluso del género. Estos metabolitos no son necesariamente inertes biológicamente. Queda mucho trabajo por hacer en la determinación del destino metabólico y la biodisponibilidad de muchas sustancias fitoquímicas específicas. La solubilidad y destino metabólico de los polifenoles debido a biotransformaciones endógenas y exógenas y la interacción con otros componentes de la dieta determinarán la biodisponibilidad de estas sustancias (Birt *et al.*, 2001).

Esta biodisponibilidad, en el caso de los polifenoles, puede ser muy diferente dependiendo del tipo de compuesto y de su estructura concreta. En general, se podría decir que los flavonoles pueden ser mucho menos biodisponibles que las isoflavonas. Estas sustancias se pueden encontrar en plasma en concentraciones micromolares, y los efectos biológicos de estos compuestos se deberían estudiar dentro de este rango de concentraciones para que tengan relevancia nutricional (Manach *et al.*, 2004).

Las isoflavonas, flavonoles y flavonas pueden ser conjugados rápidamente y principalmente con ácido glucurónico en la mucosa gastrointestinal. Conjugaciones posteriores pueden llevarse a cabo en el hígado, así como sulfataciones. También se han descrito metilaciones e hidroxilaciones en el caso de algunos polifenoles (Peterson *et al.*, 1998).

Las actividades biológicas de estos metabolitos pueden mantener las propias de los compuestos de partida o modificarlas sustancialmente (Zhang *et al.*, 1999).

La actividad biológica de los polifenoles también se puede ver considerablemente afectada por biotransformaciones por microorganismos del intestino grueso tras un proceso de fermentación bacteriana. Estos metabolitos podrían explicar la actividad de muchos constituyentes de la dieta *in vivo*. Las transformaciones microbianas de los polifenoles están sujetas a una considerable variabilidad dependiendo de los individuos, debido a diferencias en la flora microbiana del colon. Estas variaciones también se pueden ver influenciadas por el género.

Los constituyentes de la dieta que acompañan a los constituyentes bioactivos y la matriz del alimento en que se encuentran también pueden tener un efecto relevante en su biodisponibilidad y metabolismo. Por ejemplo, sería necesario conocer la capacidad de extracción de estos compuestos a partir de la matriz del alimento en las condiciones fisiológicas, su estabilidad y/o transformación química a los pHs fisiológicos y la acción de enzimas digestivas sobre estas sustancias y las estructuras de los tejidos vegetales en los que se encuentran muchas veces inmersos, etc. Esto está pendiente de estudio y recientemente se han desarrollado métodos *in vitro* para estudiar estos efectos, que ya han sido aplicados al caso de la fresa y la naranja (Gil-Izquierdo *et al.*, 2002).

Poco se conoce sobre las formas bioactivas de los metabolitos presentes en los alimentos *in vivo* y los mecanismos mediante los cuales estas sustancias pueden contribuir en la prevención de enfermedades. Aunque se han llevado a cabo muchos estudios sobre la biodisponibilidad de polifenoles, mediante el estudio de su absorción y formas conjugadas con glucurónido y con sulfato, etc., muy pocos se centran en el estudio de los

metabolitos mayoritarios formados *in vivo*, metabolitos que se forman tras la degradación de los constituyentes naturales por la acción de las enzimas de bacterias presentes en el colon y su posterior absorción. En un estudio reciente se ha investigado la relación entre los biomarcadores de biotransformación de los polifenoles de la dieta por las bacterias del colon y los polifenoles conjugados absorbidos. Los resultados disponibles muestran que la mayoría de los compuestos presentes *in vivo* derivan de productos de degradación por las bacterias y su posterior metabolismo en el hígado (Rechner *et al.*, 2002). Éstos incluyen los glucurónidos de los ácidos 3-hidroxifenilacético, homovanílico, vanílico, isoferúlico, 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico y 3-hidroxi-hipúrico, como es el caso de la quercetina. Por el contrario, los conjugados de polifenoles naturales, como en los glucurónidos de quercetina, naringenina y ácidos ferúlico, cafeico y sinápico, se detectan en niveles muy inferiores. Estos autores sugieren que estos productos de rotura deberían tener un papel fisiológicamente relevante como constituyentes bioactivos *in vivo*. Los estudios más recientes van encaminados a estudiar el papel biológico de los productos del metabolismo de los polifenoles. Un ejemplo muy ilustrativo de lo que le sucede a los polifenoles *in vivo* es el caso de las isoflavonas, que, como la daidzeína, son transformadas *in vivo* por las bacterias del colon en el metabolito equol, que posee una actividad estrogénica un orden de magnitud superior a la del metabolito de partida (figura 4) (Cassidy *et al.*, 2000). Algo parecido se produce en el caso de los lignanos que se encuentran presentes en muchas fibras dietéticas, que son transformados por la flora colónica en metabolitos con actividad estrogénica, como es el caso de la enterolactona y el enterodiol (Cassidy *et al.*, 2000).

III.5. Factores que afectan al contenido cuali y cuantitativo de sustancias fitoquímicas

En la selección de ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales resulta esencial definir los factores que influyen sobre su distribución y contenido en principios activos y el efecto sobre éstos del procesado y la conservación en los productos vegetales y los alimentos derivados de ellos. Por un lado, existen factores intrínsecos al propio vegetal (de origen genético), que llevan a que la composición en estas sustancias sea diferente no sólo entre distintos géneros o especies, sino incluso también entre variedades de un mismo producto. Como ejemplo, en el caso de las hortalizas, cabe citar el de la lechuga, en cuyas variedades *romana*, *iceberg* y *baby* existe un pobre contenido en sustancias fenólicas antioxidantes (flavonoles y derivados de ácido cafeico), al contrario de lo que ocurre en variedades como *hoja de roble* y, sobre todo, *Lollo rosso* (Ferrerres *et al.*, 1997). En el caso de las frutas se puede mencionar a las

manzanas, cuyo contenido en sustancias fenólicas (antocianos, flavonoles y procianidinas) varía considerablemente dependiendo de la variedad. Lo mismo se podría decir de los melones y el contenido en carotenoides, que sufre variaciones muy relevantes dependiendo de la variedad. Esta diferencia puede incrementarse aún más en función de los contenidos y actividad de las enzimas oxidativas presentes en distintas variedades, que pueden actuar sobre los constituyentes bioactivos y, en muchos casos, son responsables de la pérdida de calidad organoléptica y nutricional de alimentos derivados (Tomás-Barberán *et al.*, 2000; Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Esta variabilidad relacionada con la información genética abre grandes expectativas a la posibilidad de seleccionar variedades enriquecidas en algunos de estos constituyentes de interés para la protección de la salud, ya sea mediante técnicas de selección y mejora tradicionales o de ingeniería genética, que ya se están aplicando. Un ejemplo de estos avances es la obtención del *Golden Rice* (arroz dorado), capaz de biosintetizar y acumular en el grano cantidades importantes de β -caroteno (provitamina A), lo que le confiere un característico color amarillo y puede proporcionar grandes beneficios nutricionales a aquellas poblaciones que tienen una dieta basada en el arroz y un aporte de β -caroteno muy escaso. Otro ejemplo es la obtención de variedades de tomate que producen mayor cantidad de flavonoles antioxidantes, que, además, se acumulan en la parte carnosa del fruto, a diferencia de lo que ocurre en las variedades tradicionales, que sólo contienen pequeñas cantidades de flavonoles en la piel (Muir *et al.*, 2001). A la hora de introducir cambios que afectan a la composición química del vegetal hay, sin embargo, que tener en cuenta que un aumento excesivo en el contenido de alguna de estas sustancias no siempre es deseable, ya que, al tratarse de sustancias bioactivas, podría llevar a producir efectos tóxicos. De sobra son conocidos diferentes efectos tóxicos de determinadas sustancias fitoquímicas (D'Mello, 1997), incluido el consumo excesivo de flavonoides (Skibola y Smith, 2000).

Por otra parte, la composición en metabolitos secundarios bioactivos va a estar influida por factores extrínsecos al vegetal, ligados a sus circunstancias de cultivo (factores agronómicos) y a las condiciones de conservación tras la recolección. Así, se ha demostrado que la presencia o ausencia de determinados nutrientes en el suelo y el exceso o déficit de riego pueden afectar a la composición fitoquímica de las frutas y hortalizas, tanto cuali como cuantitativamente. Se sabe que el calcio, el boro y el contenido en sustancias nitrogenadas del suelo tienen un efecto decisivo sobre el contenido en sustancias fenólicas antioxidantes e influyen sobre su degradación por enzimas oxidativas (polifenoloxidasas) durante su posterior manipulación, conservación o procesado (Tomás-Barberán y Espín, 2001). El contenido en compuestos azufrados del suelo influye considerablemente sobre el contenido en glucosinolatos de las Brassicaceas y el de compuestos azufrados de los ajos y cebollas. El grado de madurez de las diferen-

tes frutas y hortalizas también influye de forma relevante sobre la composición fitoquímica, sin que exista un patrón de comportamiento general para todos los productos. Igualmente, el grado de iluminación e irradiación de las plantas y la temperatura de cultivo ejercen también una influencia importante sobre el contenido en sustancias fitoquímicas. Por ejemplo, se ha visto que la concentración de pigmentos antocianicos en la piel de las manzanas, granadas y la mayoría de las frutas pigmentadas con este tipo de metabolitos es notablemente superior en aquellos frutos que han crecido en zonas con temperaturas nocturnas más bajas; igualmente, una mayor tasa de insolación favorece la acumulación de antocianinas en el producto. El grado de irradiación con luz UV puede también afectar al contenido de resveratrol en las uvas y de cumarinas en los frutos cítricos (Cantos *et al.*, 2001).

Además de estos factores de tipo agronómico, se pueden producir cambios considerables en estos constituyentes durante la conservación tras la recolección. La conservación se lleva a cabo generalmente a bajas temperaturas, a las cuales suelen inducirse las enzimas responsables de la biosíntesis de algunas sustancias fitoquímicas, sobre todo las de naturaleza fenólica (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). Por esta razón, durante la conservación de determinadas frutas y hortalizas se puede producir en algunos casos un aumento en los contenidos de determinados constituyentes de interés para la salud. A veces, la conservación se lleva a cabo en condiciones específicas para disminuir la respiración y, consecuentemente, la actividad fisiológica del vegetal, lo que permite retrasar su maduración y su deterioro. Esto se consigue mediante el empleo de atmósferas controladas y la técnica MAP (*modified atmosphere packaging*), consistente en disminuir el contenido en oxígeno y aumentar el de anhídrido carbónico en el ambiente que rodea a los productos. Estos tratamientos, que ayudan a prolongar la vida comercial de las frutas y hortalizas, también poseen marcados efectos sobre el contenido en sustancias fitoquímicas, que en algunos casos disminuyen y en otros casos aumentan, dependiendo del tipo de producto y de las condiciones empleadas. Es conocido el efecto decolorador de antocianos, con la consiguiente pérdida de pigmentación, que se produce en la fresa cuando se almacena en presencia de concentraciones elevadas de CO₂ (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). En el caso de las lechugas frescas cortadas, el uso de atmósferas modificadas disminuye la biosíntesis de derivados del ácido cafeico, evitando, de este modo, el desarrollo del pardeamiento inducido por el corte que se produce cuando se almacenan ensaladas cortadas. También ejercen efectos interesantes los tratamientos postcosecha con ozono o con irradiaciones con luz UV o radiación gamma, que en la mayoría de los casos conllevan un incremento en la biosíntesis de sustancias fitoquímicas de interés en la salud. La irradiación con luz UV, por ejemplo, induce la acumulación del anticancerígeno resveratrol en la uva de mesa o para vinificación, lo que mejoraría sus propiedades protectoras de la salud (Cantos *et al.*, 2001).

III.6. Estrategias para la elaboración de alimentos funcionales

Para la elaboración de alimentos funcionales a los que se puedan asociar unas alegaciones sobre propiedades fisiológicas determinadas se pueden seguir una serie de estrategias que se pretenden resumir en este apartado, sin ser exhaustivos. Todas estas estrategias de selección y/o enriquecimiento, modificación o formulación siempre deberán completarse con los pertinentes estudios de actividad biológica *in vivo*, a ser posible en estudios clínicos, y con estudios de la potencial toxicidad o efectos indeseables del consumo continuado de estos alimentos. Estos estudios deberían llevarse a cabo con el alimento elaborado, y no será suficiente con estudios de corte farmacológico llevados a cabo con el principio activo aislado, pues la biodisponibilidad y, por tanto, la bioactividad de este principio dependen en muchas ocasiones de los ingredientes que lo acompañan en el alimento, o de otros constituyentes de la dieta.

Se pueden seguir determinadas estrategias encaminadas a conseguir los siguientes objetivos: mejorar el contenido o perfil de compuestos potencialmente bioactivos, mejorar su biodisponibilidad y mejorar su bioactividad.

Mejora del contenido o perfil de compuestos potencialmente bioactivos

La estrategia más sencilla de mejora del contenido o perfil de constituyentes bioactivos de un potencial alimento funcional se basa en la selección de las materias primas más idóneas, selección que en muchas ocasiones se puede llevar a cabo mediante sencillos análisis cromatográficos de los extractos obtenidos. Estos análisis permitirán seleccionar aquellas variedades de cultivo más ricas en determinados metabolitos bioactivos. Por otra parte, es necesario también evaluar el contenido en enzimas potencialmente degradantes de estos constituyentes, y optimizar sus condiciones de extracción e incorporación al alimento funcional de manera que se obtengan los mejores rendimientos. De poco servirá seleccionar como fuente de procianidinas una variedad de manzana determinada si a su vez es muy rica en polifenoloxidasas, lo que conducirá a la degradación de los constituyentes fenólicos potencialmente bioactivos si no se inactiva la enzima adecuadamente.

En algunas ocasiones se pueden llevar a cabo tratamientos físicos de los ingredientes para mejorar el contenido en determinados constituyentes bioactivos. Éste será el caso de los tratamientos de uvas con luz UV para incrementar su contenido en resveratrol (Cantos *et al.*, 2001, 2002). Este tratamiento permite incrementar considerablemente

el contenido en resveratrol y otros estilbenoides de las uvas, ya que la cantidad de estas sustancias que se encuentra naturalmente en estos frutos es muy baja y sólo tras someterlas a tratamientos de estrés se consigue estimular su biosíntesis, aumentando su contenido final de estilbenoides hasta miles de veces (dependiendo de la variedad), lo que permitiría utilizar estas uvas como ingredientes o materias primas para la elaboración de alimentos funcionales o nutracéuticos.

En muchos productos vegetales, un tratamiento térmico de duración e intensidad adecuadas permite aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos activos o simplemente ayuda a su liberación desde la matriz alimentaria. Éste sería el caso del ácido elágico, metabolito anticancerígeno de las fresas, que se encuentra en gran parte en forma ligada dentro de los aquenios y que mediante tratamientos térmicos se consigue aumentar la cantidad de ácido elágico libre y, por tanto, potencialmente bioaccesible (Gil-Izquierdo *et al.*, 2002).

Mejora de la biodisponibilidad

En otras ocasiones se pueden emplear estrategias para mejorar la biodisponibilidad de los principios activos. Éstas pueden incluir tratamientos físicos, como es el caso de los tratamientos térmicos, que al mejorar la bioaccesibilidad mejoran también la biodisponibilidad, como en el caso de la fresa descrito en el apartado anterior.

La adición de determinados ingredientes, como es el caso de grasas y aceites en las formulaciones, puede en algunos casos ser esencial para la biodisponibilidad, como en el caso de algunos carotenoides o de los fitosteroles mencionados anteriormente.

El empleo de modificaciones químicas de los metabolitos de partida es a veces necesario para mejorar su incorporación al alimento y su actividad *in vivo*. Éste es el caso de los fitosteroles, sobre los que es necesario su hidrogenación (transformación en estanoles) y combinación en forma de ésteres para optimizar su incorporación en margarinas, disminuyendo la absorción del colesterol.

Mediante determinados tratamientos enzimáticos también se puede mejorar la biodisponibilidad de determinados metabolitos bioactivos. Éste sería el caso del tratamiento de ramnosilglucósidos de flavonoles y flavonas, que son muy poco biodisponibles con ramnosidasas de origen fúngico para liberar los correspondientes glucósidos de flavonoles, que son mucho más absorbibles en el intestino delgado (Manach *et al.*, 2004). Este tipo de tratamiento ha sido aplicado con éxito a zumos de naranja y grosella ne-

gra y a extractos de té verde con transformaciones casi cuantitativas de los rutinósidos en los correspondientes glucósidos (González-Barrio *et al.*, 2004).

Otros tratamientos enzimáticos con enzimas hidrolíticas (pectinasas brutas) que permiten aumentar el contenido de agliconas libres de flavonas, compuestos mucho más biodisponibles que los correspondientes combinados glicosídicos, también son una estrategia potencial de aumentar la biodisponibilidad, siempre que se consiga estabilizar a las agliconas obtenidas, debido a que son sustancias más susceptibles a la oxidación y degradación que los glicósidos de partida. Se podrían emplear tecnologías de microencapsulación de estas agliconas para evitar su degradación hasta llegar al intestino delgado, donde se produciría su absorción.

Mejora de la bioactividad

La actividad biológica de muchos de los constituyentes no-nutricionales de los alimentos de origen vegetal se puede modular sustancialmente con pequeñas modificaciones estructurales como son la hidrogenación de un doble enlace o la introducción de un hidroxilo, en el caso de los fenoles. Éste es el caso de la transformación del tirosool en hidroxitirosool (Espín *et al.*, 2001) o de la transformación del resveratrol en piceatanol (Larrosa *et al.*, 2004). Recientemente se ha puesto a punto un procedimiento enzimático controlado, que aprovecha la actividad hidroxilasa de la enzima tirosinasa de champiñón para introducir un hidroxilo adicional en posición *orto* en el tirosool y en el resveratrol, controlando la actividad oxidasa que conduciría a la producción de quinonas y posteriormente a melaninas, mediante la adición de cantidades controladas de ácido ascórbico. Estos productos obtenidos mediante biotecnología enzimática pueden entonces ser incorporados a alimentos para mejorar sus propiedades funcionales (Larrosa *et al.*, 2003b, 2004).

III.7. Conclusiones

Los alimentos de origen vegetal proporcionan unos metabolitos con diferentes propiedades biológicas, siendo la actividad antioxidante la que ha recibido más atención en los últimos años. Sus estructuras químicas son muy variadas y cuando se ingieren como parte de la dieta se ha propuesto que pudieran tener un papel relevante en la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, como se desprende de estudios epidemiológicos y experimentaciones *in vitro* y en animales de experimentación. Sin embargo, son relativamente escasos los estudios clínicos que apoyen esta actividad. Estas sustancias

pueden ser empleadas como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales para dar lugar a alimentos similares a los productos lácteos con isoflavonas de la soja y a las margarinas con fitosteroles que ya se encuentran en el mercado. Por otra parte, los principios activos presentes en los alimentos son transformados en el organismo en metabolitos que en muchos casos poco tienen que ver con el compuesto de partida, sobre todo en aquellos procesos de metabolismo bacteriano que se llevan a cabo en el colon. Esta transformación metabólica afecta a la mayoría de los compuestos potencialmente bioactivos de los alimentos que no son absorbidos en el intestino delgado y que llegan al intestino grueso, donde son degradados por la flora colónica y sus metabolitos son entonces absorbidos a ese nivel. Es, por tanto, esencial estudiar la actividad biológica de estos metabolitos, que, como en el caso del equol o de los metabolitos de los lignanos, son los constituyentes bioactivos que alcanzan concentraciones fisiológicamente relevantes en los tejidos en los que deben ejercer su acción. Es igualmente importante estudiar las interacciones entre constituyentes de los alimentos durante los procesos de elaboración y durante su tránsito por el tracto gastrointestinal, y es necesario identificar las diferencias cualitativas y cuantitativas en estos constituyentes antioxidantes en diferentes variedades vegetales, el efecto del procesado y la elaboración de los alimentos funcionales, y la incidencia que diferentes factores pueden tener en la biodisponibilidad y bioactividad de estos constituyentes. Es, por tanto, preciso demostrar la actividad biológica para cada alimento específico, con unos estudios clínicos que deben reunir unos mínimos para ser aceptados científicamente, a la par que evaluar los posibles riesgos para la salud que podrían suponer los nuevos alimentos funcionales diseñados, de forma que se pueda evaluar el balance riesgo-beneficio que supone su consumo para la población.

III.8. Bibliografía

Amagase, H., y Milner, J.

(1993) Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* 14, 1627-1631

Amagase, H.; Petesch, B. L.; Matura, H.; Kasuga, S., e Itakura, Y.

(2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131, 955S-962S

Asensi, M.; Medina, I.; Ortega, A.; Carretero, J.; Bano, M. C.; Obrador, E., y Estrella, J. M.

(2001) Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic. Biol. Med.* 74, 227-232.

- Atkinson, C.; Compston, J. E.; Day, N. E.; Dowsett, M., y Bingham, S.A.**
(2004) The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 326-333.
- Aviram, M.; Dornfeld, L.; Rosenblat, M.; Volkova, N.; Kaplan, M.; Coleman, R.; Hayek, T.; Presser, D., y Fuhrman, B.**
(2000) Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1062-76.
- Aviram, M., y Dornfeld, L.**
(2001) Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158, 195-198.
- Banerjee, S.; Bueso-Ramos, C., y Aggarwal, B. B.**
(2002) Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res.* 62, 4945-54.
- Bertelli, A.; Bertelli, A. A.; Gozzini, A., y Giovannini, L.**
(1998) Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drug Exp. Clin. Res.* 24, 133-138.
- Birt, D. F.; Hendrich, S., y Wang, W.**
(2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90, 157-77.
- Block, E.**
(1985) Chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* 252, 94-99.
- Bonnefoy, M.; Drai, J., y Kostka, T.**
(2002) Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 31, 1174-1184.
- Cantos, E.; Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A.**
(2001) Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new "functional" fruit. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5052-5058.

Cantos, E.; Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A.

(2002) Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6322-6329.

Cassidy, A.

(1991) Plant oestrogens and their relation to hormonal status in women. Doctoral Thesis, Cambridge University, Cambridge, Inglaterra.

Cassidy, A.; Bingham, S., y Setchell, K. D. R.

(1994) Biological effects of isoflavones present in soy in premenopausal women: implications for the prevention of breast cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 333-340.

Cassidy, A.; Hanley, B., y Lamuela-Raventós, R. M.

(2000) Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1044-1062.

Castonguay, A.; Gali, H. U.; Perchellet, E. M.; Gao, X. M.; Boukharta, M.; Jalbert, G.; Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T., y Perchellet, J. P.

(1997) Antitumorigenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins and oligomeric anthocyanin and procyanidin. *Int. J. Oncol.* 10, 367-373.

Cerdá, B.; Cerón, J. J.; Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A.

(2003a) The Repeated Oral Administration of High Doses of the Pomegranate Ellagitannin Punicalagin to Rats for 37 Days is not Toxic. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3493-3501.

Cerdá, B.; Llorach, R.; Cerón, J. J.; Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A.

(2003b) Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur. J. Nutr.* 42, 18-28.

Cerdá, B.; Espín, J. C.; Parra, A.; Martínez, P., y Tomás-Barberán, F. A.

(2004) The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur. J. Nutr.* 43, 205-220.

Cerdá, B.; Tomás-Barberán, F., y Espín, J. C.

(2005) Metabolism of chemopreventive and antioxidant ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts and oak-aged wines in humans: Identification of biomarkers and individual variability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 227-235.

Dorai, T., y Aggarwal, B. B.

(2004) Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* 215, 129-140.

Col, N.; Eckman, M. N.; Karas, R. H.; Pauker, S. G.; Goldberg, R. J.; Ross, E. M.; Orr, R. K., y Wong, J. B.

(1997) Patient-specific decisions about hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J. Am. Med. Assoc.* 277, 1140-1147.

Day, A. J.; Canada, F. J.; Díaz, J. C.; Kroon, P. A.; Mclauchlan, R.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R., y Williamson, G.

(2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468, 166-170.

D'Mello, J. P. F.

(1997) Toxic compounds from fruit and vegetables. En *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*; Tomás-Barberán, F. A.; Robins, R. J. Eds.; Clarendon Press: Oxford, pp. 331-351.

Dragsted, L. O.; Strube, M., y Larsen, J. C.

(1993) Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.* 72, 116-35.

Engelhart, M. J.; Geerlings, M. I.; Ruitenber, A.; Van Swieten, J. C.; Hofman, A.; Witteman, J. C. M., y Breteler, M. M. B.

(2002) Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* 3287, 3223-3229.

Espín, J. C.; Soler-Rivas, C.; Cantos, E.; Tomás-Barberán, F. A., y Wichers, H. J.

(2001) Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1187-1193

Fahey, J. W.; Zalcmann, A. T., y Talalay, P.

(2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51.

Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillén, R., y Jiménez, A.

(2002) Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J. Agric. Food Chem.* 50, 6804-6811.

Ferrerres, F.; Gil, M. I.; Castañer, M., y Tomás-Barberán, F. A.

(1997) Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4249-4254.

Freeman, F., y Koderá, Y.

(1995) Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2332-2338.

Geleijnse, J. M.; Launer, L. J.; Van der Kuip, D. A. M.; Hofman, A., y Witteman, J. C. M.

(2002) Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 880-886.

Gescher, A. J., y Steward, W. P.

(2003) Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidem. Biomarker Prev.* 12, 953-957.

Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M., y Kader, A. A.

(2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581-4589.

Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla, P., y Tomás-Barberán, F. A.

(2002) An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 155-9.

González-Barrio, R.; Trindade, L. M.; Manzanares, P.; De Graaff, L. H.; Tomás-Barberán, F. A., y Espín, J. C.

(2004) Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6136-6142.

Harborne, J. B.

(1994) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1984*. Chapman and Hall, London.

Harris, G. K.; Gupta, A. M.; Nines, R. G.; Kresty, L. A.; Habib, S. G.; Frankel, W. L.; LaPerle, K.; Gallaher, D. D.; Schwartz, S. J., y Stoner, G. D.

(2001) Effects of lyophilized black raspberries on azoxymetane-induced colon

cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat. *Nutr. Cancer* 40, 125-133.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B., y Kromhout, D.

(1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342, 1007-1011.

Hertog, M. G. L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H., y Buzina, R.

(1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch. Intern. Med.* 155, 381-386.

Hertog, M. G. L.; Sweetman, P. M.; Fehily, A. M.; Elwood, P. C., y Kromhout, D.

(1997) Antioxidant flavonols and ischaemic heart disease in a Welsh population of men. The Caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1489-1494.

Hollman, P. C.; Bijlsman, M. N.; Van Gameren, Y.; Gnossen, E. P.; De Vries, J. H., y Katan, M. B.

(1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad. Res.* 31, 569-573.

Hollman, P. C. H., y Arts, I. C. W.

(2000) Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081-1093.

Hollman, P. C.; Van het Hof, K. H.; Tijburg, L. B., y Katan, M. B.

(2001) Addition of milk does not affect the absorption of flavonols from tea in man. *Free Rad. Res.* 32, 297-300.

Holloway, D. E.; Yang, M.; Papanga, G.; Rice-Evans, C. A., y Bramley, P. M.

(2000) Isomerization of dietary lycopene during assimilation and transport in plasma. *Free Rad. Res.* 32, 93-102.

Ikeda, L.; Kawasaki, A.; Samezima, K., y Sugano, M.

(1981) Antihypercholesterolemic activity of beta-sitosterol in rabbits. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 27, 243-251.

Jang, M., y Pezzuto, J. M.

(1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 65-77.

- Ju, Y. U.; Doerge, D. R.; Allred, K. F.; Allred, C. D., y Helferich, W. G.
(2002) Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of estrogen dependent human breast cancer (MCF-7) cells implanted in athymic mice. *Cancer Res.* 62, 2474-2477.
- Juan, M. E.; Vinardell, M. P., y Planas, J. M.
(2002) The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J. Nutr.* 132, 257-260.
- Kaplan, M.; Hayek, T.; Raz, A.; Coleman, R.; Dornfeld, L.; Vaya, J., y Aviram, M.
(2001) Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J. Nutr.* 131, 2082-2089.
- Keli, S.; Hertog, M.; Feskens, E., y Kromhout, D.
(1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, an incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch. Intern. Med.* 156, 637-642.
- Kim, N. D.; Mehta, R.; Yu, W., *et al.*
(2002) Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 71, 203-217.
- Knekt, P.; Järvinen, R.; Reunanen, A., y Maatela, J.
(1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *Brit. Med. J.* 312, 478-481.
- Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T., y Aromaa, A.
(2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560-568.
- Kodera, Y.
(1997) Dietary tolerance/absorption/metabolism of garlic. En: *Nutraceuticals: Designer Foods III Garlic, soy and licorice* (Lanchance, P., ed.), pp. 95-105. Food & Nutrition Press, Trumbell.
- Kresty, L. A.; Morse, M. A.; Morgan, C.; Carlton, P. S.; Lu, J.; Gupta, A.; Blackwood, M., y Stoner, G. D.
(2001) Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilised black raspberries. *Cancer Res.* 61, 6112-6119.

Kris-Etherton, P. M., y Keen, C. L.

(2002) Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 41-49.

Kuo, S. M.

(1996) Antiproliferative potency of structurally different dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 110, 41-48.

Lamuela-Raventós, R. M.; Romero-Pérez, A. I.; Waterhouse, A. L., y De la Torre-Boronat, M. C.

(1995) Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric. Food Chem.* 43, 281-283.

Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F. A., y Espín, J. C.

(2003a) Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J. Agric.- Food Chem.* 51, 4576-4584.

Larrosa, M.; Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A.

(2003b) Antioxidant capacity of tomato juice functionalized with enzymatically synthesized hydroxytyrosol. *J. Sci. Food Agric.* 83, 658-666.

Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F. A., y Espín, J. C.

(2004) The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *Eur. J. Nutr.* 43, 275-284.

Levin, G.; Benamotz, A., y Mokady, S.

(1994) Liver accumulation of soluble all trans or 9-cis beta-carotene in rats and chicks. *Comp. Biochem. Phys. A.* 107, 203-207.

Maciel, M. E.; Castro, G. D., y Castro, J. A.

(2004) Inhibition of the rat breast cytosolic bioactivation of ethanol to acetaldehyde by some plant polyphenols and folic acid. *Nutr. Cancer* 49, 94-99.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C., y Jiménez, L.

(2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.

Marrugat, J.; Covas, M. I.; Fito, M.; Schroder, H.; Miro-Casas, E.;

Gimeno, E.; López-Sabater, M. C.; De la Torre, R., y Farre, M.

(2004) Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation - a randomized controlled trial. *Eur. J. Nutr.* 43, 140-147.

Miksicek, R. J.

(1995) Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 201, 44-50.

Miettinen, T. A., y Gylling, H.

(1998) Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr. Opin. Lipidol.* 10, 9-14.

Miro-Casas, E.; Covas, M. I.; Farre, M.; Fito, M.; Ortuno, J.; Weinbrenner, T.; Roset, P., y De la Torre, R.

(2003) Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin. Chem.* 49, 945-952.

Mithen, R. F.; Dekker, M.; Verkerk, R.; Rabot, S., y Johnson, I. T.

(2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J. Sci. Food Agric.* 80, 967-984.

Morris, M. C.; Evans, D. A.; Bilenias, J. L.; Tangney, C. C.; Bennet, D. A.; Aggarwal, N.; Wilson, R. S., y Scherr, P. A.

(2002) Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *J. Am. Med. Assoc.* 287, 3230-3237.

Muir, S. R.; Collins, G. J.; Robinson, S.; Hughes, S.; Bovy, A.;

Ric de Vos, C. H.; Van Tunen, A. J., y Verhoeyen, M. E.

(2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruits containing increased levels of flavonoids. *Nat. Biotechnol.* 19, 470-474.

Omenn, G. S.

(1995) GAT accounts for the association of vegetables and fruits with lower incidence of cancers and coronary heart diseases. *Ann. Epidemiol.* 5, 333-335.

O'Neill, M. E.; Carroll, Y.; Corridan, B.; Olmedilla, B.; Granado, F.; Blanco, I.; Van Den, B. H.; Hininger, I.; Rousell, A. M.; Chopra, M.; Southon, S., y Thurnham, D. I.

(2001) A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br. J. Nutr.* 85, 499-507.

Peterson, T. G.; Ji, G. P.; Kirk, M.; Coward, L.; Falany, C. N., y Barnes, S.

(1998) Metabolism of the isoflavones genistein and biochanin A in human breast cancer cell lines. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1505S-1511S.

Rechner, A. R.; Kuhnle, G.; Bremmer, P.; Hubbard, G. P.; Moore, K. P., y Rice-Evans, C. A.

(2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 220-235.

Renaud, S., y De Lorgeril, M.

(1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary Heart disease. *The Lancet* 339, 1523-1525.

Rimm, E. B.; Katan, M. B.; Ascherio, A.; Stampfer, M. J., y Willet, W. C.

(1996) Relation between intake of flavonoids and risk of coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* 125, 384-389.

Roodenburg, A. J.; Leenen, R.; het Hof, K. H.; Westrate, J. A., y Tijburg, L. B.

(2000) Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not alpha-carotene, beta-carotene and vitamin E in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1187-1193.

Rosa, E. A. S.; Heaney, R. K.; Fenwick, G. R., y Portas, C. A. M.

(1997) Glucosinolates in crop plants. In: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*. Wiley, New York, pp. 99-215.

Santos-Buelga, C., y Scalbert, A.

(2000) Procyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1094-1117.

Serafini, M.; Bugianesi, R.; Maiani, G.; Valtuena, S.; De Santis, S., y Crozier, A.

(2003) Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 424, 1013.

Setchell, K. D. R., y Cassidy, A.

(1999) Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 129, 758S-767S.

Setchell, K. D. R.; Borriello, S. P.; Hukme, P.; Kirk, D. N., y Axelson, M.

(1984) Non-steroidal oestrogens of dietary origin: possible roles in hormone dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 569-578.

Shaheen, S. O.; Sterne, J. A.; Thomson, R. L.; Songhurst, C. E.;

Mergetts, B. M., y Burney, P. G.

(2002) Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1823-1828.

- Silva, I. I. S.; Mangtani, P.; McCormack, V.; Bhakta, D.; McMichael, A. J., y Sevak, L.
(2004) Phyto.oestrogen intake and breast cancer risk in South Asian women in England: Findings from a population-based case-control study. *Cancer Causes Control* 15, 805-818.
- Sinha, K.; Chaudhary, G., y Gupta, Y. K.
(2002) Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* 71, 655-665.
- Skibola, C. F., y Smith, M. T.
(2000) Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 375-383.
- Stahl, W.; Schwarz, W., y Sies, H.
(1993) Human serum concentrations of all-trans-beta and alpha.carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). *J. Nutr.* 123, 847-851.
- Stahl, W.; Van den Berg, H.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Fauks, R. M.; Gärtner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; Kelly, F. J.; Polidori, M. C.; Rice-Evans, C.; Southon, S.; Van Vliet, T.; Viña-Ribes, J.; Williamson, G., y Astley, S.B.
(2002) Bioavailability and Metabolism. *Mol. Aspects Med.* 23, 39-100.
- Steinberg, F. M.; Guthrie, N. L.; Villablanca, A. C.; Kumar, K., y Murray, M. J.
(2003) Soy protein with isoflavone has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy post-menopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 123-130.
- Steinmetz, K. A., y Potter, J. D.
(1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *J. Am. Diet Assoc.* 96, 1027-1039.
- Sugano, M.; Kamo, F.; Ikeda, I., y Marioza, H.
(1976) Lipid-lowering activity of phytosterols in rats. *Atherosclerosis* 24, 301-309.
- Sugano, M.; Morioka, H., e Ikeda, I. A.
(1977) A comparison of hypocholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitosterol in rats. *J. Nutr.* 107, 2011-2019.

- Talalay, P.; Fahey, J. W.; Holtzclaw, W. D.; Prester, T., y Zhang, Y.
(1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.* 82-83, 173-179.
- Tomás-Barberán, F. A.
(2003) Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud* 10, 41-53.
- Tomás-Barberán, F. A., y Clifford, M. N.
(2000) Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1073-1080.
- Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F., y Gil, M. I.
(2000) Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. En (Atta-ur.Rahman, ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, 23: 739-795, Elsevier, Amsterdam.
- Tomás-Barberán, F. A., y Espín, J. C.
(2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853-876.
- Vang, O., y Dragsted, L.
(1996) Naturally occurring antitumorogens - III. Indole. *Nordic Council of Ministers.*
- Visioli, F.; Caruso, D.; Plasmati, E.; Patelli, R.; Mulinacci, N.; Romani, A.; Galli, G., y Galli, C.
(2001) Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic. Res.* 34, 301-305.
- Visioli, F.; Galli, C.; Grande, S.; Colonnelli, K.; Patelli, C.; Galli, G., y Caruso, D.
(2003) Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* 133, 2612-2615.
- Visioli, F.; Caruso, D.; Grande, S.; Bosisio, R.; Villa, M.; Galli, G.; Sirtori, C., y Galli, C.
(2004) Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.* (En prensa.)
- Vissers, M. N.; Zock, P. L., y Katan, M. B.
(2004) Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 955-965.

- Waller, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M. H.; Oatis, J. E., y Walle, U. K.
(2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* (En prensa.)
- Warshafsky, S.; Kamer, R. S., y Sivak, S. L.
(1993) Effect of garlic on total cholesterol, a meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 119, 599-605.
- Wu, A. H.; Ziegler, R. G.; Hornross, P. L.; Nomura, A. M. Y.; West, D. W.; Kolonel, L. N.; Rosenthal, J. F.; Hoover, R. N., y Pike, M. C.
(1996) Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5, 901-906.
- Wyngate, P.
(1998) Phase one study survey of vitamins, minerals, herbs and supplements. Research conducted by Hartman and New Hope. *Natural Foods Merchandiser*, March, p. 14.
- Yu, C. L.; Swaminathan, B.; Butler, L. G., y Pratt, D. E.
(1986) Isolation and identification of rutin as the major mutagen of red wine. *Mutation Res.* 170, 13-113.
- Zafrilla, P.; Ferreres, F., y Tomás-Barberán, A.
(2001) Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3651-3655.
- Zhang, Y.; Song, T. T.; Cunnick, J. E.; Murphy, P. A., y Hendrich, S.
(1999) Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells in nutritionally relevant concentrations. *J. Nutr.* 129, 399-405.
- Zhang, X.; Shu, X. O.; Gao, Y. T.; Yang, G.; Li, Q.; Li, H.; Jin, F., y Zheng, W.
(2003) Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J. Nutr.* 133, 2874-2878.
- Zhuo, X. G.; Melby, M. K., y Watanabe, S.
(2004) Soy isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: A meta-analysis of 8 randomized controlled trials in humans. *J. Nutr.* 134, 2395-2400.

IV. Fibra dietética y antioxidantes en la dieta española y en alimentos funcionales

F. Saura-Calixto e I. Goñi

Unidad Asociada de Nutrición y Salud Gastrointestinal (UCM/CSIC)

Instituto del Frío. Dpto. Metabolismo y Nutrición (CSIC)

y Dpto. Nutrición I, Facultad de Farmacia (UCM)

IV.1. Resumen

IV.2. Introducción

IV.3. Paradojas nutricionales

IV.4. Fibra y compuestos bioactivos

Fibra

Compuestos antioxidantes y bioactivos

Compuestos polifenólicos

Carotenoides

Fitoesteroles

IV.5. Dieta española y mediterránea

Fibra en la dieta española

Antioxidantes y bioactivos en la dieta española

Capacidad antioxidante de la dieta española

IV.6. Parámetros para definición de dietas saludables y de dieta mediterránea

IV.7. Ingredientes funcionales

Fibra como ingrediente

Fibras dietéticas antioxidantes

Antioxidantes, fibra y suplementos dietéticos

IV.8. Criterios nutricionales para la elaboración de alimentos funcionales

IV.9. Limitaciones de las bases de datos y tablas de composición de alimentos

Referidas a fibra

Fibra y fracción indigestible

Referidas a antioxidantes

IV.10. Conclusiones e hipótesis

IV.11. Bibliografía

IV.1. Resumen

Fibra dietética y antioxidantes son los principales constituyentes de los alimentos que la investigación refiere como factores clave en la baja mortalidad asociada a las dietas ricas en alimentos de origen vegetal, especialmente frutas y verduras. El papel de estos compuestos en la salud se puso de manifiesto como consecuencia de diversas paradojas nutricionales observadas en poblaciones que no pueden explicarse a través de los nutrientes y energía de la dieta, algunas de las cuales se describen al comienzo de este capítulo.

Se realiza una breve descripción de las características principales de la fibra dietética, compuestos polifenólicos, carotenoides y fitoesteroles. A continuación se aborda el estudio de los mismos en el marco de la dieta española, presentando datos nuevos de ingesta de polifenoles totales y de fitoesteroles.

La literatura científica aporta información sobre la capacidad antioxidante de compuestos aislados y de alimentos, pero, paradójicamente, no existen datos de capacidad antioxidante de dietas completas, que son los de mayor interés en nutrición y salud. En este trabajo se incluye un estudio de los autores sobre la capacidad antioxidante total de la dieta española, con indicación de los alimentos que tienen una contribución significativa a la misma. Es el primero que se lleva a cabo en una dieta completa. Se concluye, contrariamente a lo esperado, que las bebidas —especialmente café y vino— de la dieta tienen una aportación muy superior a la de todos los alimentos vegetales sólidos.

Se proponen nuevos parámetros para la caracterización de factores asociados a las propiedades saludables de la dieta mediterránea, basados en los constituyentes bioactivos de los alimentos.

A continuación se describen los principales tipos de ingredientes funcionales del mercado, incluyendo fibra y compuestos bioactivos, y se incluyen criterios nutricionales para la elaboración de alimentos funcionales.

Por otra parte, se mencionan las limitaciones de las tablas de composición y bases de datos de alimentos referidas a fibra y compuestos bioactivos, debidas a las diferencias cualitativas y cuantitativas existentes entre los valores obtenidos por análisis químico y los realmente disponibles fisiológicamente. Ello es un factor limitante en estudios clínicos y epidemiológicos.

Finalmente, se relacionan una serie de conclusiones e hipótesis que tratan de resumir los aspectos principales de este capítulo.

IV.2. Introducción

El desarrollo económico, cultural y científico de nuestra sociedad ha llevado consigo un cambio muy importante en los hábitos alimentarios y también en el propio concepto de nutrición. En los países industrializados se consumen dietas con alta densidad calórica, ricas en grasas saturadas y azúcares añadidos y bajos consumos de carbohidratos complejos (oligo y polisacáridos) y fibra dietética. Todas estas características se acompañan de un descenso en la actividad física.

Existe evidencia científica de que la optimización de la dieta, combinada con un estilo de vida saludable, son factores fundamentales para disminuir la incidencia de enfermedades, especialmente cardiovasculares y cáncer. Se estima que el 50% de las enfermedades cardiovasculares y aproximadamente un tercio de los casos de cáncer se asocian con factores dietéticos.

La necesidad de disminuir la morbilidad y mortalidad por enfermedades crónicas y degenerativas ha tenido como consecuencia cambios en el propio concepto de nutrición. Hoy la nutrición debe tener en cuenta —además del contenido calórico y nutrientes de la dieta— otros constituyentes de los alimentos que tradicionalmente no han sido considerados nutrientes, pero que la investigación científica señala como esenciales para la prevención de las enfermedades más comunes en los países desarrollados. Son la fibra dietética y los compuestos bioactivos y antioxidantes —principalmente compuestos polifenólicos, carotenoides y fitoesteroles— objeto de este capítulo.

Existen numerosos estudios que muestran algún efecto o propiedad positivo en la salud de alimentos específicos (cereales integrales, avena, aceite de oliva, nueces, etc.) y de componentes aislados de alimentos (fibra, β -caroteno, licopeno, resveratrol, antocianinas, extractos antioxidantes, etc.), a veces publicitados en exceso por sectores económicos relacionados con su producción. No obstante, los resultados de estos estudios son frecuentemente contradictorios y no concluyentes. El único consenso unánimemente aceptado es la asociación del consumo de frutas y verduras con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y mortalidad por todas las causas.

Hoy existe la tendencia a considerar la fibra como nutriente y hay consenso para recomendar el incremento de su ingesta actual en los países desarrollados (alrededor de 20 g/persona/día) hasta cantidades del orden de 30 a 40 g. En cuanto a compuestos antioxidantes y bioactivos, el conocimiento científico actual respecto a aspectos básicos tales como consumo en poblaciones, biodisponibilidad y metabolismo es incompleto y no permite establecer recomendaciones de ingestas concretas de los mismos.

Las frutas y verduras son una fuente importante de fibra dietética, vitaminas antioxidantes y de centenares de compuestos bioactivos antioxidantes (compuestos fenólicos y carotenoides). Lo más razonable es pensar que las propiedades saludables de estos alimentos sean debidas a la acción sinérgica de todos los constituyentes, aunque todavía estamos lejos de poder establecer el grado de contribución específica de cada uno de ellos. Además, hay que tener en cuenta que otros alimentos vegetales (frutos secos, aceites vegetales, cereales, legumbres) y bebidas también contribuyen de forma significativa a la ingesta total de fibra y compuestos bioactivos.

Este capítulo se centra en fibra y antioxidantes como factores clave de nuestra dieta y de la dieta mediterránea. El papel de estos constituyentes en salud surgió y se puso de manifiesto como consecuencia de diversas paradojas nutricionales observadas en poblaciones y que no pueden explicarse en función de los nutrientes y energía de la dieta.

Por ello, se comienza describiendo algunas de estas paradojas, para a continuación presentar brevemente las características principales de la fibra dietética y compuestos antioxidantes y bioactivos. Posteriormente se centra en el estudio de la dieta española, aportando datos originales de ingesta de estos compuestos. Se incluye un estudio de los autores sobre la capacidad antioxidante total de la dieta española, que consideramos es el primero que se lleva a cabo a nivel internacional en una dieta completa. Se proponen diversos parámetros para la caracterización de los factores saludables de la dieta mediterránea. El tercer bloque se centra en ingredientes funcionales, considerando aspectos relacionados con las alegaciones nutricionales de los mismos.

Además, se analizan las limitaciones de las tablas de composición de alimentos y bases de datos relativas a fibra y antioxidantes, principalmente derivadas de las metodologías utilizadas para su determinación.

Finalmente se lleva a cabo una selección de las principales conclusiones e hipótesis desarrolladas en este capítulo.

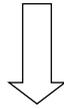
IV.3. Paradojas nutricionales

La importancia o el posible papel en salud de la fibra y los compuestos bioactivos surge como consecuencia de los resultados paradójicos de conocidos estudios epidemiológicos sobre dieta e incidencia de enfermedades en determinadas poblaciones. Son paradojas nutricionales, de las cuales se seleccionan las que se describen a continuación.

Figura 1 Paradoja de Trowell (1970)**Observación:**

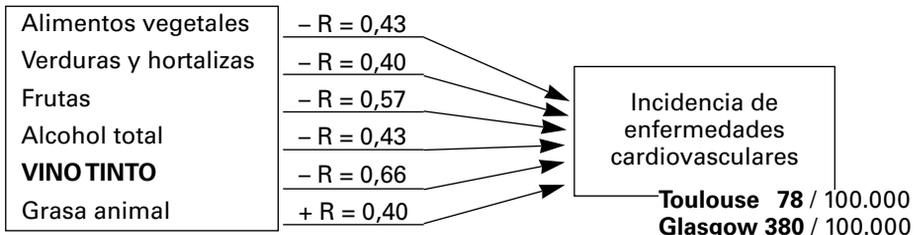
Escasa o nula incidencia en países africanos de algunas enfermedades comunes en el Reino Unido

- Estreñimiento
- Diverticulosis
- Hemorroides
- Cáncer de colon-recto

**“Hipótesis de la fibra”**

Dietas ricas en fibra son factor preventivo de las enfermedades observadas

Paradoja de Trowell.—Es consecuencia de las observaciones llevadas a cabo en los años setenta por el Dr. Trowell, acerca de la elevada incidencia de enfermedades gastrointestinales (diverticulosis, estreñimiento, etc.) en el Reino Unido y baja o nula en poblaciones africanas (figura 1). Trowell señaló la ingesta de fibra dietética como factor determinante y enunció la “*hipótesis de la fibra*” (Trowell, 1976; De Vrides *et al.*, 1999). Posteriormente, numerosos estudios biológicos, clínicos y epidemiológicos han corroborado esa hipótesis y encontrado otros efectos significativos de la fibra en prevención de trastornos intestinales, de obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Por ello, la fibra ocupa hoy un papel importante en nutrición y es un ingrediente funcional ampliamente utilizado por la industria agroalimentaria (Kritchevsky y Bonfield, 1995).

Figura 2 Paradoja francesa**Observaciones:**

APARENTE COMPATIBILIDAD ENTRE DIETA ALTA EN GRASAS ANIMALES Y BAJA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Renaud y De Lorgeril, 1992.

Paradoja francesa.—La paradoja francesa ha sido muy divulgada por los medios de comunicación. Es consecuencia del estudio MONICA sobre dieta e incidencia de enfermedades cardiovasculares en países europeos, cuyos resultados asocian significativamente el consumo de vino tinto en determinadas regiones francesas con la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares (figura 2). El consumo regular y moderado de vino tinto se considera cardiosaludable y protector de los efectos nocivos atribuibles a las dietas ricas en grasas animales. Pero ¿qué constituyentes del vino son los responsables de ese efecto? Se ha señalado científicamente a los compuestos polifenólicos en primer lugar y al alcohol en segundo como principales responsables de estos efectos. Desde la publicación en la revista *The Lancet* de la denominada “*paradoja francesa*” (Renaud y Lorgeril, 1992; Estruch *et al.*, 2004) se ha desarrollado extraordinariamente el estudio de las propiedades biológicas y nutricionales de los compuestos polifenólicos del vino tinto y de numerosos alimentos vegetales, incluyendo aspectos o propiedades antioxidantes, vasodilatadoras, antibacterianas, anticancerígenas, etc. Cabe citar los trabajos recientes de Estruch *et al.* (2004), que muestran que el consumo moderado de vino tinto reduce los niveles de biomarcadores sanguíneos de inflamación asociada a aterosclerosis.

Paradoja griega.—El tabaquismo es causa de estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares y cáncer de pulmón. Grecia es el país europeo con mayor consumo de tabaco (>3.600 cigarrillos al año per cápita), mientras que el menor índice de tabaquismo se da en Finlandia y otros países norteeuropeos (<1.700 cigarrillos al año per cápita). No obstante, paradójicamente, los índices de enfermedades cardiovasculares y de cáncer de pulmón son significativamente más bajos en Grecia que en Finlandia y otros países de bajo tabaquismo (Duthie, 1999). Surge la hipótesis de los compuestos bioactivos antioxidantes. La dieta griega, como dieta mediterránea, contiene una cantidad y variedad de antioxidantes naturales presentes en alimentos vegetales, aceites y bebidas que pueden atenuar los efectos negativos del consumo de tabaco. Cabe señalar que España, también dieta mediterránea, está muy próxima en consumo de tabaco e incidencia de cardiovasculares y cáncer de pulmón a Grecia. Igualmente, Japón tiene un alto tabaquismo, consume una dieta muy rica en alimentos de origen vegetal y antioxidantes naturales y presenta igualmente una baja incidencia en estas enfermedades.

Paradoja española.—El exceso de peso se asocia a una mayor mortalidad. Se considera que la obesidad es la causante directa del 7,8% de las muertes en la Unión Europea. De ellas, el 70% son consecuencia de enfermedades cardiovasculares y el 20% de cáncer. En España, los índices de obesidad han aumentado significativamente en la última década. Sin embargo, los índices de mortalidad son más bajos que en otras poblaciones europeas con similares niveles de obesidad (Banegas *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Schöder *et al.*, 2004). Nuevamente aparece la hipótesis de los antioxidantes de la dieta (española o mediterránea) como posible explicación a esta paradoja.

IV.4. Fibra y compuestos bioactivos

Fibra

La fibra dietética, o fracción no digerible de los alimentos vegetales, es uno de los constituyentes de nuestra dieta que más atención científica ha recibido en las dos últimas décadas. La divulgación de sus efectos positivos en nutrición y salud ha atraído la atención de los consumidores y ha propiciado el desarrollo comercial de numerosos alimentos y suplementos dietéticos enriquecidos en fibra (Kritchevsky y Bonfield, 1995; Cho y Deher, 2001).

La fibra dietética está constituida por polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas) y lignina de los alimentos vegetales. Contrariamente a lo que ocurre con el resto de los nutrientes, la fibra no es atacada por las enzimas del estómago y del intestino delgado, por lo que llega al colon sin degradar. La fibra consta de dos fracciones, insoluble y soluble en agua, y sus propiedades nutricionales vienen determinadas por los porcentajes de dichas fracciones.

La fibra tiene una influencia significativa en el grado de absorción de nutrientes. En el estómago aumenta la viscosidad y retrasa el vaciado gástrico. Una vez en el intestino delgado, la capacidad de la fibra para absorber algunos nutrientes, junto con otros efectos sobre las paredes intestinales y la actividad de las enzimas digestivas, hacen que disminuya la velocidad de paso de nutrientes a sangre. La fibra al llegar al colon es atacada por la flora bacteriana y sufre, en mayor o menor grado, un proceso de fermentación (Saura, 1997). Los principales efectos ocasionados por el paso de la fibra a través del tracto gastrointestinal se resumen en la tabla 1.

Tabla 1 Propiedades y efectos asociados a la fibra dietética

Efectos	Consecuencias
Sensación de saciedad	Menor ingesta de alimentos
Disminución del tiempo de tránsito intestinal de los alimentos	Regulación intestinal
Aumento de excreción	Control de estreñimiento
Mayor excreción de grasa y proteína	Menor utilización calórica de la dieta
Retraso de la absorción de glucosa	Menor índice glicémico
Mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana intestinal	Factor preventivo de cáncer intestinal
Acción hipocolesterolémica	Factor preventivo de enfermedades cardiovasculares

La primera propiedad de la fibra, conocida desde hace décadas, es la relación directa entre su ingesta y el correcto funcionamiento gastrointestinal. Ello fundamenta su uso como agente terapéutico en el tratamiento del estreñimiento, diverticulosis, hemorroides, etc.

En tratamientos de obesidad se han evidenciado los efectos beneficiosos de la ingesta de alimentos ricos en fibra o de concentrados de fibra (tabletas, granulados, cápsulas). Los mecanismos de acción de la fibra para producir pérdida de peso son múltiples (sensación de saciedad, aumento de excreción de grasa y proteína, menor índice glicémico, menor densidad calórica de la dieta, etc.).

Pectinas, β -glucanos y galactomananos son fibras con propiedades hipocolesterolémicas. Los mecanismos de esta acción son varios: aumento de viscosidad del contenido gastrointestinal que interfiere con la formación de micelas y absorción de lípidos, aumento de excreción de esteroides y ácidos biliares e inhibición de síntesis de colesterol hepático.

Las fibras solubles viscosas, tales como pectinas y gomas, tienden a reducir la velocidad de entrada de glucosa en sangre y la secreción de insulina. En esta propiedad se basa la recomendación a diabéticos de alimentos con bajo índice glicémico y ricos en fibra soluble, como legumbres, frutas y verduras.

Una ingesta alta de fibra se asocia con un menor riesgo de cáncer colo-rectal. No obstante, la asociación no tiene necesariamente que ser directa. Por ejemplo, parece existir una asociación recíproca entre fibra y grasa: personas con dietas altas en fibra reducen la ingesta de grasa. Asimismo, un alto consumo de grasa se ha relacionado con la mayor incidencia de algunos tipos de cáncer.

El consumo actual de fibra en los países europeos se encuentra alrededor de 20 gramos por persona y día. Elevar esta cifra al menos a 30 gramos es una recomendación general de nutriólogos y organizaciones sanitarias, contenida en una dieta con una cantidad limitada de grasa animal. Al menos el 30% de la fibra ingerida debería ser soluble.

Un mayor consumo de alimentos vegetales, y especialmente frutas, legumbres y hortalizas, es la mejor forma de lograr una ingesta adecuada de fibra. No obstante, la tendencia a lograr este incremento sin grandes cambios en los hábitos alimentarios del consumidor ha propiciado la aparición en el mercado de numerosos alimentos enriquecidos en fibra y de suplementos dietéticos.

Compuestos antioxidantes y bioactivos

En los últimos años se ha generalizado el uso del término “*compuestos bioactivos*” en la comunidad científica, y específicamente en las Áreas de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición. Sin embargo, no existe una definición previa que delimite las sustancias que comprende. Se pueden señalar algunas características comunes de estos compuestos:

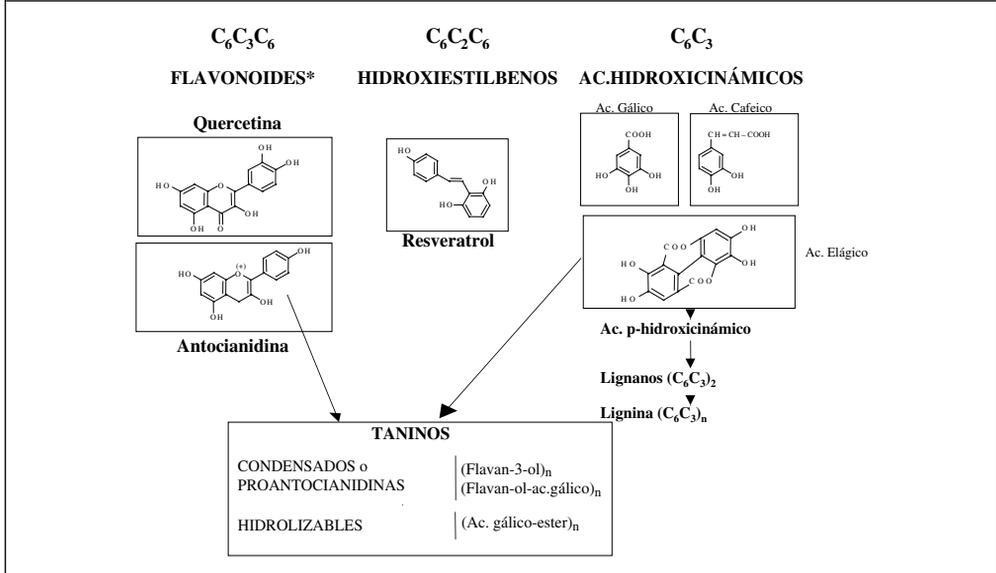
- Son componentes minoritarios de alimentos.
- Son considerados no nutrientes.
- Estructural y fisiológicamente se diferencian de los micronutrientes (vitaminas, minerales).
- Son biodisponibles, al menos parcialmente.
- Han mostrado algún efecto positivo en salud.
- Los mecanismos de su función biológica y/o metabólica en el organismo humano no están completamente establecidos.
- El número de compuestos bioactivos diferentes presentes en la dieta (varios centenares) supera al de nutrientes (próximo a cincuenta).

Entre ellos, los que actualmente vienen mereciendo más atención son polifenoles, carotenoides y fitoesteroles. Polifenoles y carotenoides ejercen su principal acción biológica a través de mecanismos de antioxidación y secuestro de radicales libres, mientras que el principal efecto de los fitoesteroles se produce a través de la inhibición de la absorción de colesterol. No es objeto de este capítulo realizar un estudio exhaustivo de las estructuras y propiedades de estos compuestos, pero para mejor comprensión de los apartados siguientes, relativos a dieta e ingredientes funcionales, se hace una breve descripción de los mismos.

Compuestos polifenólicos

Los polifenoles pueden ser divididos de acuerdo a su estructura básica en al menos diez clases diferentes, tales como ácidos fenólicos, fenilpropanoides, estilbenos, flavonoides, taninos y lignina (Harborne, 1988).

Figura 3 Principales compuestos polifenólicos en alimentos



La figura 3 muestra los grupos de compuestos polifenólicos más comunes en alimentos de nuestra dieta. Los ácidos hidroxicinámicos son, dentro de los polifenoles de bajo peso molecular, los más comunes. Algunos hidroxiestilbenos, como el resveratrol, son de interés en nutrición. Pero, sin duda, los flavonoides son de los más abundantes en alimentos e incluyen diversos subgrupos tales como flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas y otros. Se han descrito del orden de 6.000 estructuras diferentes y son los que más atención han despertado en nutrición y salud. Los taninos vegetales (taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas) son compuestos cuyo peso molecular puede encontrarse por encima de los 32.000 Da. Otro grupo, los florotaninos, solamente se localizan en algas marinas pardas y no se incluyen habitualmente en la dieta humana.

Entre los principales alimentos y bebidas ricos en polifenoles pueden citarse los siguientes: té, vino, café, uva, manzana, fresa, alcachofa, brócoli, algunas legumbres, algarroba y cacao (Shahili y Nack, 1995).

Una de las propiedades más conocidas de los compuestos fenólicos es su capacidad para unirse y precipitar las proteínas reduciendo su digestibilidad (Ho *et al.*, 1992; Nanach *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 1994). También se ha descrito que la ingesta de polifenoles lleva asociada una mayor excreción de grasa. Estas propiedades pueden ser poco significativas nutricionalmente, dadas las elevadas cantidades de proteína y grasa en nuestra dieta y la relativamente baja ingesta de compuestos polifenólicos, del orden de 1 g/día.

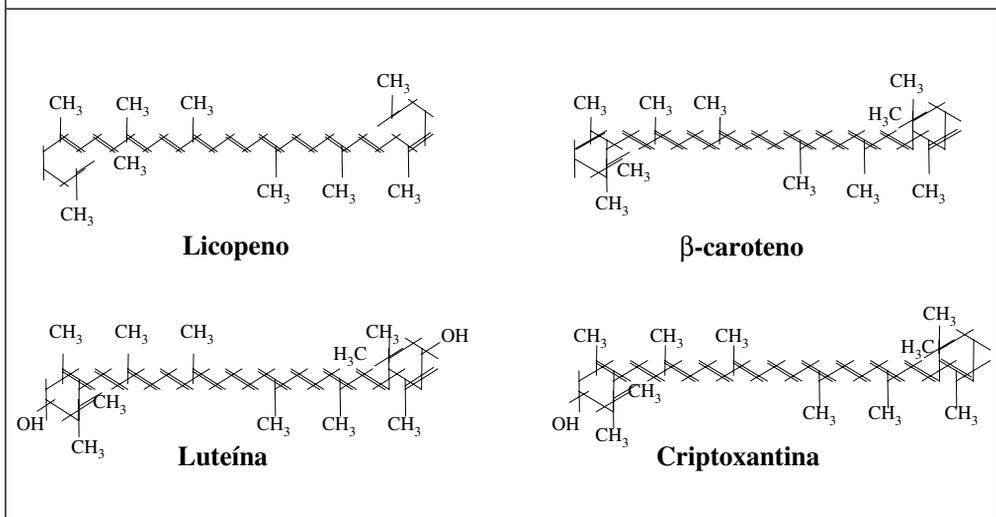
Recientemente, el interés nutricional en los compuestos polifenólicos se ha centrado en su papel como antioxidantes, antimutagénicos y secuestradores de radicales libres. Son especialmente numerosos los estudios publicados en los últimos años sobre hipocolésterolemia, inhibición de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), actividad antimutagénica y anticancerígena, etc. (Karakaya, 2004; Scalbert y Williamson, 2000).

En cualquier caso, los efectos de los polifenoles están determinados por su biodisponibilidad, que se considera baja —del orden del 5 al 10%—, entendiéndose como biodisponibilidad el grado de absorción de los mismos en el intestino delgado y paso a circulación sanguínea. No obstante, los compuestos polifenólicos no absorbidos en el intestino delgado pueden ser biodisponibles, al menos parcialmente, en el intestino grueso tras su fermentación colónica, producida por la acción enzimática de la flora bacteriana.

Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos vegetales liposolubles que se encuentran disueltos en la fase lipídica o combinados con proteínas en fase acuosa. Se han identificado más de 600 compuestos (Johnson, 2002; Seddon, 1994). Pueden ser divididos en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas (figura 4). Los carotenos son hidrocarburos poliénicos ($C_{40}H_{56}$), tales como α y β -carotenos, precursores de vitamina A y licopeno. Las xantofilas son polienos con uno o más átomos de oxígeno (ej., criptoxantina y luteína) (De Pee y West, 1996; Van het Hof *et al.*, 1999).

Figura 4 Estructura química de los principales carotenoides



Los carotenoides están presentes en muchos alimentos de origen vegetal, siendo abundantes especialmente en zanahoria, pimiento, espinacas, tomate o cítricos.

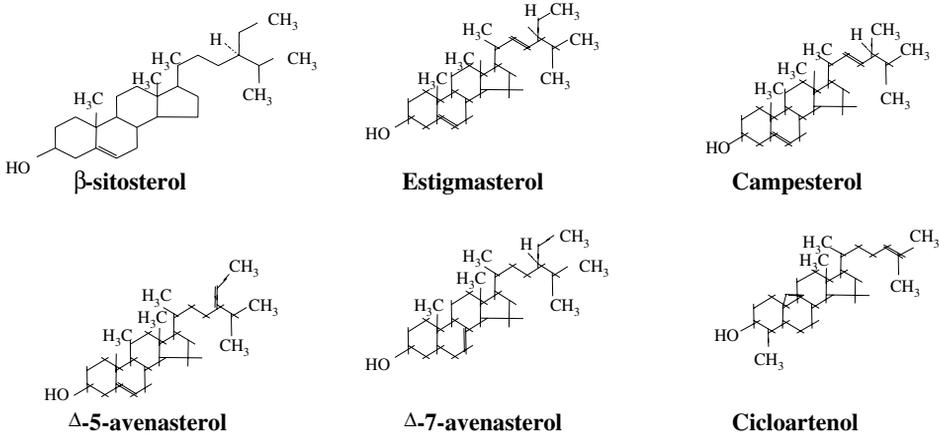
El organismo humano no tiene capacidad para sintetizar los carotenoides. Los carotenoides que se encuentran de forma mayoritaria en plasma son β -caroteno, α -caroteno, luteína, criptoxantina y licopeno. Estos compuestos muestran actividad antioxidante, aunque su biodisponibilidad a partir de alimentos vegetales es baja (7-14%).

Numerosos estudios sugieren una asociación entre el consumo de carotenoides y un incremento de la respuesta inmune y de la protección frente a cáncer o frente a aterosclerosis. Los mecanismos de los carotenos para actuar como agentes protectores celulares pueden resumirse en la capacidad de estas moléculas para actuar como agentes fotoprotectores frente a la luz y al oxígeno y como agentes secuestrantes de radicales libres.

Fitoesteroles

Los fitoesteroles son constituyentes de los aceites vegetales y de la fracción lipídica de alimentos vegetales. Se diferencian tres tipos: desmetilesteroles, 4-metilesteroles y 4,4-dimetilesteroles. Entre los desmetilesteroles se encuentran campesterol, estigmasterol y sitosterol, compuestos que presentan similitud estructural con el colesterol (figura 5).

Figura 5 Estructura química de los principales fitoesteroles



El aporte de fitoesteroles proviene de la dieta vía absorción intestinal, dado que no son sintetizados por el organismo humano. Los alimentos más ricos en fitoesteroles son los aceites vegetales, cereales y legumbres.

Los fitoesteroles tienen efecto hipocolesterolémico debido principalmente a su capacidad para inhibir la absorción intestinal de colesterol (Piironen *et al.*, 2000; Cater, 2000). Al presentar mayor hidrofobia que el colesterol, tienen mayor afinidad para su incorporación a las micelas, con lo que se produce una menor solubilización del colesterol. Además, los fitoesteroles compiten con el colesterol en la incorporación a las células de la mucosa, en la esterificación intracelular y en el proceso de incorporación a los quilomicrones.

Diversos estudios clínicos realizados en los últimos veinticinco años han establecido que los fitoesteroles disminuyen los niveles de colesterol total y LDL-colesterol. Este efecto se ha reportado en sujetos normales e hiperlipidémicos, en adultos y niños, en diabéticos y en pacientes con hipercolesterolemia familiar y generalmente sin cambios significativos en HDL-colesterol. Se han reportado bajadas de 10-15% en niveles de LDL-colesterol con ingestas de 1-3 g/día de fitoesteroles de aceites o a través de alimentos suplementados (Plat y Mensink, 2001).

IV.5. Dieta española y mediterránea

La dieta española tradicional responde al patrón alimentario definido como dieta mediterránea. Los alimentos más representativos de nuestra dieta son verduras, hortalizas, frutas y leguminosas, una rica variedad de pescados, aceite de oliva y vino tinto. El consumo de carne y productos lácteos es moderado. El aceite utilizado habitualmente es el de oliva, ya sea crudo como aderezo de ensaladas o como aceite de fritura, lo cual proporciona unas cualidades sensoriales y nutritivas específicas al conjunto de la dieta.

Aunque la dieta media española se puede todavía encuadrar en el patrón de dieta mediterránea, en los últimos 30 años se han producido importantes cambios que han afectado al comportamiento alimentario de la población (MAPA, 2001). Se resumen en la tabla 2.

Principalmente, se ha observado un descenso continuado del consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono complejos (pan, legumbres, patatas, pastas y arroz), un incremento en el consumo de pescados, productos lácteos y carnes. También ha disminuido el consumo de frutas, verduras y hortalizas, vino y azúcar de mesa. El descenso del consumo de vino se ha acompañado del incremento de otras bebidas alcohólicas, tales como cerveza y destilados de alta graduación.

Tabla 2 Cambios alimentarios de la población española (1960-2004)

Consumo de alimentos	Descenso del consumo de frutas Descenso del consumo de verduras Descenso del consumo de legumbres Aumento del consumo de carnes Aumento del consumo de pescados
Consecuencias nutricionales	Excesiva ingesta de calorías Excesiva ingesta de proteínas Excesiva ingesta de grasas Deficiente ingesta de hidratos de carbono Deficiente ingesta de fibra dietética

El análisis nutritivo de la dieta española actual indica que el aporte calórico total (2.843 Kcal) excede en un 25% las recomendaciones dietéticas. Este exceso es consecuencia, principalmente, del elevado consumo de alimentos de origen animal. Asimismo, se observa un excesivo consumo de proteínas (99,05 g/persona/día). En la tabla 3 se presenta el perfil calórico de la dieta actual, así como su evolución en los últimos años.

La ingesta diaria de bebidas alcohólicas es alta (241,25 ml/día) y supone un aporte a la dieta de 156,5 Kcal/persona/día. Teniendo en cuenta que la mayor parte procede del consumo de vino y que dicho aporte supone tan sólo el 5% de la ingesta energética diaria, los valores se corresponden con los indicados en las recomendaciones dietéticas.

Tabla 3 Evolución del perfil calórico de la dieta española (porcentaje Kcal)
(MAPA, 2001)

	Proteínas	Hidratos de carbono	Grasas
1964	11,0	58,0	31,0
1980	13,0	46,0	40,0
1990	15,0	39,2	45,8
2000	14,6	40,8	44,6
2002	14,8	40,3	44,9
Recomendaciones	12-15	55-60	30-35

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos realizados en los últimos años asocian de forma significativa el patrón alimentario definido como dieta mediterránea con una baja morbilidad y mortalidad por todas las causas, y especialmente por enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Dado que la ingesta calórica y total de nutrientes de la misma no explican las diferencias con otros países centro y norteeuropeos, con alta incidencia en estas enfermedades, los factores preventivos de la dieta hay que buscarlos en componentes específicos tales como el muy estudiado perfil de ácidos grasos y los menos estudiados relativos a fibra dietética y compuestos bioactivos. Estos últimos se tratan a continuación.

Fibra en la dieta española

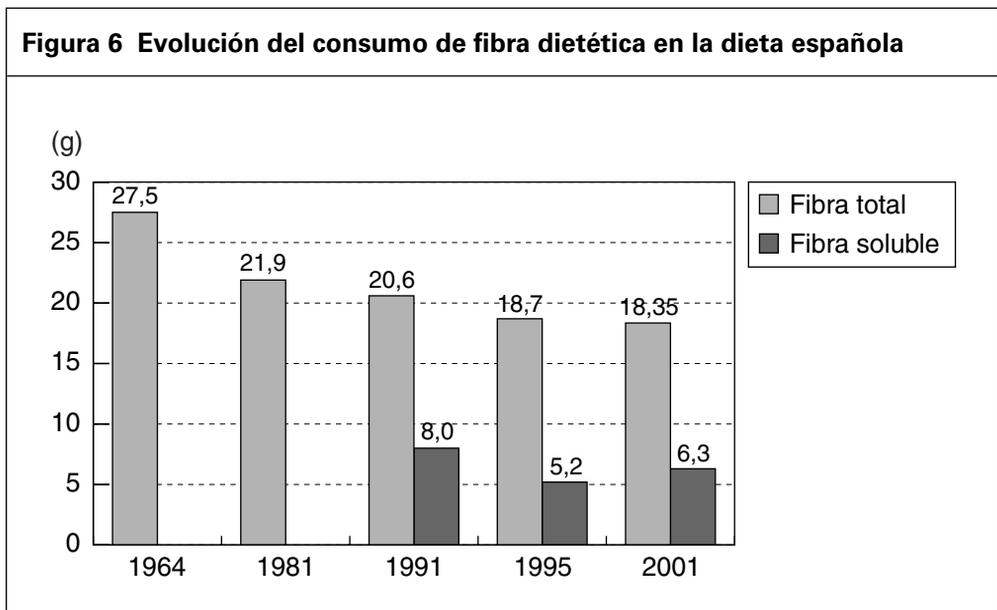
El consumo actual de fibra dietética total en España, estimado en base a los datos de consumo publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), es de 18,3 g/p/d (Saura-Calixto y Goñi, 2004), que corresponde a 6,4 g/1.000 Kcal, siendo la ingesta de fracción soluble equivalente a 6,3 g/p/d. El consumo de fibra está cuantitativamente lejos de las recomendaciones dietéticas (30 g/persona/día), aunque desde un punto de vista cualitativo podemos afirmar que la fibra de nuestra dieta es de composición equilibrada y tiene una buena calidad nutricional, dado que el 34% del total corresponde a fibra soluble (tabla 4). Como hemos referido anteriormente, se recomienda que al menos el 30% de la ingesta sea en forma soluble.

Tabla 4 Ingesta de fibra dietética en España (2001) (Saura-Calixto y Goñi, 2004)

	Ingesta de fibra dietética (g/p/d)	
	Total	Soluble
Cereales	7,28	1,95
Frutas	5,05	2,09
Verduras y hortalizas	4,69	1,90
Legumbres	0,75	0,23
Frutos secos	0,57	0,13
Total	18,35	6,30

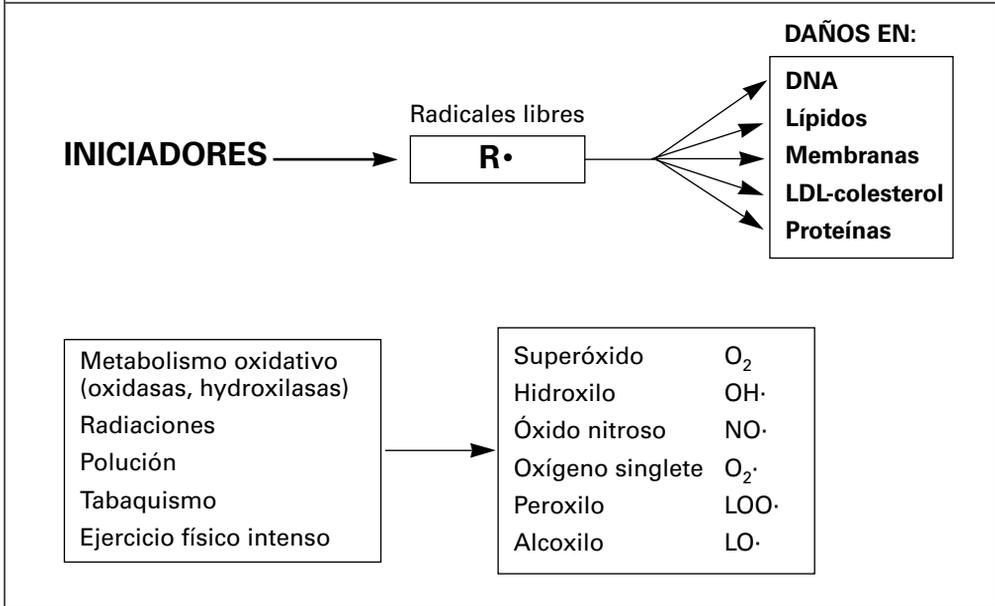
En la dieta española, las frutas frescas y verduras aportan el 53% de la fibra total (y el 63% de la fibra soluble), mientras que el consumo de cereales supone tan sólo un 39,7%. En los países centro y norteeuropeos, la ingesta de fibra es del mismo orden (próxima a 20 g/persona/día), pero procede mayoritariamente de cereales, los cuales tienen una proporción menor de fibra soluble.

No obstante, los datos de evolución en el consumo de fibra en España indican un progresivo descenso en las dos últimas décadas, que repercute tanto en la cantidad como en la calidad de la fibra ingerida (figura 6).



Antioxidantes y bioactivos en la dieta española

La *hipótesis antioxidante* indica que las vitaminas y los compuestos bioactivos antioxidantes (fotoquímicos) de los alimentos vegetales pueden tener un papel significativo en la etiología de enfermedades crónicas, especialmente cardiovasculares (Papavasiliou, 1999; Blomhoff, 2005). El metabolismo de los sistemas biológicos genera continuamente especies reactivas de oxígeno que pueden producir importantes daños oxidativos en proteínas, lípidos y DNA, los cuales se asocian con la aparición de estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas (figura 7). El estatus antioxidante humano es la resultante de la actividad oxidante de las especies reactivas y de los mecanismos de de-

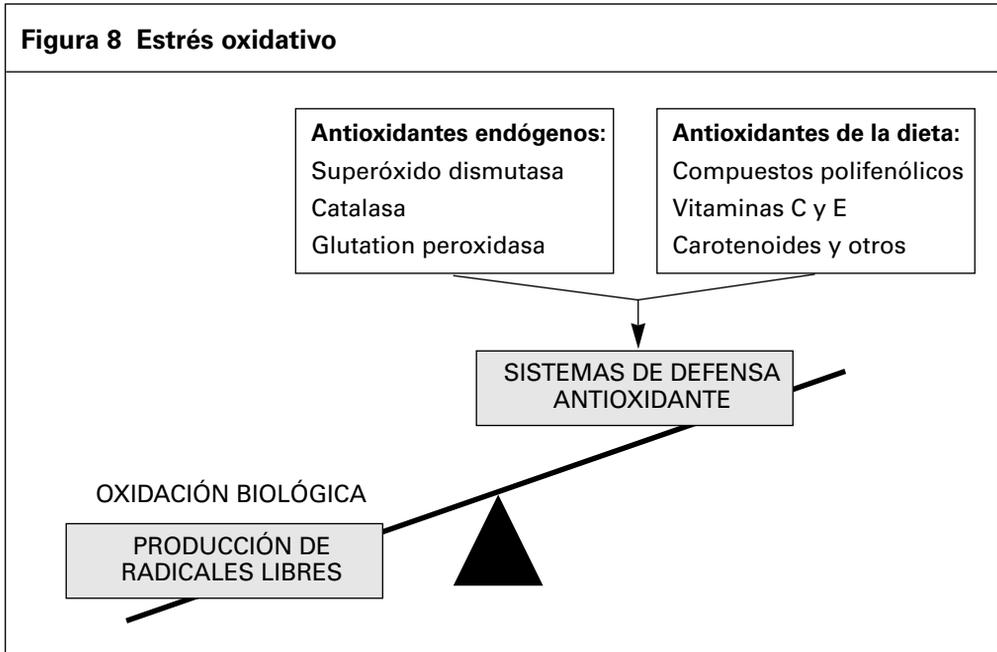
Figura 7 Oxidación biológica

fensa antioxidante (enzimáticos, endógenos y exógenos). El estrés oxidativo se favorece por factores tales como nutrición inadecuada, tabaquismo, contaminación, ejercicio físico intenso, consumo de algunos medicamentos, etc. (Mandamanchi, 2005).

Los sistemas enzimáticos y endógenos de defensa del organismo pueden ser insuficientes para neutralizar la acción oxidativa y evitar el estrés oxidativo, especialmente durante el proceso de envejecimiento. Por ello, es primordial el papel de los antioxidantes procedentes de la dieta (figura 8).

El papel de los antioxidantes en nutrición y salud, y su mecanismo de acción, es un objetivo de interés creciente en investigación. Solamente en la base de datos *Med Line* aparecen referidos en la última década más de seis mil artículos relacionados con antioxidantes y enfermedades cardiovasculares.

Los alimentos vegetales son la principal fuente de antioxidantes en la dieta. Dichos alimentos contienen un elevado número de compuestos bioactivos de diferente estructura química, biodisponibilidad, propiedades biológicas y capacidad antioxidante (Goldberg, 2003). De una forma simplificada, los antioxidantes principales y mayoritarios contenidos en los alimentos se pueden agrupar en vitaminas (C y E), carotenoides (incluyendo la propia vitamina A), compuestos polifenólicos y compuestos de Maillard.



Las vitaminas son estructuras sencillas bien conocidas. Sus propiedades biológicas también están definidas. Se conoce su ingesta en poblaciones y sus recomendaciones dietéticas están establecidas.

El caso de los carotenoides y compuestos polifenólicos es diferente. Se han identificado del orden de 600 estructuras carotenoide-terpenoides en plantas (mayoritariamente β -caroteno, licopeno, luteína y criptoxantina) y más de 30 carotenoides en plasma (Rock y Swendseid, 1992). Los datos de ingestas diarias de carotenoides referidos en poblaciones son del orden de 5 a 7 mg en Estados Unidos y de 9,5 en España (Clifford, 2004). Su biodisponibilidad es baja y muy variable según el tipo de alimento y procesado, y es significativamente inferior en alimentos que en suplementos dietéticos de carotenoides aislados.

Más complejo y con un número de compuestos identificados en alimentos superior al de carotenoides es el grupo de los compuestos polifenólicos, el cual incluye estructuras muy variadas (desde ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos de bajo peso molecular hasta estructuras altamente polimerizadas y/o enlazadas a paredes celulares). Hoy día se dispone de datos sobre el contenido en polifenoles de un gran número de alimentos y de su capacidad antioxidante. No obstante, el conocimiento de sus propiedades biológicas, biodisponibilidad, metabolismo y efectos en la salud es incompleto. Los datos de ingesta de polifenoles en poblaciones son muy escasos y parciales e indican valores comprendidos en un rango muy amplio, de 200 mg a 2 g (Van der Hof, 1999; Clifford, 2004).

Por último, los compuestos de Maillard (melanoidina) se encuentran en alimentos procesados como consecuencia de condensaciones de carbohidratos y aminoácidos. Existen estudios muy recientes que muestran que estos compuestos contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante (CA) de algunos alimentos, aunque el conocimiento de sus propiedades biológicas y efectos en salud es incipiente (Morales y Babel, 2002).

De los numerosos estudios publicados se deduce que los compuestos polifenólicos son los antioxidantes más abundantes en alimentos (sus concentraciones se expresan en mg/100 g), seguidos de vitaminas y carotenoides (expresados en μ gramos/100 g). Igualmente, numerosos estudios *in vitro* muestran que la CA de los compuestos polifenólicos es significativamente superior a la de las vitaminas y carotenoides y que son los compuestos que contribuyen en mayor grado a la CA de los alimentos (Gardner *et al.*, 2000; Vinson *et al.*, 2001).

Parece lógico pensar que la CA de alimentos y de dietas sea debida al efecto combinado y sinérgico de un amplio número de compuestos (vitaminas, carotenoides y polifenoles, elementos minerales, terpenos, etc.) (Liu, 2003). Las ingestas estimadas de antioxidantes y fitoesteroles en la dieta española se indican en la tabla 5. Incluye datos nuevos, obtenidos en nuestro laboratorio, correspondientes a polifenoles totales y fitoesteroles. Los polifenoles son los compuestos antioxidantes mayoritarios en nuestra dieta, con una ingesta estimada en 1.170 mg, frente a los 148,4 mg correspondientes a vitaminas C y E y carotenoides (Saura-Calixto y Goñi, en prensa; Jiménez-Escrig *et al.*, 2002).

Tabla 5 Ingesta de compuestos bioactivos y vitaminas antioxidantes en España (año 2000)

	mg/p/d	Referencia
Compuestos polifenólicos	1.170	(Saura-Calixto y Goñi, 2005)
Fitoesteroles	370	(Jiménez-Escrig <i>et al.</i> , 2002)
Vitamina C	126	(Saura-Calixto y Goñi, 2005)
Vitamina E	13	(Saura-Calixto y Goñi, 2005)
Carotenoides	9,4	(O'Neil <i>et al.</i> , 2001)

La ingesta diaria de fitoesteroles per cápita en la dieta española es de 370 mg, correspondiendo el 60% a β -sitosterol. Esta ingesta es cuantitativamente similar a la de otros países con mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares como Finlandia y Alemania, aunque una diferencia cualitativa importante es una mayor proporción de fitoesteroles ingeridos a través de aceites vegetales, frutas y legumbres respecto a la de dichos países, donde la principal fuente son los cereales.

Capacidad antioxidante de la dieta española

Existe una documentación amplia sobre la CA *in vitro* e *in vivo* de los compuestos alimentarios aislados y de alimentos concretos. Los estudios se han centrado en vitamina C, vitamina E, carotenoides y algunos flavonoides, y en alimentos ricos en antioxidantes tales como aceite de oliva, fresas, cítricos, vino, té, cacao y otros (Lee, 2004; Jacbs y Steffen, 2003).

En cualquier caso, es evidente que la CA de la dieta será consecuencia de la acción sinérgica de todos los compuestos bioactivos y antioxidantes, junto con otros constituyentes de los alimentos, tales como minerales (hierro, zinc, selenio), vitamina A, etc.

En este contexto, se está comenzando a considerar esencial el estudio de la CA de dietas completas (Martínez-González y Estruch, 2004) para planificar e interpretar estudios clínicos y epidemiológicos. Sin embargo, paradójicamente, no conocemos estudios sobre CA de dietas completas. No existen estudios que evalúen la capacidad antioxidante de la dieta española ni de la dieta mediterránea, lo que tendría especial interés. La CA —determinada por varios métodos— correspondiente a las bebidas alcohólicas y no alcohólicas de la dieta española (Pulido *et al.*, 2003) y al aceite de oliva (Goñi y Saura, 2004) se ha determinado recientemente y se encuentra en prensa un estudio de la CA total de la dieta española (Saura-Calixto y Goñi, en prensa), utilizando dos métodos de determinación de la CA: FRAP y ABTS (Re *et al.*, 1999). Se reporta la CA de todos los alimentos de origen vegetal, bebidas y aceites incluidos en los datos nacionales de consumo publicados por el MAPA (2001). Los resultados obtenidos utilizando el método de ABTS para la medida de la CA total se resumen en la tabla 6. Se estima que estos datos son los primeros publicados de una dieta completa.

Tabla 6 Capacidad antioxidante total ingerida (per cápita/día) en la dieta española (año 2000)		
	Consumo	Capacidad antioxidante ABTS (μmoles equivalentes trolox)
Alimentos vegetales (g sustancia fresca)		
Frutos secos	6,9	176,4
Frutos	265,2	341,5
Verduras y hortalizas	330,7	271,6
Legumbres	22,2	134,7
Cereales	221,6	33,4
Bebidas (mL)	504,8	2.575,7
Aceites vegetales (mL)		
Oliva	31,3	12,8
Otros	20,8	2,4
Total		3.548,6

La capacidad antioxidante total de la dieta (CATD) se puede definir como la capacidad antioxidante derivada de la acción sinérgica de los distintos antioxidantes contenidos en los alimentos de origen vegetal y bebidas consumidos diariamente en una dieta. Representa la cantidad de unidades antioxidantes (equivalentes trolox) presentes diariamente en el tracto gastrointestinal humano. En la dieta española la estimamos en 3.549 μ moles trolox. Trolox es un análogo hidrosoluble de vitamina E, muy utilizado como patrón de referencia en la determinación de CA.

La contribución de cada alimento a la CATD depende de la cantidad ingerida y de su CA. Cabe destacar que la mayor contribución corresponde a las bebidas (72,6%), en contra de la creencia general de que los alimentos vegetales, y especialmente las frutas y verduras, son la principal fuente de antioxidantes de la dieta. Frutas y verduras representan un 17,3% del total, y frutos secos y legumbres un 8,8%, mientras que la contribución de cereales y aceites es muy baja.

Estos resultados sugieren que para estudiar el papel de los antioxidantes en salud debería considerarse la CATD. Estudios en alimentos individuales tienen un valor muy limitado pues, aunque presenten una CA alta, su contribución a la dieta puede ser insignificante. Así, la contribución del aceite de oliva y del té a la dieta española representa sólo el 0,4 y 3% de la CATD. Por el contrario, el vino aporta el 17,4% y, sorprendentemente, el café un 44,6%.

Respecto a la contribución de compuestos específicos, los compuestos polifenólicos son cuantitativamente los principales antioxidantes de la dieta y la CA de los alimentos se correlaciona de forma significativa precisamente con el contenido de estos compuestos. Las vitaminas C y E representan tan sólo alrededor del 10% de la CATD, y los carotenoides una cantidad mucho menor. No obstante, hay que tener en cuenta que las vitaminas son totalmente biodisponibles, mientras que la biodisponibilidad de polifenoles y carotenoides es baja (5-15%), tal y como se indicó anteriormente.

Las recomendaciones internacionales dirigidas a incrementar la ingesta de frutas y verduras están basadas en numerosos estudios clínicos y epidemiológicos. A modo de ejemplo, el estudio reportado por Bazzano *et al.* (2002) encontró una relación inversa entre el consumo de frutas y verduras y el riesgo de enfermedades cardiovasculares por todas las causas de mortalidad en la población de Estados Unidos. Estos resultados se observaron en personas que consumían tres o más raciones de frutas y verduras, en total 520 g de las mismas, cantidad que coincide con el consumo promedio per cápita en España. Martínez-González *et al.* (2002) encontraron una asociación inversa entre el primer infarto de miocardio agudo y el consumo de frutas en la dieta española, pero no con el de verduras o legumbres.

Las frutas parecen ser un elemento esencial en la prevención de enfermedades, solas o en algunos casos en combinación con verduras, frutos secos y otros alimentos de origen vegetal. Una posible explicación de los efectos beneficiosos del consumo de frutas puede ser debido a su CA y la capacidad para inhibir la oxidación de LDL-colesterol, como consecuencia de su contenido vitamínico y de la presencia de una gran variedad de carotenoides y compuestos polifenólicos. Dado que la vitamina C es un contribuyente minoritario a la CA de la frutas y que la contribución de los carotenoides es despreciable, los compuestos polifenólicos aparecen cuantitativamente como los principales antioxidantes en frutas (Gardner *et al.*, 2000; Vinson *et al.*, 2001). Nuestros datos apuntan en la misma dirección, pero adicionalmente sugieren que las bebidas pueden ser un factor más determinante de los efectos beneficiosos derivados de los antioxidantes de la dieta.

El estudio MONICA (Renaud y Lorgeril, 1992; Estruch, 2004) confirma que la mortalidad por enfermedades coronarias es mucho más baja en Francia que en otros países industrializados con similar ingesta de grasas saturadas y niveles de colesterolemia. Si tenemos en cuenta nuestros datos de CATD, no hay paradoja en el efecto protector debido al consumo de vino. Si extrapolamos la CA de nuestro vino a la del vino francés, la ingesta antioxidante a través del vino en Toulouse (383 ml) es comparable a la CA total de la dieta española. Si además tenemos en cuenta su consumo de frutas (238 g) y verduras (306 g), la CA que le correspondería a la dieta de Toulouse es muy elevada, lo cual podría ser clave para explicar la baja mortalidad cardiovascular en esa región.

Un estudio prospectivo realizado en Grecia por Trichopoulou *et al.* (2003), que incluye a más de 22.000 adultos, mostró que la adherencia a la dieta mediterránea se asocia con baja mortalidad total, mortalidad por enfermedad coronaria y mortalidad por cáncer. Sólo se encontró una asociación significativa de la baja mortalidad con la relación lípidos monoinsaturados/saturados y el consumo de frutas más frutos secos. Si se considera que el consumo de frutas y frutos secos (los alimentos sólidos con mayor CA) reportado en este estudio es de 390 g, superior al de la dieta española (272 g), no es sorprendente su asociación con la prevención de enfermedades. Probablemente, si los autores hubieran considerado frutas y verduras conjuntamente en vez de frutas y frutos secos, también hubieran encontrado asociación con una baja mortalidad. Si nuestros datos de CA a los alimentos incluidos en este trabajo, la CA de la dieta griega se estima en 2.900 μ moles equivalentes trolox. A esta CA de la dieta habría que sumar al valor de CA aportado por el consumo de vino, dato no incluido en dicho trabajo.

La CA de la dieta en otros países mediterráneos es previsiblemente comparable a la de España. Por el contrario, debe ser menor en países con altos índices de cardiovasculares y cáncer, como los norte y centroeuropeos, con dietas que se caracterizan por un

más alto consumo de cereales y menor de frutas, verduras y vino que en países mediterráneos. De ello concluimos que la CATD puede ser un parámetro para considerar en estudios clínicos y epidemiológicos y para definir la dieta mediterránea.

IV.6. Parámetros para definición de dietas saludables y de dieta mediterránea

Una dieta saludable debe cumplir dos aspectos fundamentales: 1) aportar una cantidad adecuada y equilibrada de energía y nutrientes, y 2) aportar una cantidad determinada de fibra y compuestos bioactivos para prevención de enfermedades crónicas y degenerativas.

Como ya se ha indicado anteriormente, el conocimiento actual sobre el primer punto se puede considerar suficiente, existiendo consenso sobre recomendaciones de ingestas de calorías, proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas, minerales y también de fibra dietética, la cual hoy comienza a considerarse un nutriente.

En el caso de los compuestos bioactivos existe evidencia de su necesidad, pero dado el elevado número de los mismos presente en los alimentos, su diversidad estructural y el conocimiento incompleto de su biodisponibilidad y metabolismo es difícil establecer recomendaciones concretas. Probablemente, en un futuro próximo, muchos de estos compuestos bioactivos se considerarán nutrientes en alimentación humana.

En cualquier caso, la principal recomendación que puede transmitirse hoy es que la ingesta de los compuestos bioactivos se haga a través de alimentos incluidos habitualmente en la dieta. Un criterio de referencia para concretar su cantidad en una dieta saludable puede proceder del estudio de la dieta de las poblaciones con menores índices de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, cáncer y degenerativas. Las dos principales son la dieta japonesa y la dieta mediterránea, junto a otras de pequeños grupos étnicos. Por cuestiones culturales, en nuestro caso, se ha de tomar como referencia el patrón alimentario de la dieta mediterránea.

La dieta mediterránea se define por las siguientes características (Trichopoulou y Lagiou, 2001): alta relación lípidos monoinsaturados/saturados; consumo moderado de alcohol y de productos lácteos; elevado consumo de frutas, verduras, legumbres, cereales y pan, y consumo bajo de productos cárnicos.

Esta definición, principalmente basada en el consumo de alimentos, es cualitativa y no suficientemente precisa. Los términos “consumo alto, bajo o moderado” son inconcre-

tos y varían significativamente entre los más de 15 países que siguen este patrón alimentario.

Por otra parte, se conocen propiedades saludables de algunos alimentos mediterráneos, pero no su contribución a la dieta completa, o en otros casos se sobrevaloran sus propiedades por el simple hecho de formar parte de la dieta tradicional mediterránea, aunque sus efectos en salud sean insignificantes.

Por ello, sería de gran utilidad establecer parámetros basados en compuestos específicos para definir una dieta saludable, tomando como referencia el patrón alimentario de dieta mediterránea. Con esta hipótesis proponemos cuatro parámetros dietéticos, tres de ellos incipientes y relacionados con fibra y compuestos bioactivos, y un cuarto relacionado con la ingesta de lípidos sólidamente establecidos (Trichopoulou y Lagiou, 2001; Trichopoulou *et al.*, 2003). A estos parámetros se les ha asignado un rango cuyo valor mínimo corresponde al de la dieta española actual y el valor máximo es equivalente al de nuestra dieta en 1964.

Tabla 7 Parámetros dietéticos que caracterizan la dieta mediterránea	
Relación lípidos monoinsaturados/saturados	1,6-1,9
Ingesta de fracción indigestible (g/día)	41-62
Ingesta de actividad antioxidante (μ moles equivalentes trolox/día)	3.500-5.300
Ingesta de fitoesteroles (mg/día)	370-555

— **Parámetro dietético 1.** Relación lípidos monoinsaturados/saturados (M/S): 1,6-1,9.

Es el mejor parámetro de la dieta mediterránea predictivo de mortalidad por todas las causas. El consumo de pescado y aceites vegetales es el principal factor que contribuye a mantenerlo en el rango adecuado.

Los valores 1,6 y 1,9 corresponden a la relación M/S de la dieta española actual y de, 1964, respectivamente. El aumento del consumo de productos cárnicos en este periodo es una de las principales causas del descenso observado en este parámetro.

— **Parámetro dietético 2.** Ingesta de fracción indigestible: 41-62 g/día, con una proporción Soluble/Total = 0,2.

Se utiliza el concepto de fracción indigestible como alternativa al de fibra dietética, como se describe en el apartado VII.1.1. La fracción indigestible incluye fibra y otros compuestos indigestibles. Todos los alimentos de origen vegetal contribuyen a la ingesta de fracción indigestible, siendo frutas, verduras y legumbres los alimentos que mayor proporción de fracción indigestible soluble contienen (tabla 8).

Tabla 8 Contenido en fracción indigestible de alimentos de la dieta española
(Saura-Calixto y Goñi, 2004)

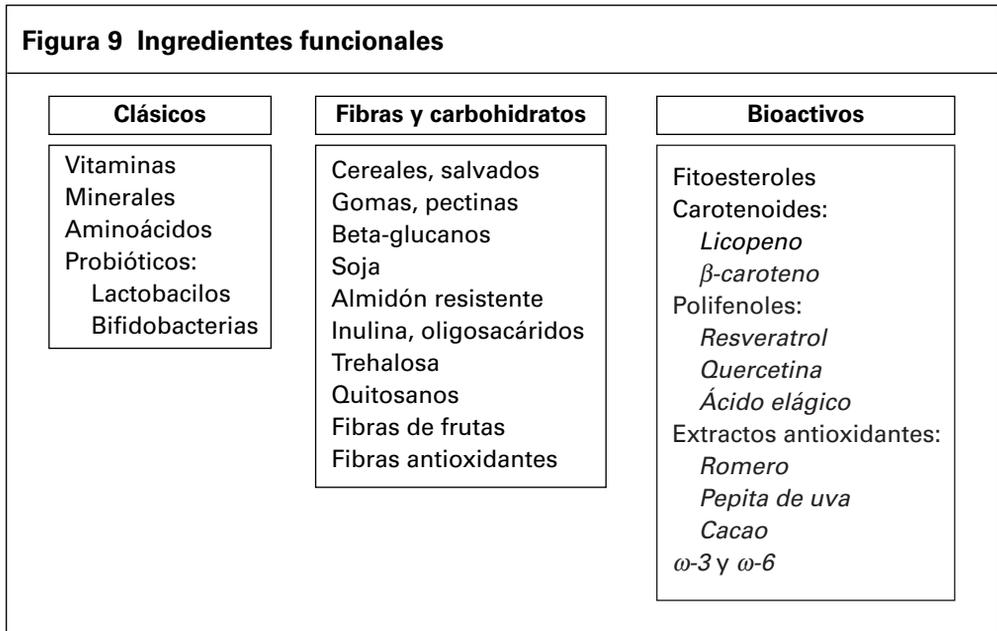
	Fracción indigestible total (% materia seca)	Fracción indigestible soluble (% materia seca)
Cereales		
Arroz	12,03	2,19
Pan	11,06	2,78
Espaguetis	14,01	2,10
Legumbres		
Garbanzos	28,03	2,02
Alubias	35,59	8,50
Lentejas	29,15	1,85
Verduras		
Pimientos	44,89	3,68
Tomates	38,14	1,26
Judías verdes	32,30	4,79
Frutas		
Naranja	26,50	2,98
Manzana	16,97	3,07
Pera	18,80	2,90
Frutos secos		
Cacahuetes	13,44	1,22
Almendras	18,34	1,27
Nueces	22,72	1,55

- **Parámetro dietético 3.** Ingesta de capacidad antioxidante total de la dieta (CATD): 3.500-5.300 μ moles de trolox/día (método ABTS). Bebidas, frutas y verduras son las principales fuentes de antioxidantes de la dieta, como se ha referido anteriormente (tabla 6).
- **Parámetro dietético 4.** Ingesta de fitoesteroles: 370-555 mg/día, con al menos un 55% procedentes de aceites vegetales.

En base a los datos de composición en ácidos grasos, fibra o fracción indigestible, antioxidantes o capacidad antioxidante y fitoesteroles, existe un amplio rango de alimentos para elaborar una gran variedad de dietas saludables con los parámetros dietéticos dentro de los rangos indicados. El conocimiento de estos parámetros también puede ser de utilidad para determinar deficiencias nutricionales en dietas de poblaciones.

IV.7. Ingredientes funcionales

El desarrollo de ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales ha crecido espectacularmente en los últimos años y continúa en expansión (Mazza, 1998). Existe una amplia gama de ingredientes funcionales en el mercado, que se clasifican en tres grupos (Saura-Calixto, 2004) (figura 9).



El primer grupo corresponde a los ingredientes funcionales clásicos, que se utilizan desde hace décadas. A él pertenecen, por ejemplo, la vitamina C o el calcio, ampliamente utilizados para enriquecer bebidas y alimentos, y el propio yogur, como portador de probióticos.

El segundo grupo lo constituyen la fibra dietética y algunos carbohidratos. Es el más importante desde un punto de vista cuantitativo, pues representa más del 50% de los ingredientes que se comercializan actualmente. En él se incluyen desde fibras clásicas, mayoritariamente insolubles, como el salvado de trigo, hasta fibras solubles, como los β -glucanos, o fibras emergentes como son las fibras antioxidantes.

Por último, en el tercer grupo se incluyen los ingredientes de compuestos bioactivos, cuya utilización en alimentos es incipiente pero que, por sus características, podríamos denominar ingredientes de futuro. Algunos ya están presentes en el mercado, como es el caso de los fitoesteroles en margarinas, o se utilizan en preparados o suplementos dietéticos, como el licopeno y los extractos de pepita de uva.

Fibra como ingrediente

La fibra dietética es cuantitativamente el ingrediente más utilizado en alimentos funcionales. Como suplemento dietético es un mercado en expansión en dietética y en farmacia.

Los concentrados de fibra y los alimentos enriquecidos en fibra van dirigidos a una demanda diferenciada. Por una parte, la derivada de personas sanas que buscan una dieta equilibrada, en la que la fibra es un factor de regulación intestinal y preventivo de diversas enfermedades y trastornos fisiológicos. Un segundo grupo lo constituyen las personas que presentan algún tipo de trastorno (estreñimiento, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes) que demandan un tipo específico de fibra. Sin duda, el uso de la fibra en regímenes de adelgazamiento es el factor que más ha contribuido al incremento de su consumo. El desarrollo de nuevos concentrados de fibra es una actividad de interés para la industria alimentaria. Hoy es posible considerar la producción de “*fibras de diseño*”, adaptadas a las diferentes necesidades del consumidor.

Como se ha mencionado anteriormente, existen numerosas fibras con propiedades nutricionales muy diferentes, derivadas fundamentalmente de su estructura, composición y solubilidad. Por ello, es muy importante elegir la más adecuada, según el objetivo nutricional y el tipo de alimento en que se desee incluir. En ello juegan un papel importante aspectos tecnológicos, textura y propiedades organolépticas del producto enriquecido, costes de elaboración, etc.

Las primeras fibras, comercializadas desde hace décadas, son las de cereales. El salvado de trigo es el producto rico en fibra más clásico y el más utilizado, debido en parte a su bajo precio. Contiene un 44% de fibra, aunque mayoritariamente es insoluble.

Por ello, como alternativa, hoy es de amplio uso el salvado de avena, ya que aunque su contenido en fibra total es bastante más bajo (12%), la proporción de fibra soluble es mayor. Los β -glucanos son una fibra totalmente soluble, extraída de cereales, con excelentes propiedades nutricionales. Un aspecto importante a considerar es el contenido de ácido fítico en las fibras insolubles de cereales. El ácido fítico es un secuestrante de minerales y su eliminación, generalmente con tratamiento con fitasas, es habitual en la preparación de cereales para alimentación infantil.

Aunque están menos comercializadas, las fibras procedentes de frutas pueden considerarse en general de mayor calidad nutricional por diversos aspectos. Presentan, comparativamente con cereales, un porcentaje más alto de fibra soluble (referido a materia seca); menor contenido calórico; mayor capacidad de retención de agua y lípidos; menor o nulo contenido de ácido fítico. Las fibras de manzana y cítricos son representativas de este grupo. Las pectinas extraídas de frutas también se pueden considerar como fibra totalmente soluble, con buenas propiedades nutricionales.

Las legumbres son alimentos ricos en fibra insoluble y soluble. No obstante, la comercialización de fibras de legumbres es prácticamente inexistente. Ello tiene una explicación. Un concentrado de fibra debe tener la menor cantidad posible de azúcares, almidón, proteína y grasa para que los compuestos considerados como fibra sean los componentes mayoritarios y, sobre todo, para que su contenido calórico sea bajo. Dado que las legumbres son ricas en almidón y proteína, la separación de estos nutrientes para aislar la fibra supondría tratamientos tecnológicos que probablemente implicarían un coste excesivo. Entre las leguminosas, es de destacar el amplio uso de la fibra de soja, dado que puede obtenerse a partir de subproductos del proceso de obtención de leche y proteína de soja. Sin embargo, las semillas de leguminosas son materiales muy utilizados para la obtención de fibra soluble. Destaca, por sus excelentes propiedades y amplio uso, la fibra de Psyllium, obtenida de semillas de *Plantago ovata*. Igualmente pueden considerarse fibras solubles de este tipo las gomas, como la de garrofin, obtenida de algarroba (*Ceratonia siliqua*), o la goma guar.

Son también de uso incipiente las fibras de origen marino, especialmente las procedentes de algas. Los polisacáridos aislados de algas como agar y carragenatos pueden considerarse fibra totalmente soluble, mientras que los quitosanos, obtenidos a partir de la quitina (polímero de galactosamina o glucosamina) procedente de invertebrados, hongos y levaduras, son fibra insoluble.

Como ingredientes del grupo de carbohidratos y derivados se incluyen xilitol, trehalosa, almidón resistente, inulina y otros oligosacáridos. Almidón resistente e inulina se comercializan como fibra o sucedáneos de fibra, aunque su composición o estructura

no corresponde exactamente al concepto de fibra clásico, que implica estructuras de polisacáridos no amiláceos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosas). El almidón resistente es un compuesto de alto peso molecular, insoluble, formado en gran parte por tratamiento térmico del almidón que le hace resistente a las enzimas digestivas al igual que la fibra, aunque obviamente su estructura es amilácea o de α -polisacárido, mientras que la inulina es un compuesto soluble constituido por oligofruktanos de peso molecular bajo o intermedio. No obstante, ambos presentan alguna de las propiedades de la fibra, como son alta fermentabilidad colónica y efecto prebiótico, por lo que se comercializan como tal.

Nuestro grupo ha desarrollado diversas fibras que se comercializan como ingredientes alimentarios o como suplementos dietéticos y es autor de algunas patentes sobre nuevos tipos de fibra, que no son objeto de este capítulo.

Como reflejo del uso de fibra como ingrediente funcional, en la tabla 9 se incluyen los principales tipos de alimentos enriquecidos en fibra del mercado español.

Tabla 9 Alimentos más comunes enriquecidos en fibra

Alimento	Contenido en fibra (g/100 g)	Ingredientes
Cereales de desayuno	5-29	Salvado de trigo
Panes	5-24	Harinas integrales, salvados de cereales
Galletas	3-10	Harinas integrales, salvados de cereales
Productos cárnicos	2-10	Fibras de cereales, soja
Mermelada	3-5	Frutas, guisante
Yogur	1-1,5	Fibras de frutas y oligosacáridos
Pasta (espaguetis)	7	Fibras de salvado de trigo y legumbres
Leche	0,5-1	Fibras de cereales, frutas, fructooligosacáridos
Café	0,5-0,7 g/taza	Fructooligosacáridos
Zumos de frutas	0,4-1	Fructooligosacáridos

Fibras dietéticas antioxidantes

Fibra y antioxidantes son dos temas que tanto en investigación como en desarrollo de productos se tratan separadamente, sin ninguna relación entre ellos.

No obstante, en base a estudios previos sobre fibras ricas en compuestos polifenólicos asociados surge la “*fibra dietética antioxidante*”, que combina en un solo producto los efectos beneficiosos de la fibra y los antioxidantes naturales (Saura-Calixto, 1998). Las fibras antioxidantes contienen al menos un 50% de fibra dietética, y una capacidad antioxidante/secuestrante de radicales libres mínima equivalente a 50-100 mg de vitamina E por gramo, la cual se deriva principalmente de compuestos bioactivos endógenos asociados a la matriz de fibra. Cabe destacar que las fibras del mercado carecen de capacidad antioxidante.

Figura 10



Fibra antioxidante: *Producto que contiene cantidades significativas de antioxidantes naturales asociados a la matriz de la fibra dietética* (Saura-Calixto, 1998).

Condiciones:

- Contenido en fibra >50% materia seca
- Actividad antioxidante de 1 g es equivalente a 50-200 mg de vitamina E
- Actividad antioxidante debe proceder de componentes naturales intrínsecos, no añadidos

Muy pocos vegetales son materias primas adecuadas para este tipo de fibra. Estas características se han encontrado en algunas frutas tropicales, en alga *Fucus* y, especialmente, en fibra obtenida a partir de subproductos de vinificación. Algunas de éstas están patentadas por el CSIC (Larrauri, 1997; Jiménez-Escrig *et al.*, 1997, 2001).

Nuestro grupo trabaja en el desarrollo de fibras antioxidantes en dos líneas paralelas. Por una parte, se llevan a cabo estudios de sus propiedades en salud. Se encuentran en desarrollo ensayos clínicos en el Hospital Carlos III de Madrid y en el Instituto Catalán de Oncología de Barcelona, dentro de proyectos del Plan Nacional de I+D.

Por otro lado, se estudia su aplicabilidad como ingrediente alimentario. En este aspecto, se ha comenzado por estudiar sus propiedades en una de las matrices más complejas, reestructurados de pescado graso, dentro del proyecto europeo *Sea Food Plus*

(VI Framework Programme, EU, Contract 506359). Los resultados preliminares son positivos, poniendo de manifiesto que la fibra antioxidante de uva previene la oxidación de los lípidos durante el periodo de comercialización del pescado. Es decir, puede servir para enriquecer en fibra alimentos grasos, ejerciendo al mismo tiempo de antioxidante eficaz, lo que no ocurre con las fibras actualmente comercializadas. Ello abre perspectivas para su aplicación en productos cárnicos, objetivo actualmente en desarrollo.

Antioxidantes, fibra y suplementos dietéticos

Una primera disyuntiva es la ingestión de antioxidantes a través de los alimentos o por medio de suplementos dietéticos. Se ha extendido mucho el uso clínico de los suplementos dietéticos antioxidantes de tipo vitamínico y de carotenoides, para prevención fundamentalmente de enfermedades cardiovasculares y determinados tipos de cáncer. Estos tratamientos han dado resultados contradictorios y, en algunos casos, han producido efecto perjudicial.

Si bien los requerimientos nutricionales de vitaminas antioxidantes están bien establecidos, el estado del conocimiento actual no permite fijar o recomendar con precisión una ingesta determinada de antioxidantes de tipo polifenólico o carotenoide.

Los suplementos vitamínicos pueden utilizarse en situaciones de carencia nutricional o de estrés, pero sin sobrepasar excesivamente las ingestas recomendadas para evitar posibles efectos pro-oxidantes, dado que los antioxidantes a dosis elevadas se convierten en pro-oxidantes.

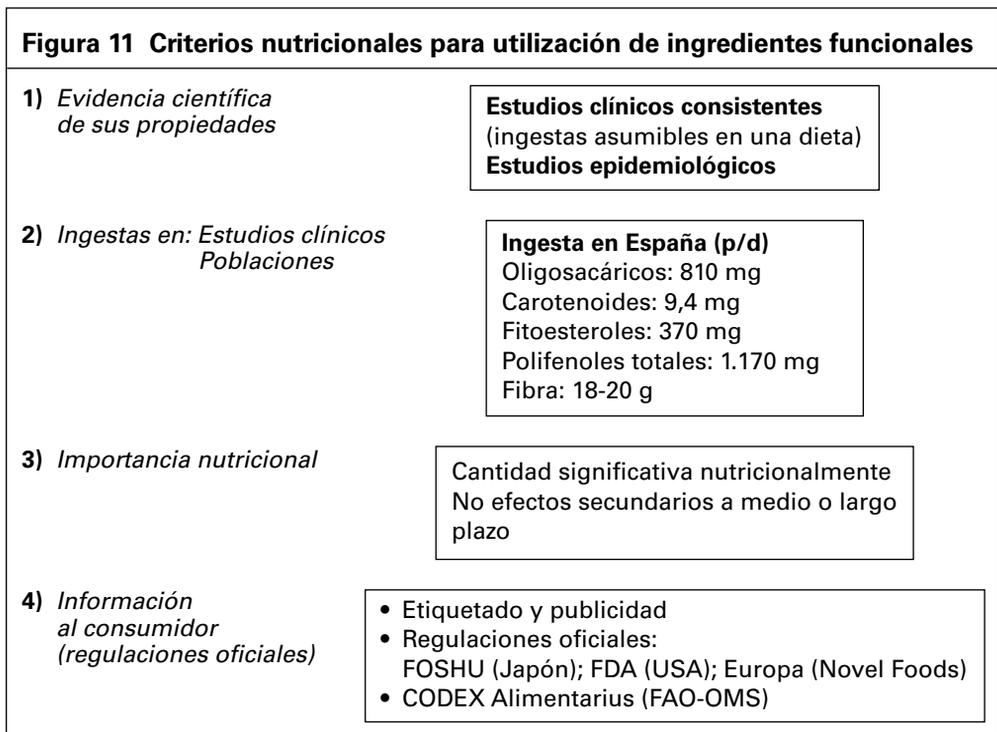
Con respecto a carotenoides y polifenoles, la recomendación ha de ser que su ingesta se realice a través de alimentos. Datos epidemiológicos asocian su consumo en la dieta con efectos positivos en salud. Hay que tener en cuenta que estos compuestos se liberan de la matriz del alimento de una forma parcial y secuencial dentro del tracto gastrointestinal y ejercen su acción antioxidante sinérgicamente junto con minerales y otros constituyentes de los alimentos. Sin embargo, los extractos de vegetales o compuestos específicos aislados utilizados en la preparación de suplementos dietéticos antioxidantes, cuando son ingeridos, se solubilizan completamente en el intestino y su sinergia y biodisponibilidad puede ser muy diferente a cuando se ingieren dentro de la matriz de los alimentos. Ello puede explicar los efectos positivos de alimentos ricos en carotenoides y los efectos negativos de la ingesta de suplementos de β -caroteno. Se ha comprobado que el β -caroteno utilizado como suplemento dietético puede favorecer el desarrollo de cáncer de pulmón.

Por ello, en el caso de los antioxidantes polifenólicos elaborados a partir de extractos de alimentos (pepita de uva, cacao y otros) que comienzan a aparecer en el mercado, es aconsejable tener en cuenta los aspectos indicados sobre su biodisponibilidad en el organismo.

Con respecto a la fibra, los suplementos pueden servir para lograr una ingesta adecuada en personas que consumen pocas frutas y verduras o para regímenes especiales. No se han descrito efectos negativos del uso de fibra en suplementos.

IV.8. Criterios nutricionales para la elaboración de alimentos funcionales

El desarrollo de un alimento funcional requiere la consideración de algunos aspectos básicos relacionados con las propiedades nutricionales del mismo y las alegaciones (*health claims*) que al respecto se le pretendan asignar, independientemente de los aspectos tecnológicos relacionados con su fabricación. Para ello podemos considerar cuatro puntos previos en relación con los ingredientes funcionales a utilizar (Saura-Calixto, 2004), que se indican en la figura 11.



1) Evidencia científica de sus propiedades

Los efectos potenciales en salud atribuibles a los ingredientes funcionales deben basarse en varios estudios clínicos consistentes, publicados en revistas científicas y aceptados por la comunidad científica. Los efectos observados o relatados como resultado de los estudios clínicos deben haberse conseguido con cantidades del ingrediente asumibles en una dieta. En caso contrario se estaría hablando de fármacos.

La existencia de estudios epidemiológicos que relacionen la ingesta de un ingrediente o alimento rico en dicho ingrediente con algún efecto positivo en salud refuerza la evidencia científica de sus propiedades.

2) Contenido de ingrediente en un alimento

Para fijar el contenido de ingrediente funcional en un alimento deben tenerse en cuenta tanto las cantidades del mismo utilizadas en los estudios clínicos de referencia como las cantidades habitualmente ingeridas en la dieta de poblaciones.

La cantidad de ingrediente ingerida al día por una persona a través del alimento funcional debe ser del mismo orden a la utilizada en los estudios clínicos y, sobre todo, no debe exceder las cantidades recomendadas nutricionalmente. Cuando no existan recomendaciones, no deberían sobrepasar las cantidades consumidas habitualmente por poblaciones sanas.

En el caso de la fibra, el consumo actual medio per cápita es de 20 g/día, y las ingestas recomendadas están entre 30 y 40 g.

En el caso de los compuestos bioactivos no existen todavía ingestas recomendadas. Como marco orientativo, la ingesta per cápita y día de carotenoides, compuestos polifenólicos antioxidantes y fitoesteroles en la población española es de 9,4; 1.171 y 370 mg, respectivamente.

3) Importancia nutricional

La cantidad de ingrediente incluida en un alimento debe ser nutricionalmente significativa. Quiere esto decir que el alimento debe contribuir significativamente a la ingesta para conseguir el efecto saludable deseado. Por ejemplo, es habitual que alimentos que se declaran enriquecidos en fibra tengan una contribución insignificante desde el punto de vista nutricional a la ingesta de fibra del consumidor.

Por otra parte, en el caso de ingestas que están dentro de rangos reportados en estudios clínicos de corta duración pero que superan ampliamente las ingestas de poblaciones —como puede ser el caso de algún alimento enriquecido en fitoesteroles—, debería tenerse evidencia de la ausencia de efectos secundarios a medio o largo plazo.

4) Información al consumidor

La información al consumidor a través del etiquetado y de la publicidad debe ajustarse a los criterios científicos indicados anteriormente y, en cualquier caso, a las regulaciones oficiales al respecto.

En el caso de Europa, todavía estas regulaciones son incipientes o están en larga discusión que retrasa su publicación oficial, lo que ha favorecido el uso de términos y conceptos que dan por evidentes propiedades nutricionales no probadas o que se presentan al consumidor de forma equívoca.

Hasta que se establezca una reglamentación oficial en la Unión Europea, pueden servir de referencia las regulaciones de la FDA (Food Drug Association) de Estados Unidos. En ellas se establecen claramente las alegaciones en salud que pueden hacerse en etiquetado, aquellas otras que se pueden utilizar con evidencia científica pero no concluyente, y los ingredientes generalmente reconocidos como seguros. En la tabla 10 se resumen las alegaciones en prevención de enfermedades más directamente relacionadas con los ingredientes objeto de este capítulo. También se mencionan, en la figura 11, otros organismos que emiten regulaciones de referencia.

Tabla 10 Regulaciones de la FDA (Food and Drug Administration, USA)	
Alegaciones concluyentes	Alegaciones no concluyentes
<ul style="list-style-type: none"> Ca (osteoporosis) Na, K (hipertensión) Poliololes (salud dental) Dieta baja en grasa y alta en fibra (cáncer) Dieta baja en grasa y alta en fibra soluble (ECV) Frutas y vegetales (cáncer y ECV) 	<ul style="list-style-type: none"> Se (cáncer) Vitaminas antioxidantes (cáncer) Frutos secos (ECV) Omega-3 (ECV) <p>GRAS (Generally Recognised As Safe)</p> <ul style="list-style-type: none"> Polifenoles en bebidas Licopeno Inulina Extractos de uva
<p>ECV: Enfermedades cardiovasculares.</p>	

IV.9. Limitaciones de las bases de datos y tablas de composición de alimentos

Referidas a fibra

Los datos de contenido en fibra de las tablas de composición de alimentos y los incluidos en el etiquetado corresponden generalmente a la recopilación de datos analíticos obtenidos por los métodos oficiales de la AOAC (Prosky *et al.*, 1988). No obstante, pueden tener un valor limitado debido a razones conceptuales y errores asociados a dicha metodología analítica (Mañas y Saura-Calixto, 1993, 1995).

La fibra se definió en los años setenta suponiendo que correspondía al total de los sustratos indigestibles de los alimentos. Sin embargo, hoy sabemos que la fibra sólo representa una parte de los mismos. En la tabla 11 se relacionan los sustratos indigestibles presentes en el intestino humano.

Tabla 11 Sustratos de fermentación en el colon humano
(Cumplings y MacFarlane, 1991)

Sustancias endógenas (60-10 g/día)

Enzimas y secreciones digestivas

Mucus, bacterias, células epiteliales de descamación, ácidos orgánicos, urea, nitratos, secreciones biliares, otras sustancias orgánicas

Sustancias exógenas

Almidón resistente (8-40 g/día)

Polisacáridos no almidón (8-18 g/día)

Oligosacáridos (2-8 g/día)

Azúcares no absorbidos y azúcares-alcoholes (2-10 g/día)

Quitina y aminoazúcares (2-6 g/día)

Sintéticos (lactulosa, lactitol, polidextrosa)

Aditivos alimentarios

Agentes fitoterapéuticos (ispágula, esterculia, etc.)

Proteína, grasa, compuestos Maillard, polifenoles (incluyendo lignanos, isoflavonoides), fitatos, esteroides, probióticos, agua

Para el mantenimiento del ecosistema intestinal, se estima que diariamente deben llegar al colon del orden de 60 g de materia orgánica, fermentable por la microbiota. Sin embargo, la ingesta media de fibra, como se ha indicado anteriormente, se estima en

sólo 20 g. Nos encontramos con un déficit de 40 g, es el denominado *carbohydrate gap* (Cummings, 1996; Cummings y MacFarlane, 1991).

Este *gap* se explica porque, además de fibra, otros constituyentes igualmente indigestibles como proteína resistente, almidón resistente, compuestos de Maillard, taninos y otros compuestos polifenólicos, etc., llegan al colon, donde también son sometidos a la acción de la fermentación por la flora bacteriana (Asp *et al.*, 1996).

Por otra parte, la metodología usual para la determinación de fibra en alimentos, el método oficial de la AOAC (Prosky *et al.*, 1988), conlleva asociados numerosas e importantes fuentes de error (Mañas y Saura-Calixto, 1993, 1995). Los datos analíticos de fibra no corresponden a los alimentos tal como se consumen, porque se obtienen en condiciones físico-químicas muy distintas de las fisiológicas.

Para tratar de solventar estas limitaciones hemos propuesto como alternativa el concepto de *fracción indigestible de los alimentos* y una metodología analítica más fisiológica para su determinación (Saura-Calixto *et al.*, 2000; Saura-Calixto y Goñi, 2004).

Fibra y fracción indigestible

La fracción indigestible (FI) se define como la parte de los alimentos vegetales que no es digerida ni absorbida en el intestino delgado y llega al colon, donde sirve como sustrato de fermentación para la microflora. Como tal, comprende no sólo la fibra dietética, sino también otros compuestos de probada resistencia a la acción de las enzimas digestivas, mencionadas anteriormente.

Los valores de FI de los alimentos pueden ser más útiles que los de fibra porque su determinación imita las condiciones fisiológicas y evita modificaciones artificiales de la digestibilidad de los nutrientes y errores asociados al análisis de la fibra dietética.

En la tabla 8 se incluyen valores de contenido en FI de algunos alimentos de la dieta española. La ingesta estimada de FI en nuestra dieta es de 41,5 g/persona/día (Saura-Calixto y Goñi, 2004). Este valor es mucho mayor que el correspondiente a la ingesta de fibra (18,3 g/persona/día) y está más próximo a la cifra de 60 g necesarios para mantener la flora intestinal. Otros compuestos endógenos, principalmente nitrogenados y algunos compuestos indigestibles de bajo peso molecular, como oligosacáridos y polialcoholes, junto con la FI de algún alimento minoritario no considerado en la estimación de la ingesta, como los platos preparados, pueden aportar la cantidad necesaria para alcanzar los 60 g de sustratos colónicos. En los valores indicados no se incluye la FI contenida en las bebidas. La literatura científica considera nulo el contenido

en fibra de las bebidas; sin embargo, hay resultados de estudios en desarrollo en nuestro grupo que revelan la presencia de componentes indigestibles solubles en cantidades significativas en bebidas como café, vino, cerveza, etc.

Referidas a antioxidantes

Las propiedades biológicas y nutricionales de los antioxidantes reportadas en la literatura corresponden con frecuencia a estudios realizados con ingestas muy superiores a las asumibles en dietas poblacionales. A esta limitación se suma el hecho de que los datos de contenidos en alimentos utilizados en dichos estudios se obtienen con metodologías incompletas y que difieren de las condiciones fisiológicas.

La determinación de compuestos antioxidantes y de su CA se realiza en extractos de alimentos obtenidos con diversos disolventes químicos (acetona-agua, etanol-agua, metanol-agua, acetato de etilo, etc.). La CA medida en esos extractos se identifica con la CA del alimento y los compuestos analizados en los mismos con el total de compuestos antioxidantes del alimento en cuestión.

Nuestra experiencia nos indica que en el residuo de estos extractos pueden quedar cantidades apreciables de compuestos antioxidantes no extraíbles, tales como compuestos polifenólicos y carotenoides asociados a fibra, taninos hidrolizables y taninos condensados de elevado peso molecular. Estos compuestos no extraíbles, sin embargo, no son inertes fisiológicamente, sino que se degradan en mayor o menor grado por la acción de las enzimas digestivas humanas y, especialmente, por la acción de las bacterias colónicas, dando lugar a compuestos de alta CA dentro del tracto gastrointestinal, cuyos efectos en salud pueden ser importantes y deben ser investigados.

Por ello, en nuestro grupo planteamos determinar la CA de un alimento como la suma de la CA de los extractos acuosos orgánicos, más la CA derivada de los compuestos bioactivos presentes en los residuos de extracción.

Aunque las determinaciones de antioxidantes y CA en extractos y residuos fuesen completas, pueden existir diferencias cuantitativas y cualitativas respecto a los compuestos liberados por el sistema digestivo humano. Es necesario tener en cuenta este aspecto a la hora de evaluar ingestas y propiedades biológicas y nutricionales de estos compuestos.

Es evidente que la CA determinada en extractos de alimentos y residuos de los mismos es sólo un valor potencial, ya que su biodisponibilidad y sus efectos en salud gastrointestinal vendrán determinados por el grado de liberación de los antioxidantes de

la matriz alimentaria producida por la acción de las enzimas digestivas (antioxidantes liberados en intestino delgado) y de las bacterias colónicas durante la fermentación de los sustratos no digeribles de los alimentos vegetales (fibra, almidón resistente, proteína no digerible y compuestos bioactivos asociados).

La determinación de la CA liberada en el intestino delgado y en el intestino grueso puede proporcionar datos de interés para estudiar los efectos en salud. Los antioxidantes liberados junto a los nutrientes en el intestino delgado son parcialmente absorbidos a través de la mucosa intestinal. Los antioxidantes no absorbidos y los contenidos en la fracción indigestible pueden sufrir fermentación colónica y formar productos de degradación que, además de crear un ambiente antioxidante en el colon, pueden ser parcialmente absorbidos y metabolizados en tejidos. Datos previos del grupo muestran claramente una elevada CA en los fluidos intestinales de animales de experimentación alimentados con dieta enriquecida en antioxidantes.

Ello sirve de base a un nuevo planteamiento fisiológico para el estudio de los antioxidantes, que se encuentra en desarrollo en nuestro grupo (Serrano *et al.*, 2005), claramente diferenciado de la metodología química usual. Los alimentos preparados tal y como se consumen habitualmente se tratan secuencialmente con enzimas digestivas y la fracción indigestible resultante se somete a fermentación colónica en condiciones de estricta anaerobiosis. La medida de antioxidantes y CA de las diferentes fracciones separadas en este proceso proporciona información sobre los antioxidantes fisiológicamente disponibles en el intestino delgado e intestino grueso. Los resultados difieren cualitativa y cuantitativamente de los obtenidos por los métodos químicos usuales.

IV.10. Conclusiones e hipótesis

- 1) Los factores dietéticos son causa de la mitad de los casos de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y de un tercio de la mortalidad por cáncer.
- 2) Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos asocian el consumo de fibra dietética y de diversos compuestos bioactivos de alimentos vegetales (polifenoles, carotenoides, fitoesteroles) con prevención de enfermedades crónicas, especialmente cardiovasculares y algún tipo de cáncer.
- 3) La fibra dietética es un regulador intestinal y algunos tipos de fibra, especialmente de fibra soluble, tienen efecto hipocolesterolémico, hipoglucemiante y prebiótico.

- 4) Los compuestos polifenólicos y los carotenoides de los alimentos ejercen su principal acción biológica a través de mecanismos antioxidantes y de secuestro de radicales libres, que se suman a la acción antioxidante de las vitaminas C y E de la dieta.
- 5) La principal acción de los fitoesteroles es hipocolesterolémica, a través de mecanismos de inhibición competitiva de absorción de colesterol.
- 6) Se recomienda que el consumo de fibra sea de al menos 30 g/persona/día, de los cuales un 30% debería ser de fibra soluble. La ingesta de fibra en la dieta española, al igual que en los países desarrollados, es del orden de 20 g/persona/día. No obstante, su calidad nutricional es adecuada, pues un 34% corresponde a fibra soluble. En los países centro y norteeuropeos la proporción de soluble es inferior.
- 7) Los valores de fibra de tablas de composición de alimentos y etiquetado de los mismos tienen un valor limitado, dado que sólo representan una parte de los compuestos no digeribles de los alimentos. Por ello, los estudios clínicos y epidemiológicos basados en los mismos tienen un valor parcial.
- 8) Se propone el término de fracción indigestible y el correspondiente procedimiento analítico, como alternativa al concepto de fibra dietética. La fracción indigestible incluye, además de fibra, otros sustratos no digeribles cuantitativamente importantes tales como almidón y proteína resistentes y polifenoles asociados.
- 9) Las bases de datos de compuestos bioactivos en alimentos corresponden a valores determinados por métodos químicos, que difieren cualitativa y cuantitativamente de los valores fisiológicos. Su análisis desde una perspectiva nutricional es una tarea científica pendiente.
- 10) La estimación de ingesta de compuestos bioactivos en nuestra dieta, expresada en miligramos/persona/día, es la siguiente: compuestos polifenólicos, 1.170 mg; carotenoides, 9,5 mg; fitoesteroles, 370 mg. Las ingestas de vitaminas C y E son de 126 y 13 mg, respectivamente.
- 11) La biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos y de los carotenoides es baja (del 5 al 15%) y el conocimiento de su metabolismo y propiedades biológicas es actualmente incompleto. Ello está dificultado por el elevado número de dichos compuestos en nuestra dieta (varios centenares) y la diversidad de las estructuras físico-químicas de los mismos.

- 12) Los compuestos polifenólicos y los carotenoides se liberan parcial y secuencialmente en el intestino delgado y en el intestino grueso.
- 13) Existen datos de capacidad antioxidante de compuestos aislados y de alimentos, pero, paradójicamente, no existen datos de capacidad antioxidante de dietas completas.
- 14) Se ha estimado en nuestro grupo que la capacidad antioxidante total de la dieta española es 3.550 μ moles de trolox, determinada por el método ABTS.
- 15) La capacidad antioxidante de la dieta es consecuencia del efecto sinérgico de compuestos polifenólicos, carotenoides, vitaminas y otros microconstituyentes de los alimentos. Su acción biológica depende de la biodisponibilidad de estos constituyentes.
- 16) Las vitaminas C y E representan alrededor del 10% de la capacidad antioxidante total de la dieta.
- 17) La principal fuente de antioxidantes de nuestra dieta corresponde, contrariamente a lo difundido y esperado, a las bebidas (72,6%), seguidas de frutas y verduras (17,3%) y frutos secos y legumbres (8,8%).
- 18) La contribución de los aceites vegetales a la capacidad antioxidante total de la dieta es insignificante (0,4%).
- 19) El consumo de café y de vino es cuantitativamente la principal fuente de antioxidantes en nuestra dieta, al aportar el 44,6 y 17,4%, respectivamente, del total.
- 20) La fibra y los antioxidantes en la dieta española y mediterránea pueden ser un factor importante en la prevención de cáncer intestinal y de enfermedades cardiovasculares.
- 21) Se proponen cuatro parámetros dietéticos para caracterizar la dieta mediterránea: relación ácidos grasos monoinsaturados/saturados, ingesta de fracción indigestible, capacidad antioxidante total de la dieta e ingesta de fitoesteroles.
- 22) La forma más idónea de ingerir fibra y compuestos bioactivos es a través de los alimentos. No obstante, ante las dificultades para modificar los hábitos dietéticos, el enriquecimiento de alimentos con ingredientes funcionales es una alternativa.

- 23) Existen numerosos tipos de fibra en el mercado y son conocidas las cantidades de referencia para su consumo. En el caso de los compuestos bioactivos, dado que el estado de conocimiento no permite hacer recomendaciones de ingestas, una referencia válida puede ser la ingesta de los mismos en dietas de poblaciones sanas, por ejemplo en la dieta mediterránea. Debe tenerse en cuenta que los antioxidantes en cantidades excesivas se convierten en pro-oxidantes.
- 24) La fibra antioxidante combina en un producto natural dos constituyentes saludables (fibra y antioxidantes), por lo que puede ser un ingrediente alimentario o un suplemento dietético de especial interés.
- 25) Para la elaboración de un alimento funcional deben seguirse criterios que aseguren su importancia nutricional no de forma aislada, sino integrados en una dieta.

IV.11. Bibliografía

Asp, N. G.; Van Amelsvoort y Hautvast, J. G. A. J.

(1996) Nutritional implications of resistant starch. *Nutr. Res. Rev.* 9, 1-31.

Banegas, J. R.; Rodríguez, F. A.; Graciani, A.; Villar, F, y Herrero, R.

(2002) Mortality attributable to cardiovascular risk factors in Spain. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 992-1003.

Bazzano, L. A.; He, J.; Ogden L. G. O.; Loria, C. M.; Vupputuri, S.; Myers, L., y Whelton, K.

(2002) Fruit and vegetables intake and risk of cardiovascular disease in US adults: The first National Health and nutrition examination survey epidemiological follow-up study. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 93-99.

Blomhoff, R.

(2005) Dietary antioxidant and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 16 (1), 47-54.

Bravo, L.; Abia, R., y Saura-Calixto, F.

(1994) Polyphenols as dietary fibre associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1481-1487.

Cater, N. B.

(2000) Plant stanol esters: review of cholesterol-lowering efficacy and implications for coronary heart disease risk reduction. *Prev. Cardiol.* 3, 121-130.

Cho, S. S., y Dreher, M. L. (eds.)

(2001) Handbook of dietary fiber. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Clifford, M. N.

(2004) Diet-Derived Phenols in Plasma and Tissues and their Implications for Health *Planta Med.* 70, 1103-1114.

Cummings, J. H.

(1996) Dietary fibre and fermentation concluding remarks. En: Dietary fibre and fermentation in the colon. COST Action 92. Mälkki, Y., y Cummings, J. H. (eds), pp. 394-398, European Commission, Brussels.

Cummings, J. H., y MacFarlane, G. T.

(1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 443-459.

De Pee, S., y West, C. E.

(1996) Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, 3, S38-S53.

De Vries, J. W.; Prosky, L.; Li, B., y Cho, S.

(1999) A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World* 44, 367-369.

Duthie, G. J.

(1999) Natural antioxidants in the protection against cigarette smoke injury. En: Antioxidant food supplements in human health. Packer, L.; Hiramatsu, M., y Yoshikawa, T. (eds). Academic Press, San Diego, USA, pp. 35-42.

Estruch, R., *et al.*

(2004) Different effect of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 175, 117-123.

Gardner, P.T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B., y Duthie, G. G.

(2000) The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* 68, 471-474.

Goldberg, G. (ed.)

(2003) *Plants: Diet and health. The report of the British Nutrition Foundation Task Force*, Blackwell Science, UK.

Goñi, I., y Saura-Calixto, F.

(2004) Capacidad antioxidante del aceite de oliva: ¿es significativa su contribución a la dieta española? Congreso Internacional sobre el aceite de oliva y salud. CIAS, Jaén.

Harborne, J. B.

(1988) *The Flavonoids. Advances in Research Since 1980*. London. Chapman and Hall.

Ho, C.-T.; Lee, C.Y., y Huang, M.-T.

(1992) *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I. Analysis, Occurrence, and Chemistry*. Washington. American Chemical Society, ACS Symposium Series 506.

Jacobs, Jr., D. R., y Steffen, L. M.

(2003) Nutrients, foods and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 508S-513S.

Jiménez-Escrig, A.; Santos-Hidalgo; Toledano, G.; Jiménez, I., y Saura-Calixto, F.

(2002) Plant sterols in the Spanish Mediterranean diet. En: *Bioactive cell wall components in nutrition and health*. Amado, R.; Abet, B.; Bravo, L.; Goñi, I., y Saura-Calixto, F. (eds). European Commission, Directorate General for Research, Brussels.

Jiménez-Escrig, A.; Jiménez, I.; Pulido, R., y Saura-Calixto, F.

(2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* 81, 530-534.

Jiménez-Escrig, A.; Rincón, M.; Pulido, R., y Saura-Calixto, F.

(2001) Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5489-5493.

Johnson, E.

(2002) The role of carotenoids in human health. *Nutr. Clin. Care* 5 (2), 56-65.

Karakaya, S.

(2004) Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 453-464.

Kritchevsky, D., y Bonfield, C. (eds.)

(1995) *Dietary fiber in health and disease*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Larrauri, J. A.; Rupérez, P., y Saura-Calixto, F.

(1997) Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4028-4031.

Lee, K. W.

(2004) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vitamins, phytochemicals, diets, and their implementation in cancer chemoprevention, 44, 437-452.

Liu, R. H.

(2003) Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 517S-520S.

Madamanchi, N. R.

(2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (1), 29-38.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C., y Jiménez, L.

(2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 27-747.

Mañas, E., y Saura-Calixto, F.

(1993) Ethanolic precipitation: A source of error in dietary fibre determination. *Food Chem.* 47, 351-355.

(1995) Dietary fibre analysis: methodological error sources. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49, 3, 158S-162S.

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

(2001) *La alimentación en España, 2000*. Secretaría General de Agricultura y Alimentación, Madrid.

Martínez-González, M. A., y Estruch, R.

(2004) Mediterranean diet, antioxidant and cancer: the need for randomized trials. *Eur. J. Cancer Prev.* 13 (4), 327-335.

- Martínez-González, M. A.; Fernández-Jarne, E.; Martínez-Losa, E.; Prado-Santamaría, M.; Brugarolas-Brufay, C., y Serrano-Martínez, M.
(2002) Role of fibre and fruit in the Mediterranean diet to protect against myocardial infarction: a case-control study in Spain. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 715-722.
- Mazza, G. (ed.)
(1998) *Functional Foods*. Technomic Publ., Lancaster, UK.
- Morales, F. J., y Babbel, M. B.
(2002) Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2788-2792.
- Moreno, L. A.; Sarria, A., y Popkin, B. M.
(2002) The nutrition transition in Spain: A European Mediterranean country. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 992-1003.
- O'Neil, M. E., *et al.*
(2001) A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br. J. Nutr.* 85, 499-507.
- Papas, A. M. (ed.)
(1999) *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. CRC Press, USA.
- Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J., y Lampi, A. M.
(2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 80, 939-966.
- Plat, J., y Mensink, R. P.
(2001) Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutr. Metab. Cardiovas. Dis.* 11, 31-40.
- Prosky, L.; Asp, N.-G.; Schweizer, T. F.; Devries, J. W., y Furda, I.
(1988) Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 1017-1023.
- Pulido, R.; Bravo, L., y Saura-Calixto, F.
(2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3396-3402.

Pulido, R.; Hernández-García, M., y Saura-Calixto, F.

(2003) Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 1275-1282.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M., y Rice-Evans, C.

(1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1231-1237.

Renaud, S., y Lorgeril, M.

(1992) Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-7.

Rock, C. L., y Swendseid, M. E.

(1992) Plasma β -carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 96-99.

Saura-Calixto, F., y Goñi, I.

(2004) The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 1078-1082.

(2005) Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem.* Disponible en www.sciencedirect.com

Saura-Calixto, F.

(1997) La fibra en nutrición y salud. *Alimentación, Nutrición y Salud* 4, 1, 17-21.

(1998) Antioxidant dietary fiber: a new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food. Chem.* 46, 4303-4306.

(2004) Alimentos funcionales: estado del arte. *Alimentaria*, Barcelona, marzo.

Saura-Calixto, F.; García-Alonso, A.; Goñi, I., y Bravo, L.

(2000) In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3342-3347.

Scalbert, A., y Williamson, G.

(2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 073S-2085S.

Schröder, H.; Marrugat, J.; Vila, J.; Covas, M. I., y Elosua R.

(2004) Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J. Nutr.* 134, 3355-3361.

Seddon, J., *et al.*

(1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *JAMA* 272, 1413-1420.

Serrano, J.; Goñi, I., y Saura-Calixto, F.

(2005) In vitro β -carotene and lutein intestinal availability of green leafy vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2936-2940.

Shahili, F., y Nack, M. (eds.)

(1995) *Food Phenolics*. Technomic Pub., Lancaster, UK.

Trichopoulou, A., y Lagiou, P.

(2001) The Mediterranean diet: Definition, epidemiological aspects, and current patterns. En: *The Mediterranean diet: Constituents and health promotion*. A.-L. Matalas, A. Zampelas, V. Stavrinou e I. Wolinsky (eds.), pp. 53-73. Boca Ratón, USA: CRC Press.

Trichopoulou, A.; Costacou, T.; Bamia, Ch., y Trichopoulos, D.

(2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England J. Med.* 348, 2599-2608.

Trowell, H. C.

(1976) Definition of dietary fiber and hypothesis that it is a protective factor in certain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 417-427.

Van der Hof, K.; Tijburg, L.; Pietrzik, K., y Weststrate, J.

(1999) Bioavailability of carotenoids and folate from different vegetables. Effect of disruption of the vegetable matrix. *Br. J. Nutr.* 82, 203-212.

Vinson, J. A.; Su, X.; Zubick, I., y Bose, P.

(2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5315-5321.

V. Lípidos como alimentos funcionales

María Dolores Mesa García, Concepción María Aguilera García,
Javier Linde Gutiérrez, María del Carmen Ramírez Tortosa
y Ángel Gil Hernández

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Nutrición
y Tecnología de Alimentos, Universidad de Granada

V.1. Resumen

V.2. Introducción

V.3. Aspectos estructurales, funcionales y metabólicos de los lípidos

Estructura y función de los lípidos

Ácidos grasos

Ácidos grasos *trans*

Otros componentes no glicéridos de las grasas

Metabolismo de los ácidos grasos esenciales y formación de AGPI

V.4. Efectos saludables de los lípidos de la dieta

V.5. Efectos de los lípidos de la dieta en situaciones fisiológicas

Gestación, lactancia e infancia

Requerimientos nutricionales

Transporte de AGPI de cadena larga a través de la placenta.

Relaciones entre los ácidos grasos del plasma materno y de los recién nacidos

Incorporación y metabolismo de los ácidos grasos esenciales en tejidos neurológicos

Efecto de los AGPI de cadena larga sobre el desarrollo neurológico fetal y neonatal

Efecto de los AGPI de cadena larga sobre la función visual

Efecto de los AGPI de cadena larga sobre el desarrollo del sistema inmune

Periodo adulto

Ingesta y requerimientos de AGMI y AGPI

V.6. Efectos de los lípidos de la dieta en situaciones patológicas

Procesos inflamatorios

Enfermedades cardiovasculares

Cáncer

V. Lípidos como alimentos funcionales

Enfermedades de la piel

Otras situaciones patológicas

Nefropatía por inmunoglobulina A

Enfermedad pulmonar

Enfermedad de Alzheimer

Síndromes relacionados con alteraciones de los peroxisomas

V.7. Conclusiones

V.8. Bibliografía

V.1. Resumen

Las grasas alimentarias son los nutrientes que mayor atención han recibido por parte de todos los miembros de la sociedad, debido a los efectos que supone su ingesta elevada y a las connotaciones negativas que tienen sobre la salud. Sin embargo, la esencialidad de estos nutrientes, junto con sus efectos sobre distintos procesos fisiológicos y patológicos, los han convertido en el centro de muchas investigaciones encaminadas a identificar las propiedades tanto positivas como negativas de los distintos tipos de grasas durante todas las etapas de la vida. Todos estos estudios han destacado la necesidad de ingerir una dieta con un perfil lipídico adecuado para que el organismo pueda enfrentarse a distintas situaciones a lo largo de su vida.

En las primeras etapas de desarrollo, la ingesta de cantidades adecuadas de ácidos grasos esenciales, así como de ácido docosahexaenoico (DHA), presente en cantidades relativamente elevadas en la leche materna, así como en el pescado, permite la correcta formación del sistema nervioso, concretamente del cerebro y la retina, por lo que es importante destacar la necesidad de que las madres ingieran cantidades adecuadas de pescado durante los periodos de gestación y lactancia del niño.

Muchas de las enfermedades más frecuentes en la actualidad, como las cardiovasculares, la artritis reumatoide, enfermedades intestinales o pulmonares, cursan con procesos inflamatorios crónicos que pueden ser modulados en función de los lípidos de la dieta. Así, las grasas poliinsaturadas de la serie n-3 procedentes del pescado que pasan a formar parte de las membranas son precursores de citoquinas y eicosanoides menos proinflamatorios que los sintetizados a partir de ácidos grasos de la serie n-6, procedentes de alimentos vegetales como el girasol y el maíz.

Cabe destacar el efecto beneficioso de las grasas monoinsaturadas procedentes del aceite de oliva sobre el sistema cardiovascular, ya que son capaces de disminuir el LDL-colesterol y aumentar el HDL-colesterol. Por otro lado, las grasas poliinsaturadas de la serie n-3 son capaces de disminuir las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG) y controlar otros factores como la expresión de moléculas inductoras de los procesos aterogénicos.

El cáncer es otra de las enfermedades más frecuentes en las sociedades más desarrolladas que ha demostrado estar influenciada por la dieta. Parece ser que las grasas de la serie n-6 incrementan el estrés oxidativo y la síntesis de moléculas que estimulan el desarrollo del tumor, mientras que las grasas de la serie n-3 podrían normalizar los procesos apoptóticos, controlando así el desarrollo del tumor.

Si nos fijamos en el perfil lipídico de la dieta recomendado, se observa que éste representa el de la dieta mediterránea, rica en pescado y caracterizada por el uso de aceite de oliva como principal fuente grasa. Esto justificaría, al menos en parte, las observaciones epidemiológicas positivas que se han observado en los países mediterráneos en relación con el consumo de aceite de oliva y de pescado, y la menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y otras patologías de base inflamatoria.

En este capítulo se describen los efectos beneficiosos para la salud de algunos tipos de grasas y aceites alimentarios, especialmente aquellos ricos en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) de la serie n-3, u omega 3, y se hace énfasis en las razones fisiológicas y metabólicas fundamentales que permiten considerarlos como ingredientes funcionales. Asimismo, se describe el papel preventivo, y en algunos casos terapéutico, de los lípidos de la dieta sobre determinadas enfermedades crónicas de base inflamatoria.

V.2. Introducción

Los lípidos de la dieta están constituidos por sustancias diversas de naturaleza compleja, todas ellas caracterizadas por ser insolubles en agua. Las grasas (sólidas) y los aceites (líquidos), compuestos fundamentalmente por triglicéridos, son los compuestos más abundantes. Junto a ellos se encuentran pequeñas cantidades de esteroides, fosfolípidos y otros compuestos minoritarios tales como vitaminas liposolubles, compuestos fenólicos, etc. Bajo el punto de vista dietético, el concepto de lípidos se asimila al de grasa. Así, las grasas alimenticias incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales y animales que se ingieren como alimentos.

La grasa es un nutriente esencial e imprescindible para la vida; sin embargo, para muchas personas tiene connotaciones negativas para la salud. Por este motivo, las grasas de la dieta han recibido más atención por parte de los profesionales de la salud y del público en general que cualquier otro nutriente. Durante muchos años, la mayoría de las informaciones que llegaban a los hogares resaltaban los aspectos negativos de los lípidos alimentarios; sin embargo, tras muchos años de investigaciones se ha llegado a la conclusión de que las grasas no sólo son necesarias, sino que tomadas en su justa medida, y dependiendo del tipo que sean, pueden ser saludables. Debido a esta sensibilización de la población, las investigaciones sobre el papel de la grasa dietética en la nutrición humana pueden tener consecuencias importantes para los consumidores, los responsables sanitarios e incluso para la industria alimentaria. Sus resultados podrían influir profundamente en la educación nutricional y en el consu-

mo de diversos alimentos, y así modular el estado de salud de las distintas poblaciones. Por otro lado, también podrían tener consecuencias a nivel de la industria alimentaria, sobre la producción agrícola y sobre las tecnologías de preparación de los alimentos.

En las últimas décadas se ha determinado que lo más importante no es sólo la cantidad de grasa ingerida, sino que, dependiendo de la calidad de ésta, los efectos en el organismo pueden variar. Así, los diferentes ácidos grasos pueden ser precursores de distintas moléculas fundamentales cuya actividad puede ser más o menos intensa en el organismo. Lo importante es buscar el equilibrio de los componentes grasos ingeridos sin renunciar a ningún tipo de alimento, para asegurarse niveles adecuados de todos los nutrientes necesarios.

La dieta mediterránea es rica en alimentos de origen vegetal, y se caracteriza fundamentalmente por el uso de aceite de oliva como principal fuente grasa, además de un elevado consumo de alimentos de origen marino que garantizan una ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (AGPI n-3), también denominados omega 3. Ésta representa lo que actualmente se considera una dieta equilibrada y sana, que sirve de referencia para los nutricionistas.

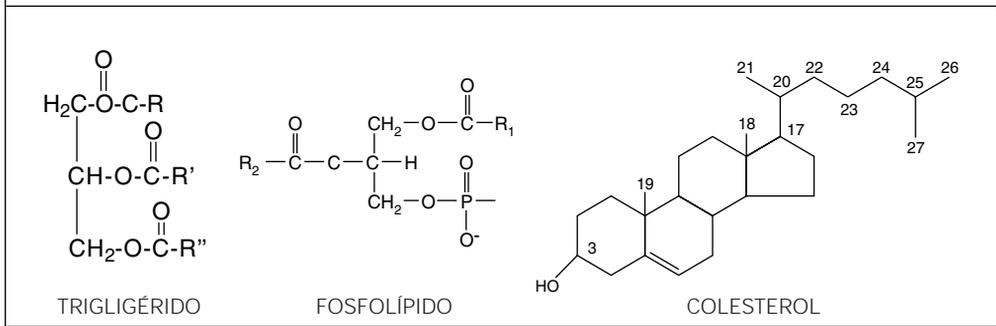
El objetivo de este capítulo es describir brevemente los aspectos funcionales de los lípidos alimentarios y su influencia sobre el crecimiento y desarrollo del ser humano, especialmente en las etapas de la gestación, lactancia e infancia, así como la prevención y el tratamiento de algunas patologías crónicas de base inflamatoria tales como enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades de la piel de naturaleza autoinmune.

V.3. Aspectos estructurales, funcionales y metabólicos de los lípidos

Estructura y función de los lípidos

Por definición, los lípidos son biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono e hidrógeno, y oxígeno en porcentajes mucho más bajos; también pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre. Todos comparten una propiedad físico-química común: se caracterizan por su insolubilidad en agua y por su solubilidad en disolventes orgánicos. Su estructura se muestra en la figura 1.

Figura 1 Estructura de los principales lípidos alimentarios



Los lípidos de la dieta constituyen uno de los principios inmediatos más importantes de nuestra alimentación, con varias funciones vitales que los convierten en nutrientes fundamentales para el buen funcionamiento del organismo. Está claro que ejercen una función doble en la fisiología del organismo, como fuente de energía y como reguladores de la función celular, afectando a múltiples acciones fisiológicas en las que están implicados algunos mediadores de señales inter e intracelulares, como hormonas, eicosanoides y ciertos factores de transcripción.

Los **triglicéridos** son la principal reserva energética del organismo, contribuyen a satisfacer las demandas de energía y de ácidos grasos esenciales. Además, son el vehículo de las vitaminas liposolubles en los alimentos. Estructuralmente, son ésteres del glicerol con ácidos grasos de longitud de cadena y grado de insaturación variables (figura 1).

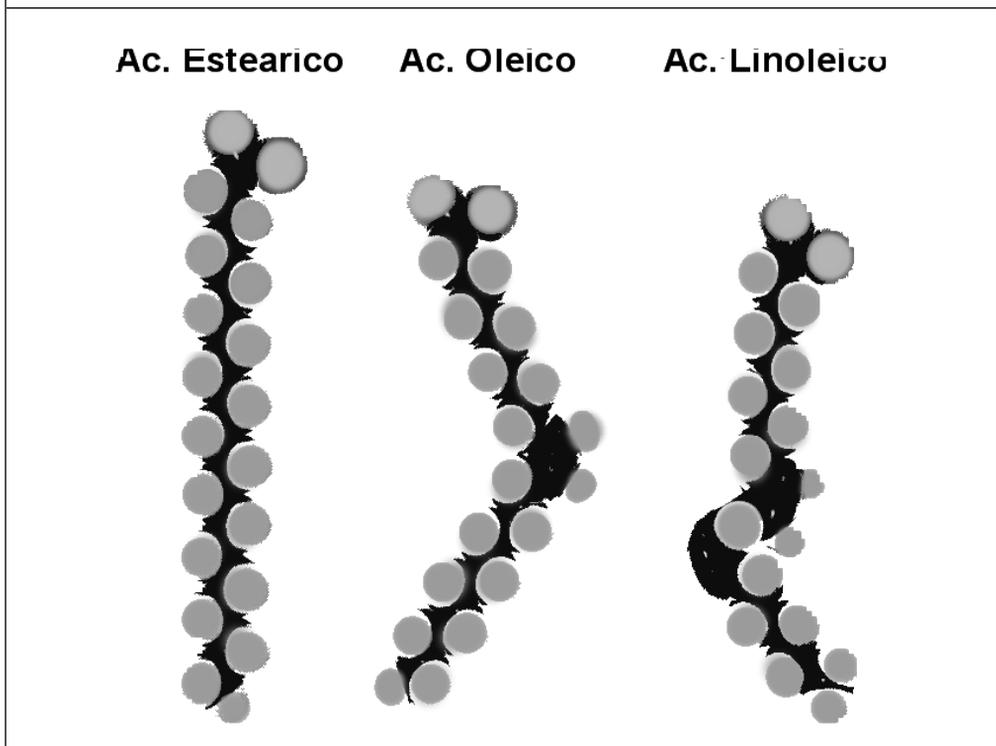
Los **lípidos complejos**, entre los que predominan los fosfolípidos, son componentes estructurales fundamentales de las membranas celulares cuya composición en ácidos grasos determina las propiedades físico-químicas y funcionales. Además, se incorporan a tejidos y órganos corporales, recubriéndolos, dándoles consistencia y protegiéndolos mecánicamente, como en el caso del tejido adiposo de los pies y las manos. Estructuralmente, los fosfolípidos son en su mayoría ésteres fosfóricos de glicerol y de ácidos grasos (figura 1).

El **colesterol** es el principal esteroide de los productos animales. Resulta esencial para la vida ya que forma parte de membranas celulares y es precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares y de la vitamina D. Sin embargo, su acumulación en el plasma sanguíneo y en los tejidos por encima de los niveles normales resulta perjudicial para la salud (figura 1).

Ácidos grasos

Los **ácidos grasos** están constituidos por cadenas alifáticas de carbono e hidrógeno unidas a un resto carboxilo. Los ácidos grasos pueden ser almacenados en el organismo como triglicéridos, o formar parte de las membranas como fosfolípidos u otros lípidos de naturaleza compleja. Son componentes esenciales y constituyen la parte con mayor interés nutritivo, ya que el tipo de ácido graso y su posición en la molécula lipídica determinan las características físico-químicas de las membranas celulares, como la fluidez, flexibilidad y la permeabilidad selectiva, y funcionales, como la adaptación al frío y la supervivencia, la defensa frente a patógenos, la endocitosis y exocitosis, la modulación de los canales iónicos, las actividades de enzimas asociadas a membrana y las de algunos factores nucleares (Wallis *et al.*, 2002).

Figura 2 Estructura de algunos ácidos grasos presentes en los alimentos



Existen dos tipos básicos de ácidos grasos, los saturados y los insaturados, aunque estos últimos se clasifican a su vez dependiendo del número de insaturaciones que contengan (figura 2). Los *ácidos grasos saturados* (AGS) son estructuras lineales que

contienen un número par de átomos de carbono unidos por enlaces simples; abundan en los animales terrestres, especialmente en los mamíferos, así como en algunos aceites vegetales como el de coco y palma. Los *ácidos grasos monoinsaturados* (AGMI) contienen un doble enlace, como el ácido oleico (*cis* 18:1 n-9), que está presente en casi todas las grasas animales y en algunos aceites vegetales, especialmente en el aceite de oliva, donde puede alcanzar hasta un 80% del total de ácidos grasos. Finalmente, los *ácidos grasos poliinsaturados* (AGPI), con más de un doble enlace, se clasifican en función de la posición del último doble enlace respecto al metilo terminal de la molécula. Según esto, existen dos familias: los AGPI de la serie n-6 y los n-3. El principal ácido graso de la serie n-6 es el linoleico (LA, 18:2 n-6), ampliamente distribuido en las plantas, principalmente en los aceites de semillas vegetales como el maíz, girasol y soja, precursor del ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6) en los mamíferos, y por lo tanto presente en los alimentos de origen animal. Por otra parte, el ácido α -linolénico (LNA, 18:3 n-3) predomina en plantas de hoja verde oscura y en los aceites de semillas de soja, lino, colza, nueces, grosella y otras frutas rojas, mientras que los animales marinos son ricos en eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), al igual que las algas y el plancton marino, de los cuales se alimentan y que constituyen las fuentes primarias de AGPI n-3.

Los ácidos grasos de las series n-6 y n-3 que forman parte de los fosfolípidos de membrana ejercen un control metabólico a través de su papel como precursores de los eicosanoides y otros compuestos biológicamente activos, como algunos factores de coagulación, cuya síntesis depende de los AGPI situados en la posición 2 de los fosfolípidos, siendo estimulada por el AA y disminuida por la presencia de ácidos grasos de la serie n-3 (Pearson, 1993).

En los últimos años se ha comprobado que los ácidos grasos libres o esterificados con coenzima A pueden actuar como mediadores intracelulares capaces de regular la expresión génica de distintas enzimas que intervienen en el metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y proteínas, así como en la regulación del crecimiento celular (genes de respuesta temprana inmediata). Parece que los ácidos grasos pueden interactuar directamente con algunos factores de transcripción para controlar su actividad y alterar la transcripción de los genes implicados en la síntesis o metabolismo de eicosanoides y otros factores, o de forma indirecta modificando su actividad o concentración en el núcleo. Así, el conocimiento de estos mecanismos moleculares permitirá establecer nuevas estrategias terapéuticas para controlar el metabolismo lipídico, los niveles sanguíneos de triglicéridos y colesterol y otros factores de riesgo importantes para algunas enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer e incluso enfermedades neuronales degenerativas (Jump, 2004).

La mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por los mamíferos a partir de los hidratos de carbono de la dieta, pero hay dos de ellos, el LA y el LNA, que no pueden ser sintetizados de forma endógena, ya que el organismo humano no posee actividad Δ^{12} - ni Δ^{15} -desaturasa y, por tanto, no puede introducir dobles enlaces en los carbonos 12 ni 15 (Morimoto *et al.*, 2005). Sin embargo, estos ácidos grasos son necesarios para el buen funcionamiento del organismo y deben ser obligatoriamente ingeridos a través de los alimentos; por este motivo son considerados “ácidos grasos esenciales”.

A menudo, los aceites vegetales insaturados se hidrogenan parcialmente por vía química para producir grasas más sólidas, más plásticas y más estables. En este proceso, uno o más dobles enlaces de los ácidos grasos pueden cambiar de configuración *cis* a *trans* (isomerización geométrica) o cambiar de posición dentro de la cadena de átomos de carbono (isomerización posicional). La presencia de estos ácidos grasos *trans* puede controlarse en el proceso de elaboración del aceite. Las fuentes más frecuentes de ácidos grasos *trans* son las margarinas y grasas de repostería, que contienen aceites de pescado o vegetales parcialmente hidrogenados, la carne de los rumiantes y la leche.

Ácidos grasos *trans*

A diferencia del oleico, los isómeros *trans* tienden a elevar los niveles séricos de LDLc y a reducir los de HDLc, por lo que su consumo elevado no es conveniente, aunque se desconoce si son más o menos perjudiciales que los AGS, lo cual resulta interesante a la hora de la fabricación de productos alimenticios (Nicolosi y Rogers, 1997; Larqué *et al.*, 2001).

Debido a este efecto hipercolesterolémico, se debe estimular a los consumidores a que sustituyan las grasas sólidas por aceites líquidos, margarinas blandas y derivados siempre que sea posible, con el fin de disminuir el consumo de AGS y, de forma paralela, ácidos grasos *trans*, y así mejorar el perfil de las lipoproteínas plasmáticas. Por otro lado, durante el embarazo y la lactancia se deben evitar los aportes elevados de estos isómeros, ya que se podría provocar una deficiencia de ácidos grasos esenciales. Es inaceptable que se utilicen mensajes publicitarios como “bajo en saturados” cuando un producto es rico en isómeros *trans*, y los gobiernos deben vigilar esta publicidad engañosa acerca de las propiedades de los ingredientes alimentarios (Flickinger y Huth, 2004).

Otros componentes no glicéridos de las grasas

Las grasas alimentarias contienen una gran variedad de componentes en pequeñas concentraciones, pero que, aun así, cada vez están cobrando más importancia por sus

implicaciones en la salud, principalmente por sus actividades como antioxidantes. La presencia de estos compuestos no glicéridos podría explicar algunas de las contradicciones encontradas en los estudios epidemiológicos y experimentales. Entre ellos se pueden encontrar vitaminas liposolubles, como las vitaminas A, D y E, ubiquinonas, alcoholes derivados del metilesterol y del triterpeno, fitosteroles y escualeno. Este último está cobrando importancia recientemente por su capacidad anticancerígena, principalmente a nivel de la piel, donde se acumula preferentemente (Owen *et al.*, 2004). Asimismo, algunos aceites, como el de oliva virgen, son vehículos de compuestos fenólicos con elevado poder antioxidante.

Se ha propuesto que los antioxidantes alimentarios protegen frente al envejecimiento y los procesos asociados a éste, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Su papel en la protección de los ácidos grasos cobró importancia cuando se reconoció que las LDL oxidadas podían intervenir en el proceso aterosclerótico (Jurgens *et al.*, 1987).

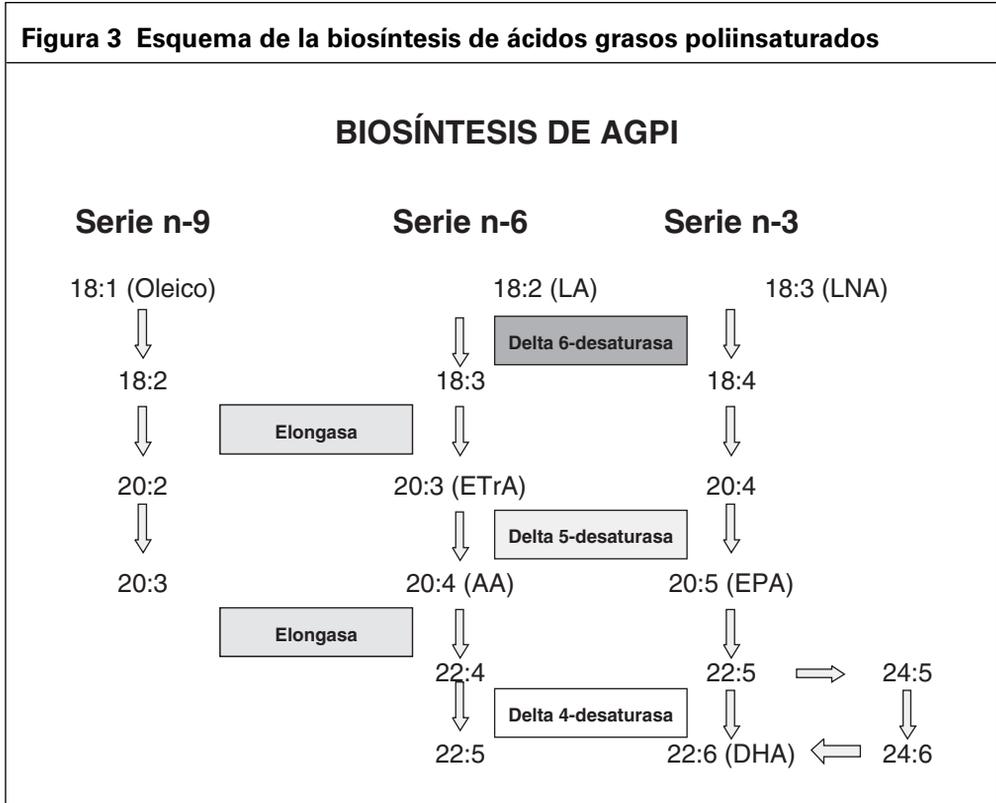
Metabolismo de los ácidos grasos esenciales y formación de AGPI

A partir del palmítico (16:0) y esteárico (18:0) se obtienen mediante la Δ^9 -desaturasa los AGMI más abundantes del organismo, el ácido palmitoleico (16:1 n-7) y el oleico (18:1 n-9), respectivamente, que, junto con los ácidos grasos esenciales, LA y LNA, son los precursores de las especies moleculares más insaturadas de cada familia. La estructura de algunos ácidos grasos está representada en la figura 2.

La síntesis de AGPI se lleva a cabo en órganos o tejidos especializados, principalmente en hígado, aunque también en el intestino, cerebro y en la retina, y puede estar limitada en algunas etapas del desarrollo o en algunas patologías. Principalmente se sintetizan AA y DHA, que son fundamentales para una gran variedad de funciones fisiológicas (McCowen y Bistrrian, 2005). Además, las dos familias de AGPI no son interconvertibles entre sí en nuestro organismo. La figura 3 esquematiza la formación de AGPI.

La síntesis de AGPI de cadena larga consiste en reacciones sucesivas de elongación y desaturación alternativas catalizadas por la enzima ácido graso elongasa y las Δ^6 - y Δ^5 -desaturasas; parece ser que la Δ^6 -desaturasa condiciona el paso limitante de la ruta biosintética. El mecanismo final por el que se llega a la síntesis de DHA aún no está del todo claro, aunque todo apunta a que la síntesis tiene lugar mediante una elonga-

ción y una Δ^6 -desaturación, seguidas por una retroconversión a través de una β -oxidación peroxisomal (figura 3) (Wallis *et al.*, 2002; Qiu, 2003).



Estos AGPI de cadena larga constituyen el 21-26% de los ácidos grasos en las membranas celulares, pero la proporción de ácidos grasos de 20 ó 22 átomos de carbono varía en los diferentes tejidos. Mientras que el AA está ampliamente distribuido en la mayoría de los tejidos, el DHA es más específico en su distribución y se encuentra principalmente en los tejidos neuronales como el cerebro y la retina, así como en algunos tejidos ajenos al sistema nervioso central (Lauritzen *et al.*, 2001). En condiciones fisiológicas, el contenido de AA y DHA en los tejidos se mantiene mediante una regulación *feedback* de la ruta biosintética. Se ha comprobado que la actividad ácido graso desaturasa y la síntesis de AGPI de cadena larga están bajo el control de la grasa de la dieta y otros factores endógenos, tales como la insulina, la hormona del crecimiento, estímulos inflamatorios y proliferadores peroxisómicos (Nakamura y Nara, 2003).

V.4. Efectos saludables de los lípidos de la dieta

Los ácidos grasos esenciales, así como sus derivados poliinsaturados de cadena larga n-6 y n-3, son fundamentales durante la gestación, la lactancia y la infancia, ya que se necesitan para el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos, especialmente del sistema nervioso. Su presencia en órganos especializados como el cerebro y la retina es muy elevada, por lo que es necesario aportar cantidades adecuadas de ácidos grasos esenciales y de AGPI para asegurar un adecuado crecimiento y desarrollo del niño, tanto a la madre durante la gestación y la lactancia como al lactante.

Por otro lado, existen distintas situaciones patológicas en el individuo que también pueden modularse mediante el consumo de determinados ácidos grasos. Por ejemplo, los procesos inflamatorios y de reparación tisular pueden ser perjudiciales cuando se hacen crónicos. Numerosas patologías, tales como la aterosclerosis, las hepatitis, las enfermedades inflamatorias del intestino, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la psoriasis, la artritis reumatoide y otras muchas enfermedades de naturaleza autoinmune, representan alteraciones inflamatorias crónicas en las que se producen mediadores químicos de inflamación, llamados genéricamente eicosanoides, a partir de algunos AGPI de las membranas celulares. La mayor actividad proinflamatoria de los eicosanoides derivados del AA (n-6), frente a los derivados del EPA (n-3), explica la acción antiinflamatoria de los AGPI n-3. Asimismo, se ha demostrado que la alimentación rica en ácido oleico disminuye la intensidad de los procesos inflamatorios en varias patologías.

Las enfermedades cardiovasculares representan el mayor problema de salud en nuestro medio. Junto al cáncer y las complicaciones de la diabetes mellitus, son responsables de aproximadamente el 75% de la mortalidad total en los países desarrollados. Varios estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que los factores dietéticos, y particularmente el tipo de grasa ingerido, son responsables de la diferente tasa de mortalidad cardiovascular observada en distintos países.

La Asociación Internacional para el Estudio de los Ácidos Grasos y de los Lípidos (ISSFAL) ha recomendado que la ingesta diaria de EPA y DHA debe ser de 650 mg/d, con un mínimo de 100 mg/d. Asimismo, la OMS ha recomendado una ingesta mínima de AGPI n-3 de cadena larga de 150 mg/d (OMS, 2003). Estas cifras sólo se alcanzan en sujetos que comen pescado y otros alimentos marinos de forma habitual. El consumo de 30-60 g/día de pescado azul permite cubrir los requerimientos nutricionales; sin embargo, muchos sectores de la población no comen suficiente pescado, por lo

que cubrir la ingesta recomendada se hace a menudo muy difícil. Ésta es una de las razones fundamentales que explican la aparición durante los últimos años de varios productos enriquecidos con ácidos grasos n-3, que tratan de contribuir a satisfacer los requerimientos nutricionales de estos lípidos.

V.5. Efectos de los lípidos de la dieta en situaciones fisiológicas

Gestación, lactancia e infancia

Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales durante el embarazo están determinados por las necesidades tanto de la madre como del feto. Existen evidencias científicas donde se manifiesta que una adecuada nutrición de las madres se asocia con un buen estado de salud durante el embarazo, con un menor porcentaje de complicaciones gestacionales y con el desarrollo y el crecimiento fetal. El DHA es el principal componente graso de la materia gris del cerebro y del tejido retiniano, tanto en humanos como en diferentes mamíferos. Por lo tanto, la importancia de un adecuado aporte de ácidos grasos durante las primeras etapas de vida se debe a su implicación en la correcta formación del feto, y a sus consecuencias a largo plazo tanto en el comportamiento y el desarrollo cognitivo en la etapa adulta como en el riesgo de padecer distintas enfermedades futuras.

La dieta constituye la principal fuente de ácidos grasos esenciales para la mujer gestante, y debe contener cantidades suficientes de AGPI para cubrir sus propias necesidades y las del feto. Si el aporte dietético no es suficiente, los depósitos corporales de la madre se emplearán para intentar garantizar los niveles adecuados para el efecto; por lo tanto, hay que enfatizar la importancia del aporte lipídico especialmente durante los periodos de gestación, lactancia y, posteriormente, durante la infancia del individuo (Hornstra, 2000).

El sistema nervioso es el segundo sistema con mayor concentración de lípidos del organismo, particularmente rico en DHA y AA, que se encuentran formando parte de fosfolípidos y colesterol estructurales de las membranas. El metabolismo de estos AGPI, principalmente DHA, está muy regulado y se ha comprobado que este ácido graso es esencial para el correcto desarrollo de las funciones cognitivas y de la visión.

Los AGPI de cadena larga están implicados de manera significativa en el correcto desarrollo neurológico y mental, en la atención frente a estímulos sensoriales, en la función visual y, por otro lado, en el correcto desarrollo del sistema inmunológico. Se sabe que el déficit de ácidos grasos esenciales n-6 y n-3 durante el periodo gestacional induce daños irreversibles en la función cerebral, y que la suplementación tras este periodo no induce la recuperación de la habilidad de aprendizaje en modelos con ratas (Takeuchi *et al.*, 2002). También puede provocar un incremento de la mortalidad perinatal, alteraciones del crecimiento, cambios en el comportamiento y en el aprendizaje y disminución de la agudeza visual, además de otras alteraciones fisiológicas. Se ha observado que la malnutrición permite una funcionalidad cerebral estable; sin embargo, ante ciertas situaciones estresantes, los individuos resultan más susceptibles a presentar trastornos neuroafectivos. En ciertos déficits perioxosómicos, tales como el síndrome de Zellweger, existen concentraciones reducidas de DHA en cerebro y retina, apareciendo en estos niños ceguera y atonía generalizada; algunos de estos síntomas revierten tras la suplementación con DHA (Martínez, 2001).

El estado de ácidos grasos esenciales y de AGPI de cadena larga del feto está determinado en gran medida por el perfil lipídico de la madre (Elias e Innis, 2001; Rump *et al.*, 2001), que a su vez depende de la ingesta de ácidos grasos a través de la dieta. Existe una moderada variabilidad en el consumo de LA, LNA y AA; sin embargo, los valores de DHA son más altos en aquellos países con un mayor consumo de pescado (Minda *et al.*, 2002).

Parece ser que el equilibrio n-6/n-3 en la dieta normal de una embarazada está notablemente desplazado hacia la ingesta excesiva de n-6. Debido a la competitividad metabólica entre ambas familias de AGPI, un cociente muy alto puede comprometer la biodisponibilidad fetal de los ácidos grasos elongados n-3, interfiriendo en el desarrollo fetal. Por este motivo, es necesario asegurar la ingesta de alimentos con un elevado contenido de AGPI n-3, como el pescado azul, durante el periodo gestacional (Pertegaudo *et al.*, 1995).

Para garantizar los requerimientos de la madre y del hijo se recomienda una ingesta diaria de 13 g de AGPI de cadena larga de la serie n-6, mientras que la ingesta de AGPI de cadena larga de la serie n-3 debe ser de 1,4 g durante el embarazo y 1,3 g durante el periodo de lactancia; dado que el organismo puede sintetizar AGS, no se han establecido ingestas recomendadas (RDA) para este último tipo de ácidos grasos, pero sí se recomienda una ingesta del 5-10% de la energía para la ingesta de AGPI de la serie n-6 y de 0,6-1,2% de la energía para los AGPI de la serie n-3, pudiendo provenir el 10% de éstos AGPI de cadena larga (Institute of Medicine, 2002).

Transporte de AGPI de cadena larga a través de la placenta

El embarazo está asociado con una movilización de DHA desde los depósitos maternos, que se recuperan lentamente tras el parto (Hornstra *et al.*, 1995). La placenta actúa como una barrera que deja pasar de forma selectiva los distintos nutrientes ajustándose perfectamente a las necesidades del nuevo feto (Haggarty *et al.*, 2002), aunque siempre trabajando con la mezcla de ácidos grasos disponibles en la circulación materna, lo que indica la importancia de la composición de la dieta de la madre. El hecho de que durante la gestación las concentraciones plasmáticas de TG aumenten de manera superior a la de otras fracciones lipídicas sugiere que los TG son la mayor fuente de ácidos grasos esterificados para la placenta, aunque sólo los no esterificados pueden unirse a las proteínas transportadoras y atravesarla (Herrera, 2002).

Varios mecanismos facilitan el transporte unidireccional de AGPI desde la madre hacia el feto, como por ejemplo, proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP) que se localizan únicamente en la cara materna de la placenta (Campbell y Dutta-Roy, 1995). Por otro lado, existen unos sitios específicos de unión a las lipoproteínas y una lipoproteína lipasa en la cara materna de la placenta que no está presente en el lado fetal (Waterman *et al.*, 2000). Además, una leptina placentaria se libera a la circulación materna durante el embarazo para estimular la liberación de ácidos grasos libres mediante lipólisis (Gómez *et al.*, 1999).

El orden prioritario de captación de los ácidos grasos por la placenta es el siguiente: AA>DHA>LNA>LA. El AA se queda retenido en este tejido, cuyos requerimientos son muy elevados debido a la elevada tasa de síntesis de prostaciclina (PC), prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT). Por lo tanto, el orden de transferencia prioritario final de ácidos grasos hacia el feto a través de la placenta es: DHA>LNA>LA>AA (Haggarty *et al.*, 1997).

Relaciones entre los ácidos grasos del plasma materno y de los recién nacidos

Se ha comprobado una elevación de los lípidos totales, y particularmente AA y DHA, en el plasma de la mujer gestante, incluso cuando no se había producido ningún cambio en sus hábitos nutricionales, de lo que se deduce que el incremento de lípidos en la gestación temprana no sólo se debe a la ingesta dietética, sino también a la movilización de los depósitos corporales de la madre para garantizar los requerimientos durante el desarrollo del feto (Otto *et al.*, 2001). Por otro lado, el contenido de DHA en mujeres multigrávidas es menor que en primigrávidas y, además, los niveles de estos ácidos grasos en los fosfolípidos de la arteria umbilical son también menores en neo-

natos procedentes de partos múltiples, lo que sugiere un agotamiento de los depósitos maternos de DHA durante la gestación (Hornstra, 2000).

Es interesante conocer cómo se afectan los niveles de ácidos grasos en las madres y en los lactantes tras la suplementación dietética durante la gestación. Los niveles de AGPI de cadena larga en la mujer gestante están directamente influenciados por su ingesta y, por lo tanto, la intervención nutricional, con dosis adecuadas, durante este periodo puede influenciar el estatus neonatal de ácidos grasos del niño (Malcolm *et al.*, 2003). De ahí que la alimentación de las madres durante la gestación y la lactancia, así como las fórmulas lácteas artificiales, deben contener cantidades adecuadas de DHA y AA (Dutta-Roy, 2000).

Por otro lado, la suplementación con LNA y LA como precursores de AGPI de cadena larga no provoca un incremento de los niveles plasmáticos de DHA ni AA, lo que indica la importancia del aporte de estos ácidos grasos directamente a través de la dieta materna (De Groot *et al.*, 2004).

Incorporación y metabolismo de los ácidos grasos esenciales en tejidos neurológicos

En los humanos, la explosión en el crecimiento del **cerebro** sucede desde aproximadamente el tercer trimestre de gestación hasta los 18 meses tras el nacimiento, alcanzando su pico en el momento del nacimiento; la neurogénesis tiene lugar entre las 14 y 25 semanas de gestación (Clandinin *et al.*, 1999). Durante el crecimiento cerebral, el contenido en DHA aumenta de manera notable, a una velocidad media estimada de 35 mg por semana desde el último trimestre de gestación hasta el final del primer año de vida (Cunnane *et al.*, 2000). La acumulación selectiva de DHA en el cerebro tiene lugar mediante la combinación de diversos procesos. Es razonable pensar que, debido a las altas demandas de DHA en el sistema nervioso central, debe existir algún mecanismo altamente específico por el cual este ácido graso sea transportado a través de la barrera hematoencefálica.

Una vez dentro, parece ser que el metabolismo de los AGPI está regulado en una misma dirección para satisfacer la alta demanda de DHA durante la sinaptogénesis. Hasta llegar a las neuronas, el DHA ha de ser transportado a través del fluido intersticial y el citosol de las células endoteliales y astrocitos, probablemente gracias a la unión específica del DHA a proteínas transportadoras de gran afinidad (Xu *et al.*, 1996).

Por otro lado, el DHA también presenta una concentración específica en el interior de la **retina** y su captación comienza aproximadamente al inicio del último trimestre del

embarazo (Menard *et al.*, 1998). Una vez que se ha completado el desarrollo retiniano, la retina mantiene de manera eficaz los niveles alcanzados de este ácido graso (Rodríguez de Turco *et al.*, 1999).

Efecto de los AGPI de cadena larga sobre el desarrollo neurológico fetal y neonatal

La función y la integridad neural pueden resultar alteradas de manera permanente por déficits de DHA y AA durante el desarrollo fetal y neonatal debido a sus requerimientos para el crecimiento del cerebro y para el desarrollo funcional de los niños. La lactancia materna proporciona al niño cantidades adecuadas de estos ácidos grasos, aunque los niveles de DHA en la leche materna varían considerablemente dependiendo de la dieta de la madre. Por tanto, es aconsejable una ingesta adecuada de DHA tanto durante la gestación como tras el parto.

El DHA incrementa el crecimiento de las neuritas inducido por el factor de crecimiento nervioso, que es suprimido por el AA. Parte de esta acción exclusiva del DHA en el sistema nervioso parece deberse a la estimulación de la síntesis de fosfolípidos necesarios para la elongación de las membranas de las neuritas; sin embargo, los niveles de AA y DHA no afectan la diferenciación de estas células (Ikemoto *et al.*, 1997). La restricción dietética de ácidos grasos n-3 durante la gestación y la lactancia disminuye la proporción de DHA sólo en los conos, mientras que los cuerpos neuronales permanecen inalterados. Esto indica que, en situaciones de baja disponibilidad, el cuerpo neuronal tiene preferencia frente a los conos a la hora de captar este ácido graso (Auestad e Innis, 2000).

Se han propuesto distintos mecanismos neuroprotectores para el DHA, aunque todavía no están del todo claros. El DHA incrementa la resistencia de las crías frente a la degeneración inducida por el N-metil-D,L-aspartato en las neuronas colinérgicas. Parece ser que el DHA podría interferir en la sensibilidad de los receptores frente a este tóxico, en los fenómenos apoptóticos, podría favorecer el crecimiento de las neuritas y, por otro lado, protegerlas frente a los radicales libres, disminuyendo la peroxidación lipídica en el cerebro fetal (Högyes *et al.*, 2003).

Por el contrario, algunos estudios han observado que altos niveles de DHA en la dieta afectan de manera negativa el desarrollo del sistema auditivo de las ratas, posiblemente debido a un efecto negativo sobre el proceso de mielinogénesis de este sistema (Haubner *et al.*, 2002). Todo esto plantea la necesidad de estudiar las cantidades seguras y eficaces de AGPI de cadena larga para su utilización durante los periodos de gestación y lactancia.

El desarrollo mental en humanos tiene lugar principalmente en el último trimestre de gestación y en los primeros 12 meses de vida, y de manera lenta hasta los 30 años de edad. Numerosos estudios han indicado que el desarrollo mental y la agudeza visual de los niños están positivamente correlacionados con la lactancia materna. Estos niños presentan altos niveles de DHA en el tejido cerebral y una habilidad mental potenciada en estadios posteriores de la vida, comparados con aquellos niños alimentados con fórmulas artificiales que no contenían DHA (Gil *et al.*, 2003).

Para el estudio del desarrollo mental o cognitivo se han empleado diferentes formas de evaluación que han determinado que el aprendizaje y las habilidades de comportamiento están relacionadas con el estatus cerebral de DHA, y por lo tanto con su aporte a través de la dieta, ya sea en la etapa *in utero* como posteriormente durante la alimentación postnatal. La lactancia materna o mediante fórmulas enriquecidas proporciona una ingesta adecuada de ácidos grasos y puede mejorar el desarrollo mental en los estados tempranos (Gil *et al.*, 2003). Sin embargo, Ghys *et al.* (2002) encontraron unos resultados algo diferentes en niños con cuatro años de edad. Estos autores llegaron a la conclusión de que en un primer momento los AGPI de cadena larga son especialmente importantes para el desarrollo cognitivo del niño, pero que en edades más avanzadas pierden importancia a favor de otros factores del entorno social del niño, como son el peso al nacer, la duración de la lactancia, los hábitos de consumo de tabaco de la madre durante el embarazo, el coeficiente intelectual de la madre y la educación recibida. Cabe destacar que el equilibrio entre los AGPI de cadena larga n-3 y n-6 también es necesario para el correcto desarrollo del lenguaje.

Las proporciones de AA y DHA en el plasma son más bajas en niños que presentaban un trastorno de déficit de atención e hiperactividad, en los que, curiosamente, predomina un mayor número de síntomas característicos de la deficiencia de ácidos grasos esenciales. Las causas de estas alteraciones podrían estar relacionadas con múltiples factores fisiológicos o ambientales, como, por ejemplo, una síntesis deficitaria de AGPI de cadena larga a partir de sus precursores esenciales o una alteración de su metabolismo, ya que la exposición al DHA preformado facilita la maduración del cerebro y podría estimular la biosíntesis de algunas enzimas (Chen *et al.*, 2004).

Es posible que los cambios cognitivos que se inducen con las dietas deficitarias en n-3 se deban a cambios en los neurotransmisores o en las uniones sinápticas. La acumulación de DHA en el cerebro puede tener algún efecto sobre las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de neurotransmisores (Takeuchi *et al.*, 2002), mientras que los sistemas dopaminérgicos, específicamente implicados en la regulación de los procesos de comportamiento tales como la actividad motora, emocional y la orientación espacial, están alterados cuando existe un déficit de ácidos grasos n-3 (Wainwright,

2002). Por tanto, una vez más, la biosíntesis de neurotransmisores en el cerebro neonatal se afecta de manera directa por la nutrición materna, tanto por vía placentaria en el periodo prenatal como a través de la lactancia en la etapa postnatal.

Efecto de los AGPI de cadena larga sobre la función visual

La disparidad en la maduración neuronal entre niños alimentados con leche materna o con fórmulas artificiales ha sido estudiada en niños normales sanos nacidos a término. Los estudios muestran la eficacia de la suplementación con AGPI de cadena larga n-3 durante el desarrollo del sistema visual, sus niveles en los eritrocitos se correlacionan de manera positiva con la agudeza visual mostrada en algunos trabajos de investigación. En lo que respecta a la agudeza visual medida como potenciales evocados, el DHA parece ser un nutriente esencial para la maduración neural óptima de los niños, ya que su suplementación lleva a una mejora en los potenciales evocados de estos niños (Larqué *et al.*, 2002). Por otro lado, la suplementación con DHA mejora la capacidad y la agudeza visual en niños pretérmino en comparación con los no suplementados, llegando a alcanzar niveles similares a los niños alimentados con leche materna. Sin embargo, ningún estudio demuestra que los AGPI de cadena larga n-3 afecten la memoria de reconocimiento, aunque su déficit sí tiene efectos sobre la atención, que podrían ser interpretados como un enlentecimiento en el proceso de información, una alta reactividad o la dificultad para desatender a un estímulo adecuadamente (Gil-Campos y Gil, 2004).

En este caso, la suplementación con LNA sí mejora el desarrollo de la agudeza visual en niños pretérmino en relación con aquellos que reciben bajas cantidades, aunque la mejoría resulta mucho más rápida cuando la dieta se suplementa directamente con DHA, alcanzándose un desarrollo similar al de los que reciben lactancia materna (Decsi y Koletzko, 2005). No se han encontrado relaciones directas con los niveles de LNA, pero parece que sí hay una correlación significativa entre las concentraciones altas de AA y una peor agudeza visual (Gil-Campos y Gil, 2004). Sin embargo, no está claro qué diferencias en la agudeza y otras habilidades visuales puedan persistir a lo largo del tiempo, cómo una experiencia visual temprana puede ser crítica para posteriores funciones o si su restricción puede provocar consecuencias negativas en el futuro. Tampoco se conoce qué proporción de pérdida puede ser inducida por un estado nutricional subóptimo de ácidos grasos n-3 (Neuringer, 2000). Lo que sí parece claro es que el contenido en DHA es importante para alcanzar la máxima actividad fotoquímica de la rodopsina, que aumenta la susceptibilidad a la luz y al inicio de la señal nerviosa; además, su disponibilidad parece que puede influir en el desarrollo de los conos de la fovea, que normalmente presentan una maduración más tardía (SanGiovanni y Chew, 2005).

Efecto de los AGPI de cadena larga sobre el desarrollo del sistema inmune

Las membranas de los linfocitos también están expuestas a la modificación de su perfil lipídico según el aporte de la dieta. Tanto los AGPI n-6 como los n-3 están involucrados en la regulación de la respuesta inflamatoria, mediante la modulación de la producción de mediadores inmunológicos. Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la proliferación de los linfocitos se ve reducida en respuesta a niveles relativamente altos de AGPI n-3 (Calder *et al.*, 2002). Además, la suplementación con extracto de pescado afecta a la expresión de antígenos en la superficie de estas células (Lombardi *et al.*, 2001)

Por otro lado, muchos de los cambios que ejercen los AGPI n-3 en el sistema inmune están mediados por cambios en la producción de eicosanoides, ya que las citocinas formadas son menos activas que las sintetizadas a partir de n-6. Además, existen diferentes estudios que muestran cómo los AGPI n-3 de cadena larga pueden inhibir directamente la síntesis de citocinas pro-inflamatorias tales como interleukina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), de forma independiente a la regulación por eicosanoides (Yaqoob *et al.*, 2003)

Los datos experimentales y epidemiológicos apuntan hacia un nexo de unión entre los cambios dietéticos y las enfermedades alérgicas y, dado que las respuestas inmunes alérgicas comienzan inmediatamente después del nacimiento, se especula que la suplementación con n-3 durante la gestación puede ser una intervención no invasiva (Prescott y Calder, 2004). La suplementación con estos ácidos grasos, además de aumentar sus niveles en las membranas celulares e inhibir la síntesis de eicosanoides inflamatorios derivados de los AGPI n-6 que promueven la inflamación alérgica y la respuesta con IgE (Wong, 2005), estimula una respuesta atenuada frente a alérgenos (Dunstan *et al.*, 2003). Estos estudios confirman que la suplementación materna con AGPI n-3 modifica el balance entre n-3 y n-6 en el feto y modula la función inmune neonatal.

La leche humana contiene componentes con potencial inmunomodulador, tales como citocinas, factores de crecimiento y leucocitos, cuya función precisa no se conoce con exactitud. Es posible que confieran ayuda inmunológica a los recién nacidos en un momento de su vida en el que su sistema inmune no está totalmente desarrollado. La suplementación con AA y DHA en las fórmulas lácteas artificiales asemejó el perfil de las poblaciones de linfocitos a la de los niños prematuros alimentados con la leche materna, lo que indica que pueden ser útiles para influenciar la inmunocompetencia equivalente (Field *et al.*, 2000). Sin embargo, la ingesta elevada de ácidos grasos pro-

cedentes del pescado no modifica la concentración de citokinas en la leche humana, aunque sí incrementa los niveles de DHA en los fosfolípidos plasmáticos de la madre (Hawkes *et al.*, 2002).

Periodo adulto

Ingesta y requerimientos de AGMI y AGPI

Los consumidores se ven con frecuencia atraídos por los alimentos cuyas texturas y sabores derivan de las grasas. Aunque existen diferencias según las regiones, la temporada y los hábitos alimentarios, normalmente los consumidores aumentan la proporción de grasas de su alimentación a medida que aumentan sus ingresos. El aumento de la cantidad y el cambio de la calidad de las grasas y aceites presentan importantes consecuencias en la nutrición. El consumo de grasa depende en gran medida de los ingresos percibidos; en los países en desarrollo el consumo de estos nutrientes es más bajo en comparación con los países desarrollados, y dentro de estos últimos existen varias diferencias entre las áreas rurales y urbanas. En los países desarrollados las grasas visibles proporcionan más de 70 gramos por persona y por día y las políticas destinadas a mejorar la calidad de las grasas y aceites pueden ser eficaces con la colaboración de las industrias alimentarias. Por otro lado, existe una nueva tendencia a disminuir el consumo de las grasas visibles de origen animal ricas en AGS y a aumentar la ingesta de AGMI y AGPI, para mejorar los modelos de consumo actuales.

Una ingesta elevada de LA junto con una proporción n-6/n-3 también elevada provoca la disminución de la síntesis de AGPI n-3, debido a la competencia enzimática durante el proceso. Este exceso de ácidos grasos n-6 estimula la formación de AA, precursor de PG y otros eicosanoides implicados en los procesos inflamatorios, lo que aumenta el riesgo de sufrir artritis y otras enfermedades crónicas inflamatorias (Horrocks y Yeo, 1999), así como distintos tipos de cáncer frecuentes en las sociedades occidentales, enfermedades trombóticas, apoplejía e hiperreactividad alérgica (Okuyama, 1997); no obstante, el AA es necesario para el organismo.

Se estima que la cantidad total de estos AGPI n-3 en las sociedades occidentales es alrededor de los 600 mg/d, contando con el aporte dietético y la producción endógena (Lauritzen *et al.*, 2001). Concretamente en España, un estudio realizado en 1989 describió la composición de la dieta como rica en vegetales (393 g/día), frutas (283 g/día), leche y derivados (383 g/día) y pescado (72 g/día) (Moreiras-Varela, 1989). La grasa ingerida: 36 g de AGS, 61 g de AGMI y 21 g de AGPI, contribuía a un consumo

total de energía del 11, 19 y 7%, respectivamente. Sin embargo, otro estudio del año 2003, llevado a cabo en la provincia de León, estableció que la ingesta total de AGS, AGMI y AGPI, respectivamente, era del 13,3, 15,51 y 6,22% en hombres, y del 12,20, 15,58 y 7,10% en mujeres, lo que representaba el 39,21 y 38,96% del total de la energía en hombres y mujeres, respectivamente (Capita y Alonso-Calleja, 2003). Dicha composición de la grasa ingerida se encuentra muy próxima a los objetivos nutricionales propuestos para la población española (Navia-Lombán y Ortega-Anta, 2000). Por otro lado, la ingesta de ácidos grasos de la serie n-3 se encontraba en 2,46 g/día para los hombres y 1,68 g/día para las mujeres, siendo el índice n-6/n-3 de 7,14 y 8,33, respectivamente. El pescado azul y, en menor medida, el blanco son las principales fuentes de AGPI n-3. Finalmente, el aceite de oliva representa el 78% del consumo de los aceites vegetales en mujeres y el 67% en varones, y aporta entre el 31-43% de AGMI a las mujeres y entre el 32-38% a los hombres.

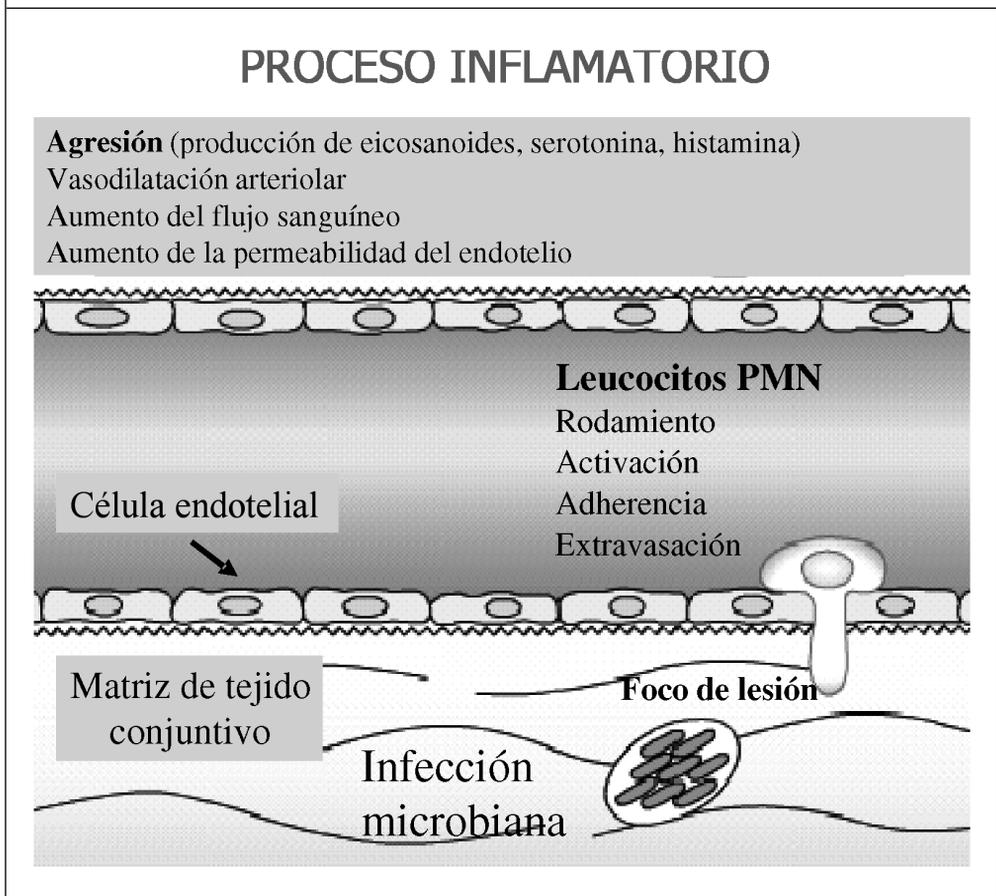
En general, las recomendaciones nutricionales acerca de las ingestas de grasa a través de la dieta dadas por los organismos internacionales son las siguientes: la grasa total debe corresponder a 15-30% de las calorías totales ingeridas, de las cuales menos del 10% deben ser AGS, AGPI entre el 5-10% y el resto debe corresponder a AGMI (WHO/FAO, 2002). Estas recomendaciones incluyen un consumo diario en adultos de 12 g de LA y 1,1 g de LNA (IOM, 2002). Recientemente, la FDA ha propuesto que “existen evidencias científicas, limitadas y no concluyentes de que ingerir 23 g de aceite de oliva diariamente puede reducir el riesgo de padecer enfermedades coronarias debido a las grasas monoinsaturadas presentes en este aceite”, por lo que el uso de estos aceites debe ser impulsado siempre sustituyendo a otros tipos de grasas, y siempre que no suponga un mayor consumo calórico (FDA, 2004).

V.6. Efectos de los lípidos de la dieta en situaciones patológicas

Procesos inflamatorios

La inflamación es un proceso muy complejo, iniciado por microorganismos, toxinas, alérgenos, etc., que penetran en el organismo ocasionando muerte celular y necrosis de los tejidos adyacentes, con el fin de eliminarlos y posteriormente reconstruirlos. El agente causante inicia una respuesta inmunológica, mediante la activación de las células del sistema inmune, que se acumulan en el tejido afectado para eliminar al patógeno. Por otro lado, se desencadenan mecanismos de reparación tisular que aminoran las consecuencias titulares que se hubieran ocasionado (figura 4).

Figura 4 Acontecimientos moleculares durante el inicio de la inflamación



La primera reacción del organismo ante la presencia de un agente extraño es la acumulación de leucocitos en el lugar de la lesión, principalmente neutrófilos, que liberan radicales libres y enzimas lisosómicas para eliminar el patógeno y evitar su diseminación. Esta primera reacción local se denomina **inflamación aguda**, y es una respuesta inespecífica y relativamente breve (entre minutos y pocos días), similar para cualquier agente lesivo y orientada a su destrucción.

Si no se elimina totalmente la causa de la lesión, la inflamación aguda desemboca en una respuesta tisular sostenida que se denomina **inflamación crónica**. En ésta se pueden observar signos de inflamación activa, de destrucción tisular y de curación. Los macrófagos que acuden al tejido fagocitan al agente lesivo y presentan antígenos propios de éste en su superficie, activando así la producción de anticuerpos específicos frente a ese patógeno.

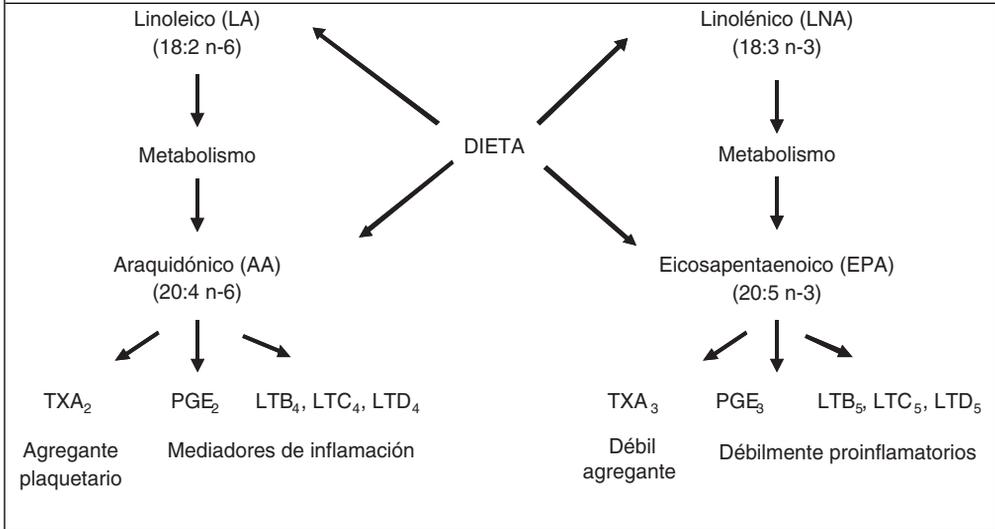
La respuesta inflamatoria es fundamentalmente una respuesta de carácter protector. Sin embargo, el problema aparece cuando estos procesos se cronifican, convirtiéndose en perjudiciales, y constituyendo el mecanismo patogénico de reacciones de hipersensibilidad secundarias al efecto de fármacos, sustancias tóxicas y picaduras de insectos, y también de algunas de las enfermedades crónicas más frecuentes en la actualidad, como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la fibrosis pulmonar y la cirrosis hepática, entre otras (Gil, 2004a). El objetivo de los fármacos antiinflamatorios es el de controlar los efectos adversos de la inflamación, potenciando al mismo tiempo sus efectos saludables.

En las últimas décadas se ha observado que la modificación del perfil lipídico de la dieta puede modular de forma beneficiosa los procesos inflamatorios y así disminuir la necesidad del uso de unos fármacos antiinflamatorios que provocan grandes efectos adversos. Se ha observado que una elevada ingesta de aceite de pescado y de aceite de oliva favorece una respuesta adecuada ante un determinado patógeno y aminora los efectos perjudiciales ocasionados por la cronificación de estos procesos (De la Puerta Vázquez *et al.*, 2004).

El consumo de ácidos grasos de la serie n-6 en las poblaciones occidentales es del orden de 20 a 25 veces mayor que el consumo de los de la serie n-3, debido a la abundancia de LA en los aceites más consumidos y a la escasa presencia de LNA en la dieta. Por otra parte, la ingesta de AA y EPA, presentes en la carne y en el pescado, respectivamente, suele ser muy baja en comparación con la ingesta de LA. Tan sólo en las poblaciones mediterráneas, el consumo de ácido oleico, procedente del aceite de oliva, y el de ácidos grasos de la serie n-3, debido a la ingesta relativamente elevada de pescado, es superior al del resto de los países occidentales (Serra Majen, 2004).

El LA y el LNA son metabolizados hasta AA y EPA en el intestino, hígado y cerebro del ser humano, pero, dada la abundancia relativa en la dieta de LA, el compuesto mayoritario que se incorpora a los fosfolípidos de las membranas celulares es el AA. El EPA puede inhibir el metabolismo del AA de forma competitiva y suprimir o limitar la producción de los eicosanoides más proinflamatorios (Miles *et al.*, 2004). Como ya hemos comentado, los eicosanoides sintetizados a partir del EPA tienen menos actividad proinflamatoria que los sintetizados a partir del AA. Además, la enzima COX es poco eficiente cuando utiliza el EPA como sustrato. Así, si se aumenta la ingesta de ácidos grasos n-3, se puede desviar el equilibrio de los eicosanoides hacia la formación de compuestos con menor actividad inflamatoria (Yaqoob, 2003). Por otra parte, el uso de dietas ricas en ácido oleico puede inhibir la formación del proinflamatorio LTB₄, ya que pequeñas cantidades de su derivado eicosatrienoico, de la serie n-9, inhiben la LTA₄-hidrolasa (Jakschik *et al.*, 1983), enzima capaz de convertir el LTA₄ en LTB₄ (figura 5).

Figura 5 Eicosanoides formados a partir de los ácidos grasos poliinsaturados de las series n-6 y n-3



Se ha descrito una relación inversa y exponencial entre el contenido de EPA en las membranas de las células mononucleares y su capacidad para la formación de algunas citocinas proinflamatorias: IL-1 β y TNF- α ; la síntesis de estas citocinas alcanza un mínimo cuando la cantidad de EPA en las membranas supone un 1% del total de los ácidos grasos (Caughey *et al.*, 1996). Se desconocen los mecanismos responsables de estas acciones, pero parece ser que la inhibición de la síntesis de TNF- α inducida por el EPA se realiza a través de la modulación del factor nuclear NF κ B (Zhao *et al.*, 2004).

Sin embargo, las investigaciones acerca del efecto de los ácidos grasos de la serie n-3 sobre el sistema inmune todavía son contradictorias, debido a la dificultad a la hora de diseñar estudios adecuados (Yaqoob, 2003). El efecto puede variar dependiendo de las dosis utilizadas, de la duración de la suplementación, además del tipo de ácido graso que se utilice. Así, la suplementación con 4,9 g/d de DHA durante 4 semanas previene la activación de algunos marcadores de linfocitos T en humanos sanos, mientras que este efecto no se observa cuando los individuos fueron suplementados con EPA (Kew *et al.*, 2004). Por otro lado, dependiendo de la dosis, el aceite de pescado es capaz de inhibir la formación de IL-6 en las células mononucleares (Wallace *et al.*, 2003). Al igual que ocurre con las dietas ricas en n-3, la producción de PGE₂ y de LTB₄ por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares en modelos de experimentación animal y en sujetos humanos disminuye cuando son alimentados con dietas ricas en ácido oleico, al contrario de lo que ocurre cuando las dietas son ricas en LA.

Los principales estudios que han evaluado el efecto de los ácidos grasos sobre la **enfermedad inflamatoria intestinal** (EII) concluyen que tanto los AGMI, particularmente el ácido oleico, como los AGPI n-3 de cadena larga tienen propiedades antiinflamatorias debido a la modulación de la síntesis de mediadores químicos de la inflamación, especialmente eicosanoides y citocinas proinflamatorias, y que su administración por vía oral resulta útil para el control clínico de toda una serie de enfermedades inflamatorias de naturaleza autoinmune como la artritis reumatoide y la EII (Yaqoob, 2003; Gil, 2002, 2003, 2004a).

Los primeros estudios epidemiológicos que evidenciaron la importancia de la ingesta dietética en los ácidos grasos n-3 observaron una menor incidencia de EII en los esquimales. Posteriormente, diversos trabajos han apoyado el uso de estos ácidos grasos como coadyuvantes terapéuticos en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias, incluida ésta (Belluzzi, 2004). El efecto parece estar mediado por una menor producción de LTB_4 , que se encuentra elevado en la mucosa intestinal inflamada, y por la inhibición de la síntesis de algunas citocinas proinflamatorias (Simpoulos, 2002). Hay que destacar que los enfermos con EII presentan perfiles plasmáticos anormales de AGPI n-3, lo que también ocurre en los pacientes con **colitis ulcerosa** seis meses después de la colectomía, lo que indica una anomalía primaria en el metabolismo de los AGPI durante estas enfermedades (Esteve *et al.*, 1998). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que tanto la administración de aceite de oliva virgen como de dicho aceite conjuntamente con un suplemento de pescado reduce las alteraciones histológicas macro y microscópicas en un modelo experimental de colitis ulcerosa inducido por inyección intrarrectal de trinitrobenzensulfónico. Además, el número de células caliciformes aumenta significativamente cuando en la dieta se incluyen los ácidos grasos n-3, respecto a los animales que ingieren una dieta rica en AGPI n-6 (Nieto *et al.*, 2002; Gil, 2002). Asimismo, se ha recomendado la administración por vía oral de EPA purificado en el tratamiento de la colitis ulcerosa en la infancia (Gil, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que el LA induce la producción de IL-8 en las células del músculo liso intestinales de pacientes con **enfermedad de Crohn** (Alzoghaibi *et al.*, 2004), mientras que la suplementación con aceite de pescado modifica la composición de las células periféricas de la sangre y provoca una disminución de su síntesis de PGE_2 e $IFN-\gamma$ (Trebble *et al.*, 2004). Además, los infartos gastrointestinales multifocales, que constituyen uno de los primeros pasos en el desarrollo de la enfermedad de Crohn, sugieren que las plaquetas y el TXA_2 pueden desempeñar un papel fundamental en dicha enfermedad (Carty *et al.*, 2001). Por todo esto, el tratamiento con aceites de pescado podría ser recomendable para disminuir la respuesta plaquetaria en estos pacientes.

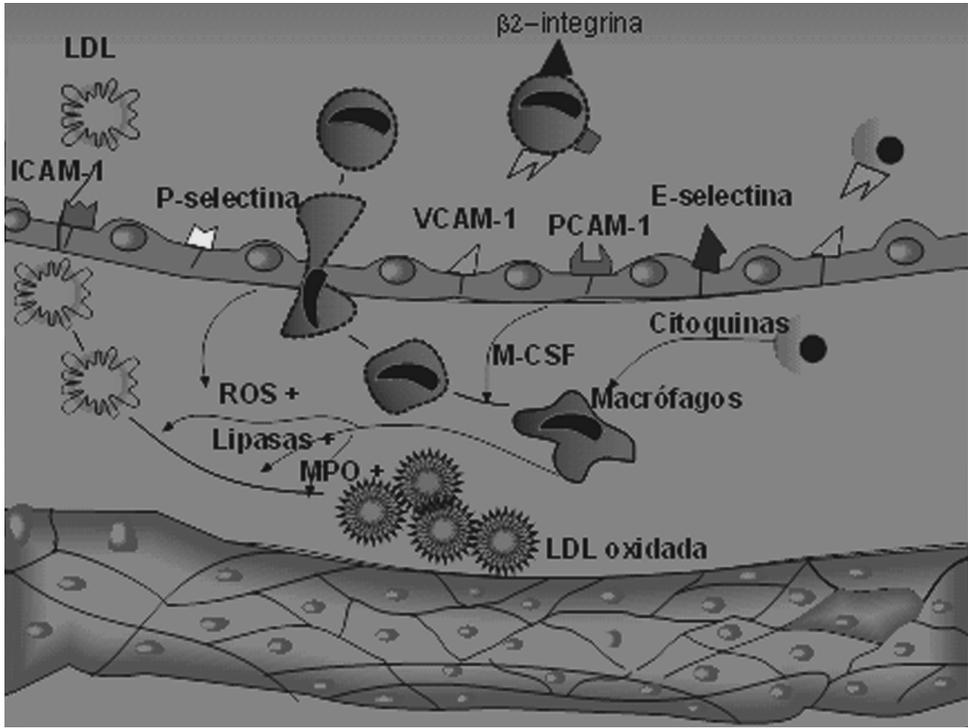
Otra enfermedad de origen inflamatorio ampliamente extendida es la **artritis reumatoide**. Existen evidencias de una menor prevalencia de esta enfermedad en los países mediterráneos, aunque se desconocen las razones exactas de este hecho (Pattison *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la inclusión en la dieta de cantidades elevadas de ácidos grasos n-3 procedentes del aceite de pescado puede disminuir algunos parámetros indicativos de esta enfermedad, y permitiría reducir el uso de los fármacos antiinflamatorios no esteroídicos (Oh, 2005). La ingesta de una dieta rica en aceite de pescado en pacientes con artritis reumatoide disminuye la producción de IL-1 por los monocitos en un 38% (Kremer, 2000).

Por otra parte, la producción de IL-2 y de su receptor en los linfocitos disminuye cuando son alimentados con dietas enriquecidas en aceite de oliva, tanto en modelos experimentales como en sujetos humanos sanos (Kremer *et al.*, 1990). Asimismo, la producción de IL-6 por fibroblastos humanos cultivados es menor en presencia de ácido oleico, y el consumo de aceite de oliva virgen durante un periodo de 2 meses da lugar a un aumento en la formación de la molécula de adhesión MCA-1 por los leucocitos, lo cual sugiere las implicaciones relevantes que tiene el consumo de ácido oleico en la prevención de la aterosclerosis y de otras enfermedades inflamatorias (Darlington y Stone, 2001). Finalmente, cabe destacar que el efecto beneficioso del aceite de pescado sobre esta enfermedad se incrementa al combinarlo con aceite de oliva, lo que constituye una nueva terapia para su tratamiento (Berbert *et al.*, 2005).

Enfermedades cardiovasculares

Dentro de las enfermedades del sistema cardiovascular (ECV), las más importantes son la aterosclerosis y la hipertensión, dos enfermedades que a su vez están relacionadas entre sí. El proceso aterosclerótico ocurre principalmente en tres etapas, siendo difícil determinar dónde acaba una y empieza otra. El inicio del proceso o primera etapa es la **disfunción del endotelio vascular**, que consiste en un aumento de la permeabilidad y una migración y adhesión de leucocitos; esto permite la entrada de las lipoproteínas y otros componentes plasmáticos en la pared arterial. La siguiente etapa es de progresión de la placa, en donde hay una deposición de lípidos, formación de células espumosas y procesos oxidativos, que llevan a la formación de una **estría grasa**. La formación de una **capa fibrosa** se puede considerar como la tercera etapa; en ésta tiene lugar una proliferación de las células del músculo liso hacia la íntima, con secreción de sus productos metabólicos y respuesta inflamatoria. La progresión de la placa origina la aparición de lesiones avanzadas como calcificación, necrosis y trombosis. Cada una de las etapas anteriores está regulada por la actuación de moléculas vasoactivas, factores de crecimiento y citokinas, mediadores de la respuesta inmune (Lusis, 2000) (figura 6).

Figura 6 Principales mecanismos implicados en la iniciación de la placa de ateroma



El tipo de grasa de la dieta puede influir, directa o indirectamente, sobre algunos de estos mediadores de la respuesta inmune que participan en el desarrollo de la aterosclerosis (Yaqoob, 2003). Los ácidos grasos de la dieta afectan de manera importante a la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas, lo que también influye sobre la activación de moléculas de adhesión y otros factores inflamatorios. Por otro lado, se han publicado varios trabajos que demuestran un efecto directo de los ácidos grasos sobre la expresión génica de muchos de estos factores, aunque no hay que olvidar que la presencia de sustancias de carácter antioxidante en los aceites utilizados en algunos estudios puede enmascarar el verdadero efecto de los ácidos grasos por sí mismos (Jump, 2004; Sampath y Ntambi, 2004).

La calidad lipídica de la dieta puede afectar al metabolismo lipoproteico, alterando las concentraciones de estas partículas en sangre y permitiendo un mayor o menor reclutamiento de las mismas en la pared arterial. La sustitución de grasa saturada por otras

mono o poliinsaturadas en la dieta origina descensos significativos de los niveles de colesterol plasmático y LDLc, hecho ampliamente aceptado y que concuerda con los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en conejos con aterosclerosis experimental (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1998; Aguilera *et al.*, 2002). Sin embargo, existe una gran controversia en cuanto al efecto de los distintos ácidos grasos insaturados. Por un lado, la influencia de los AGMI de la dieta sobre los lípidos plasmáticos no está clara. En el pasado, estos ácidos grasos se consideraban neutros; sin embargo, investigaciones más actuales sugieren que los AGMI pueden tener un efecto favorable sobre las concentraciones lipídicas en sangre, así como sobre la ECV (Thompsen *et al.*, 1999), principalmente debido a un incremento de HDLc y a una caída en los niveles de colesterol total y LDLc (Grundy, 1997).

La oxidación de las lipoproteínas, en especial la LDL oxidada, puede ayudar al reclutamiento de los monocitos en la pared arterial, induciendo su activación y adhesión. Es conocido que la resistencia a la oxidación lipídica de las lipoproteínas puede ser modificada por el perfil de ácidos grasos en la dieta y por su contenido en antioxidantes. Se ha demostrado que el consumo de una dieta rica en aceite de oliva virgen o refinado en conejos con aterosclerosis experimental protege a las partículas de LDL frente a la oxidación (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1998). De igual manera, estudios realizados en pacientes hipercolesterolémicos que ingirieron una dieta rica en aceite de oliva han concluido que las LDL ricas en ácido oleico y pobres en AGPI son más resistentes frente a la oxidación (Baroni *et al.*, 1999).

Por otra parte, el efecto de los AGPI n-6 en la dieta sobre las lipoproteínas también ha sido y es motivo de discusión científica. Varios trabajos afirman que las dietas ricas en AGPI n-6 disminuyen las concentraciones de colesterol total, HDLc y LDLc (Bruin *et al.*, 1993). Concretamente, el descenso en la concentración de HDLc parece estar relacionado con una mayor degradación de la misma a nivel hepático que favorece el transporte inverso del colesterol (Terpstra *et al.*, 2000).

Finalmente, la acción principal de los AGPI n-3 en humanos es la reducción de la concentración de triglicéridos en plasma (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999a y b). Sin embargo, los datos de muchos estudios realizados hasta hoy carecen de consistencia, ya que existen muchas diferencias entre dosis y composición del aceite de pescado utilizado, entre la edad y el estado de salud de los sujetos del estudio y entre las concentraciones plasmáticas de lípidos y la duración del estudio.

Muchos estudios sugieren que la sustitución de la grasa saturada de la dieta por AGPI n-3 provoca una mayor susceptibilidad de la LDL frente a la oxidación. Estudios realizados en un modelo de aterosclerosis experimental en conejos demuestran que el en-

riquecimiento de estas lipoproteínas con AGPI n-3 provoca una mayor susceptibilidad a la oxidación en las mismas, en comparación a los AGPI n-6 y AGMI (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1998). Pero además, se ha observado que las modificaciones oxidativas de las LDL con alto porcentaje de AGPI n-3 en pacientes con patología vascular periférica pueden ser reducidas por el consumo simultáneo de aceite de oliva virgen extra, lo que se demuestra por una menor captación por los macrófagos y una menor movilidad electroforética de las LDL del grupo de pacientes que ingirieron diariamente 40 g de aceite de oliva virgen extra junto a un suplemento de 16 g de aceite de pescado durante 3 meses, en comparación con el grupo de pacientes sin tratamiento dietético (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999a y b).

Es importante destacar el papel que puede jugar la presencia de compuestos con carácter antioxidante en la fracción insaponificable de los aceites vegetales (Ochoa *et al.*, 1999). Se ha observado una menor susceptibilidad a la oxidación de la LDL de pacientes normolipémicos al comparar el consumo de aceite de oliva virgen extra frente al de aceite de girasol alto oleico. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado un trabajo realizado en pacientes con patología vascular periférica en el que se observa cómo el aceite de oliva virgen protege mejor a la LDL frente a la oxidación en comparación con el aceite de girasol, a pesar del alto contenido en vitamina E de este último aceite, atribuyendo como posible causa la presencia de otros compuestos de carácter antioxidante en el aceite de oliva virgen extra (Aguilera *et al.*, 2004). Estos resultados abren una nueva línea en la investigación de la aterosclerosis, destacando el papel protector que puede jugar la presencia de sustancias antioxidantes naturales, principalmente polifenoles y tocoferoles, presentes en la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen extra, sobre el desarrollo de las ECV.

Los niveles de las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) que permiten una adhesión firme de los monocitos a la superficie vascular se elevan en el endotelio vascular durante las primeras etapas de la aterosclerosis. En los últimos años, algunos grupos de investigación han estudiado el posible efecto de los ácidos grasos sobre los niveles de moléculas de adhesión y su influencia en el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha publicado que el DHA disminuye significativamente la expresión de VCAM-1, la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) y E-selectina en cultivos de células endoteliales humanas (De Caterina *et al.*, 1996). En este trabajo el EPA no mostró ningún efecto, hecho discutido en la literatura ya que se ha demostrado un efecto de ambos AGPI procedentes del pescado en las células endoteliales de cordón umbilical humano, concretamente sobre la expresión de los mRNAs de dichas moléculas de adhesión (Chen *et al.*, 2003).

Se han propuesto tres posibles mecanismos para explicar el efecto de los AGPI n-3 sobre la expresión de las moléculas de adhesión. El primero es a través de la alteración

de los eicosanoides derivados del AA, activadores de las citocinas que estimulan la adhesión celular. El enriquecimiento de AGPI n-3 en las membranas celulares conlleva una inhibición de la síntesis de promotores del proceso inflamatorio como son la PGE₂ y LTB₄ (Nieto *et al.*, 1998).

En segundo lugar, los AGPI n-3 de la dieta y sus metabolitos pueden influir directamente sobre la expresión génica de muchos factores mediadores de la respuesta inmune, regulando la activación de los factores de transcripción mediante fosforilación, modificación proteolítica o unión covalente, y alterando así su expresión génica. La expresión génica de las citocinas y de las moléculas de adhesión está regulada por el NFκB, de manera que la fosforilación del mismo por la proteína-quinasa C y la consecuente disociación de su inhibidor, el IκB, dan lugar a la activación de citocinas como la IL-2 e IL-6, y de moléculas de adhesión como la ICAM-1 (Yaqoob, 1998).

Por último, se ha demostrado que los AGPI n-3 pueden influir sobre la producción de óxido nítrico (NO), ya que disminuye la expresión del TNF-α a través del factor de transcripción NFκB, inhibiéndose por tanto la estimulación de VCAM-1 e ICAM-1 (Khan *et al.*, 1995). El NO presenta una acción redox por la que interacciona con los radicales libres y, dependiendo de su concentración, puede provocar una inducción o una inhibición de la peroxidación lipídica. Numerosos estudios han destacado el importante papel que juega el NO en el desarrollo de la aterosclerosis. El aceite de pescado en la dieta aumenta la producción de NO por los macrófagos. Se ha encontrado un incremento de metabolitos de NO en la orina de humanos sanos tras el consumo diario de 5 g de un concentrado de aceite de pescado durante 3 semanas. Por el contrario, otros trabajos aseguran un efecto neutro (Hubbard *et al.*, 1994) o inhibitorio de los AGPI n-3 sobre la producción de NO, debido al efecto inhibitorio del DHA sobre la transcripción de la enzima NO-sintasa y la acumulación de su mRNA (Khair *et al.*, 1996). A pesar de todo, parece estar más ampliamente aceptado el posible efecto estimulador del aceite de pescado sobre la producción de NO.

El inicio de la formación de la estría grasa consiste en la captación y acumulación de lípidos en monocitos y macrófagos que terminarán formando las células espumosas. Este proceso está acompañado por la migración de las células del músculo liso, la activación de las células T y la adherencia y agregación plaquetaria. La oxidación de la LDL provoca una alteración de la misma que permite el reconocimiento por los receptores *scavenger* de los macrófagos, llevando a la formación de las células espumosas (Lusis, 2000).

Además de las LDL oxidadas, los factores implicados en la formación y activación de las células espumosas son el factor de activación de colonias de monocitos (M-CSF),

la IL-1 y el TNF- α . A su vez, la activación de las células T está mediada por el TNF- α y la IL-2. Las células del músculo liso arteriales migran, se diferencian hacia células de tipo fibroblasto y se multiplican por el PDGF, FGF-2 y el factor de crecimiento de transformación blástica (TGF- β). Todos estos procesos, junto con la adherencia y agregación plaquetaria, activados por integrinas, selectina P, fibrina, TXA₂, factor tisular y los factores de adherencia y migración de los leucocitos, anteriormente señalados, conducen a la formación de estrías grasas (Lusis, 2000).

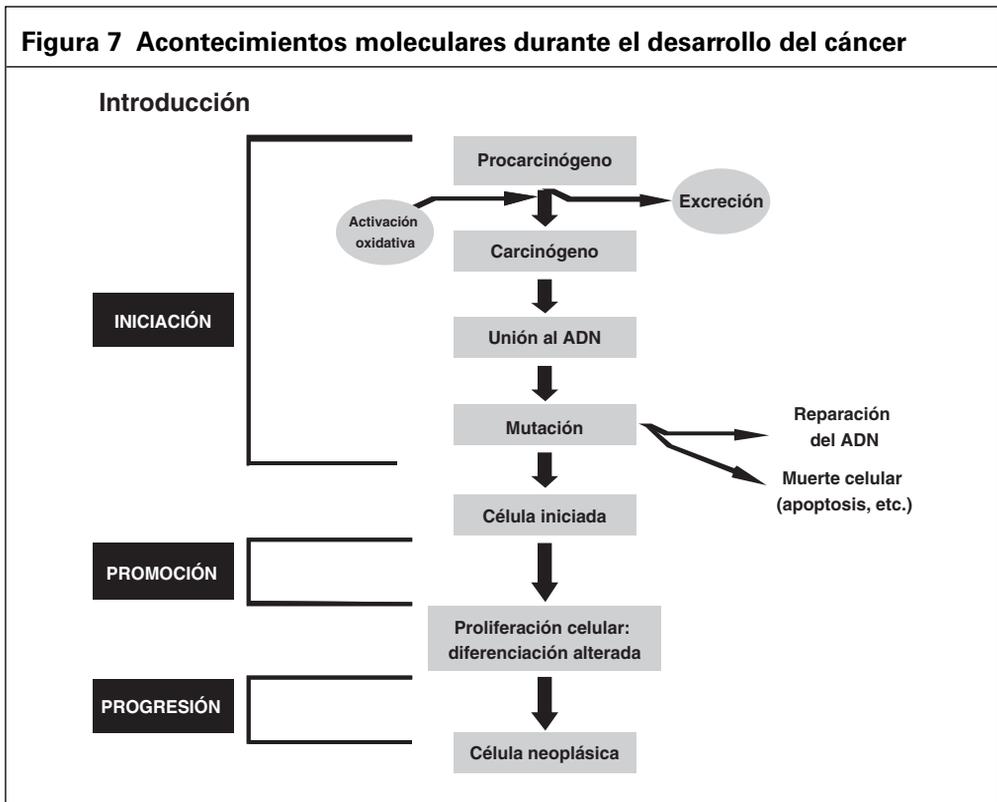
La formación de la capa fibrosa en las lesiones ateroscleróticas conlleva a la migración y proliferación de las células del músculo liso, lo que da lugar a un importante avance en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que supone un aumento del tamaño de la lesión y una disminución del grosor de la capa media. Un gran número de citocinas y de factores de crecimiento regulan estos procesos, principalmente IL-1 β , IL-6, TNF- α y factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF) (Lusis, 2000).

Los resultados encontrados en la literatura científica sobre la influencia de los lípidos de la dieta en la producción de citocinas y factores de crecimiento importantes en el desarrollo tanto de estrías grasas como de capa fibrosa son diferentes, sin llegar a conclusiones contundentes. Robinson *et al.* (1996) demostraron que los linfocitos de ratones alimentados con dietas ricas en aceite de pescado producían niveles inferiores de mRNA de IL-1 β que aquellos alimentados con sebo de ternera. Este efecto parece estar asociado a una inhibición de la transcripción génica de la citokina, aunque se desconoce el mecanismo molecular. Fernández *et al.* (1996) encontraron que la suplementación con aceite de pescado en conejos sometidos a un daño quirúrgico en la carótida previene la formación de la neointima al reducir la activación celular en la media y adventicia.

Los AGPI n-6 ejercen una acción proinflamatoria, especialmente el AA que parece jugar un importante papel en la expresión génica de factores reguladores de la funcionalidad vascular, como son las citocinas; la actividad de los factores de transcripción endoteliales parece estar regulada por el balance entre el estrés oxidativo celular y el estatus antioxidante. El LA se puede considerar como un ácido graso aterogénico, ya que activa la expresión génica de las citocinas mediadoras de la respuesta inmune en la pared vascular al incrementar el estrés oxidativo. La sustitución del aceite de soja por el de oliva en la base de emulsiones lipídicas para alimentación parenteral da lugar a una menor respuesta inflamatoria, según demuestra un estudio *in vitro* realizado con linfocitos humanos donde se ha observado una menor producción de TNF- α e IL-1 β en el grupo tratado con emulsiones de base oleica (Granato *et al.*, 2000).

Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que las células pierden el control sobre su metabolismo y comienzan a dividirse de manera incontrolada. Estas células pueden invadir los tejidos adyacentes o se pueden diseminar a través de la circulación sanguínea o linfática a otras partes del organismo. La figura 7 muestra un esquema simplificado de los acontecimientos moleculares que suceden durante la iniciación, promoción y progresión del proceso tumoral.



Al menos una tercera parte de los cánceres en humanos han sido relacionados con el estilo de vida, el ejercicio físico y la dieta. Concretamente, la ingesta de grasa se ha asociado principalmente con el desarrollo del cáncer de mama, colon y próstata (Bartsch *et al.*, 1999). La asociación de varios tumores con la obesidad, junto con la escasa incidencia de esta enfermedad en atletas delgados, apoyan la teoría de que los efectos de una alimentación rica en grasa pueda favorecer el desarrollo de cáncer y de que éste pudiera estar relacionado parcialmente con los cambios en el balance energético.

tico. Además, las dietas con un bajo contenido de grasas tienen, a su vez, una mayor variedad de fuentes de hidratos de carbono, fibra, frutas y hortalizas, aportando una protección adicional frente a esta enfermedad, por lo que la diferencia en cuanto a la morbilidad y mortalidad del cáncer en poblaciones que consumen alimentos con alto o bajo contenido de grasa podría estar asociada a otros componentes. Sin embargo, los estudios realizados con grasas alimentarias purificadas han implicado claramente a estos nutrientes esenciales en el desarrollo de esta enfermedad.

Las primeras observaciones que relacionaban las grasas de la dieta con algunos tipos de cáncer resaltaron que los animales alimentados con grandes cantidades de lípidos resultaban mucho más propensos a sufrir cáncer de piel y mama que los animales que ingirieron menos cantidad. Posteriormente, datos epidemiológicos demostraron que la incidencia de determinados tipos de cáncer en humanos era mucho mayor en los países cuya alimentación se caracterizaba por ser rica en grasas que en aquellos donde el consumo era menor (Carroll, 1975; Carroll y Khor, 1975). Sin embargo, los resultados han sido bastante contradictorios y hasta los ochenta no se comenzó a dar importancia a la relación entre la alimentación y el desarrollo de algunos tipos de cáncer (National Research Council, 1982, 1989; US Department of Health and Human Services, 1998).

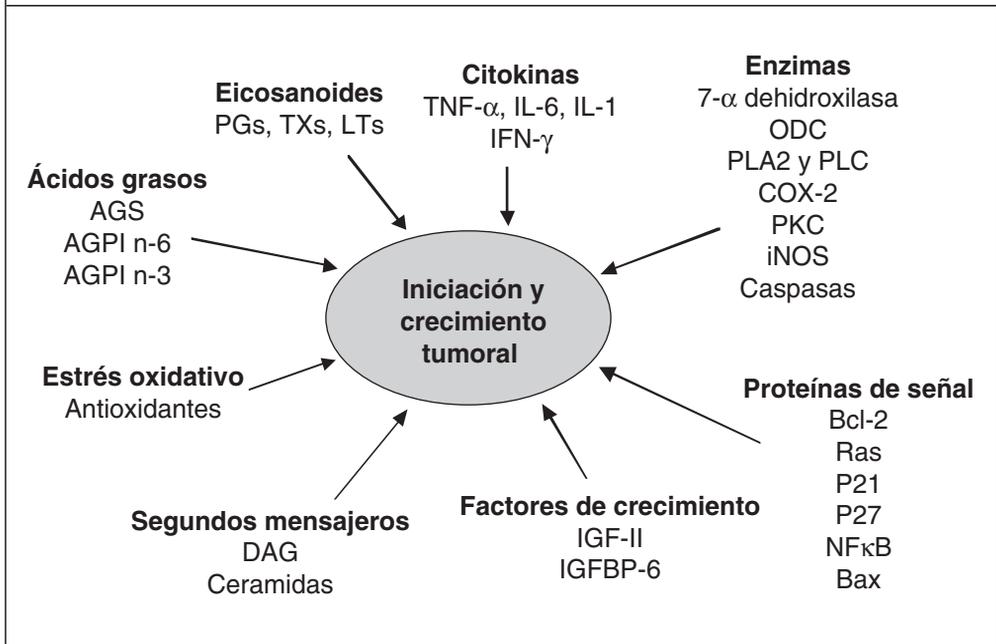
Se ha descrito una correlación positiva entre la grasa de la dieta y el cáncer de colon, mama, próstata y ovarios, aunque algunas investigaciones han sugerido que no es la cantidad, sino la calidad de la grasa, lo realmente importante en el desarrollo de esta enfermedad (Bartsch *et al.*, 2002). La contribución relativa de los ácidos grasos varía en función del país. Por ejemplo, en los países mediterráneos, con elevado consumo de aceite de oliva, la incidencia de cáncer de mama es menor que en los países del norte de América y Europa, a la vez que en los esquimales y en los japoneses, que ingieren grandes cantidades de pescado, también se observa un bajo índice de cáncer de mama y colon, a pesar de su elevado consumo de grasa (Assmann *et al.*, 1997).

A este respecto cabe comentar que la menor incidencia de cáncer en los países mediterráneos se ha asociado con la mayor ingesta de fibras, pescado, frutas y verduras, alimentos ricos en antioxidantes y sustancias protectoras. El aceite de oliva es la principal fuente de grasa y vehículo de múltiples sustancias potencialmente activas como anticancerígenos. Los compuestos absorbidos pueden ejercer su protección anticancerígena a distintos niveles, como en el cáncer de mama o en el de piel, mientras que los que no se absorben y llegan a las partes distales del intestino pueden impedir el cáncer colorrectal (Owen *et al.*, 2004). Además, investigaciones recientes han demostrado que el ácido oleico es capaz de inhibir la sobreexpresión del oncogén *Her-2/neu*, característico de los tumores mamarios, actuando de forma sinérgica con la inmunoterapia utilizada para activar la apoptosis de estas células cancerosas, lo que ofrece un mecanismo molecular no-

vedoso por el que los ácidos grasos pueden controlar el comportamiento maligno del cáncer de mama y contribuir a su tratamiento (Menéndez *et al.*, 2005)

Se han propuesto distintos mecanismos de acción por los que los AGPI podrían estar implicados en la supresión del crecimiento tumoral (Bartsch *et al.*, 1999). Concretamente, los AGPI n-6 incrementan el estrés oxidativo tanto en las membranas como en las moléculas de DNA, modifican las actividades proteín-kinasa y, como consecuencia, algunos factores de transcripción, e incrementan la síntesis de algunos eicosanoides y hormonas que promueven el crecimiento del tumor. Por el contrario, los AGPI n-3 disminuyen la síntesis de metabolitos producidos por la COX y LPO, a la vez que podrían normalizar los procesos apoptóticos en las células tumorales, inducir su diferenciación e inhibir la angiogénesis alrededor del tumor, impidiendo así su crecimiento; además, los AGPI n-3 disminuyen la síntesis de estrógenos y, por lo tanto, previenen el crecimiento del cáncer de mama (Hardman, 2004). Por otro lado, estudios preclínicos han indicado que, además, estos ácidos grasos pueden beneficiar a los pacientes que están siendo tratados con quimioterapia (Bougnoux, 1999). La figura 8 muestra un esquema de los numerosos factores moduladores del inicio y promoción del crecimiento tumoral.

Figura 8 Agentes moduladores del inicio y promoción del crecimiento tumoral



Se ha expresado cierta preocupación sobre la posibilidad de que los niveles bajos de colesterol en el suero puedan estar asociados con un aumento del riesgo de cáncer, concretamente de colon (McMichael, 1991). Sin embargo, en las poblaciones que consumen alimentos con un bajo contenido de grasas y que tienen bajos niveles de colesterol en el suero, el cáncer de colon no suele ser prevalente, por lo que resulta evidente que un nivel bajo de colesterol en el suero no incrementa por sí mismo el riesgo de sufrir esta enfermedad.

El cáncer de mama y el de colon son los más frecuentes en las poblaciones occidentales, y en ambos se observa una fuerte correlación positiva con el consumo de grasas. Concretamente, diversos estudios epidemiológicos han observado una relación más directa del consumo de grasa con el cáncer de colon que con el de mama (Willett, 1990), lo que era de esperar dado el mayor periodo de latencia de este último.

El **cáncer de mama** es el más frecuente en mujeres de países desarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud, la posibilidad de que una mujer desarrolle cáncer mamario en algún momento de su vida es de entre 8 y 11%. Entre los distintos factores que influyen en este proceso neoplásico destacan los nutricionales, y especialmente los lípidos de la dieta. Una dieta rica en lípidos puede duplicar el riesgo de sufrir esta enfermedad.

Aunque hay muchos resultados contradictorios, se ha llegado a la conclusión de que existe una relación directa, estadísticamente significativa, entre consumo de grasas saturadas y cáncer de mama después de la menopausia (Bartsch *et al.*, 1999). La obesidad se relaciona frecuentemente con el aumento del riesgo del cáncer mamario, sobre todo cuando la grasa está más localizada en la parte superior del cuerpo. Algunos autores han sugerido que el balance energético es más importante que el nivel de grasa, puesto que este efecto estimulante puede corregirse con una restricción calórica drástica. La restricción calórica inhibe la proliferación celular, crea ambientes proapoptóticos y reduce la densidad vascular de los tejidos adyacentes a los tumores. Sin embargo, no está claro si la reducción de peso mediante la práctica de ejercicio físico tiene efectos comparables a la hora de reducir el cáncer de mama (Thompson *et al.*, 2004).

Se ha especulado mucho sobre los mecanismos por los que las grasas podrían estimular el cáncer de mama, concretamente a través del sistema endocrino e inmunitario, de los cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana de las células cancerosas y del tejido adiposo, y a través de los efectos sobre la formación de eicosanoides y peróxidos lipídicos (Bartsch *et al.*, 1999). Los aceites ricos en AGPI n-6 promueven las mutaciones fundamentalmente sobre las células portadoras, mientras que el aceite de oliva inhibe esta mutación.

Ante todo, hay que aclarar que las grasas de la dieta no provocan el cáncer de mama, sino que cuando éste se desarrolla hay ciertos lípidos, como los n-3 presentes en el pescado azul y el oleico del aceite de oliva, que resultan beneficiosos porque ejercen un papel protector y retardan el proceso canceroso, mientras que otras grasas, como las de origen animal y algunas vegetales ricas en n-6, aceleran el curso clínico de la enfermedad.

Los AGPI n-6 alteran la actividad de un grupo de genes relacionados con la proliferación celular, aumentando la transducción de señales mitogénicas que aceleran la proliferación del tumor y le confieren características de mayor malignidad (Costa *et al.*, 2004). Sin embargo, una dieta hiperlipídica enriquecida en aceite de oliva muestra un efecto fundamentalmente protector, disminuyendo la cantidad y el crecimiento de los tumores, aunque sin llegar a eliminarlos (Solanas *et al.*, 2002). El oleico ejerce un efecto similar al de una dieta con bajo contenido en grasa, aunque sí eleva la actividad mitótica, efecto inespecífico que podría ser debido al aumento de la ingesta calórica asociada (Costa *et al.*, 2004).

Cáncer de colon. La incidencia del cáncer de colon se ha incrementado desde los años setenta en los países occidentales, y se ha estimado que más de una tercera parte de estos casos están ligados a factores dietéticos, entre los cuales la cantidad y la calidad de la grasa merecen una especial mención. Los estudios epidemiológicos han mostrado una menor incidencia de este tipo de cáncer en los esquimales y en los japoneses, los cuales se hacen más susceptibles al emigrar a los Estados Unidos y adoptar la dieta típica americana (Roynette *et al.*, 2004).

El cáncer de colon también parece estar influenciado por el LA, aunque en menor medida que el cáncer de mama. La estimulación del cáncer de colon mediante la ingesta de grasa podría deberse a un aumento de la secreción de los ácidos biliares, y podría estar mediado por la proteína-kinasa C y/o la ornitina descarboxilasa. Por otro lado, el hecho de que los aceites de pescado no estimulen el desarrollo de este tipo de cáncer puede relacionarse con sus efectos sobre la producción de eicosanoides, ya que se ha observado que los inhibidores de la prostaglandina inhiben la carcinogénesis de colon (Rao y Reddy, 1993).

Un trabajo reciente ha puesto de manifiesto que las dietas enriquecidas en AGMI reducen los fenómenos precarcinogénicos, reduciendo la incidencia de cáncer de colon en ratas. Estos autores también demostraron un efecto sinérgico aditivo tras la administración de un fármaco antitumoral junto con el aceite de oliva, sugiriendo una terapia combinada para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad (Schwartz *et al.*, 2004).

Cada vez son mayores las evidencias que declaran a los AGPI n-3 como nutrientes potencialmente anticancerígenos, y describen distintos mecanismos de acción posibles para su protección en el inicio y en la proliferación de los tumores de colon. Sin embargo, todavía hacen falta más estudios que determinen la importancia de la variabilidad genotípica y los efectos concretos de las distintas grasas alimentarias en estos diferentes genotipos (Roynette *et al.*, 2004).

Los estudios realizados con mezclas de ácidos grasos n-3 y n-6 indican que el efecto estimulante de los ácidos grasos n-6 se puede neutralizar mediante una relación elevada de ácidos grasos n-3 respecto a los n-6, tanto en el cáncer de colon como en el caso del cáncer mamario.

Existen pocos estudios de investigación acerca de la influencia de la grasa de la dieta sobre el cáncer de páncreas, próstata, piel, ovarios, vejiga, cavidad bucal, linfoma no-Hodgkin y leucemia. Los resultados han variado bastante con respecto al tipo de cáncer, pero los datos disponibles tanto epidemiológicos como experimentales son muy limitados.

Cáncer de próstata. La etiopatogénesis del cáncer de próstata ha sido asociada positivamente con las grasas alimentarias recientemente, aunque no todos los estudios epidemiológicos y experimentales están de acuerdo con esta hipótesis (Shirai *et al.*, 2002). Al igual que en los otros tipos de cáncer antes mencionados, parece ser que los AGPI n-6 promueven la carcinogénesis en la próstata (Rose, 1997), mientras que los niveles de AGPI n-3 son inversamente proporcionales al desarrollo de este tipo de cáncer (Kobayashi *et al.*, 1999). Por otro lado, el efecto promotor de los AGS e inhibidor de los AGMI también ha sido observado en estudios epidemiológicos, aunque no ha podido ser comprobado experimentalmente (Kolonel *et al.*, 1999). Estudios recientes han comenzado a examinar el potencial efecto de los ácidos grasos específicos en el desarrollo de esta enfermedad, que parecen actuar mediante distintos mecanismos de acción (Terry *et al.*, 2004).

Cáncer de piel. Muchos de los primeros estudios con animales se ocuparon de estudiar la relación entre el cáncer de piel y la grasa ingerida. Contrariamente a los resultados obtenidos en el cáncer de mama, existe una relación inversa entre el cáncer de piel y el LA, que ha demostrado ejercer una actividad anticancerosa para la que se han propuesto distintos mecanismos de acción (Belury, 2002).

Cáncer de páncreas. Tampoco se ha podido demostrar ninguna relación concluyente entre el consumo de grasa en la dieta y el cáncer de páncreas, aunque se ha observado que la suplementación con AGPI n-3 puede aminorar la pérdida de peso y mejorar la

calidad de vida de los pacientes con este tipo de enfermedad, e incluso evitar la caquexia que a menudo resulta frecuente en estos pacientes (Moses *et al.*, 2004)

En resumen, se dispone de muchos datos contradictorios, pero en general existen suficientes evidencias que demuestran que los ácidos grasos n-6 incrementan el riesgo a sufrir fundamentalmente cáncer de mama, colon y próstata, y que además influyen en su propagación mediante metástasis en otros tejidos. Intervienen así en varias etapas de su desarrollo, desde el incremento del daño oxidativo del DNA hasta efectos en la proliferación, los niveles de estrógenos y el catabolismo de algunas hormonas. Por el contrario, ingestas relativamente altas de AGPI n-3 reducen el riesgo de cáncer mediante mecanismos de interferencia en la actividad de enzimas y proteínas relacionadas con señales intracelulares y con la proliferación celular.

Los AGMI n-9 presentes en el aceite de oliva también ejercen un efecto beneficioso, que se ve incrementado por la presencia de compuestos minoritarios de distinta naturaleza (vitamina E, fenoles, escualeno y lignanos) que acompañan a los lípidos, y que protegen al organismo del desarrollo de esta enfermedad. Como recomendación final es importante destacar la necesidad de disminuir la ingesta de grasas saturadas y ácidos grasos *trans*, y cabe destacar que la relación n-6/n-3 en la dieta debería ser 8-5:1 cuando la ingesta de grasa es del 30% respecto a la ingesta energética total. Además, se deberían sustituir las grasas alimentarias vegetales, cuya relación AGMI/AGPI es 1:2, por aceite de oliva, cuya relación es 5:1, que, por otro lado, contiene otras sustancias quimioprotectoras (Bartsch *et al.*, 1999; WHO, 2002; Khor, 2004).

Enfermedades de la piel

La alteración de la homeostasis epidérmica se produce por factores exógenos y endógenos que pueden causar diversos trastornos, como arrugas y pérdidas de pelo, ampollas, exantemas e incluso tumores. Entre los factores exógenos, la exposición crónica a la luz solar provoca envejecimiento prematuro, inhibe las respuestas inmunológicas a antígenos ambientales y favorece el desarrollo de diversas neoplasias cutáneas, mientras que la ingestión de algunos fármacos y varios aditivos alimentarios puede causar un gran número de erupciones cutáneas o exantemas. También existen factores endógenos, como la diabetes mellitus, el lupus eritematoso y la amiloidosis, que pueden tener importantes manifestaciones a nivel cutáneo (Gil, 2004b).

El LA es el AGPI más abundante en la piel, al que se le atribuye la función de mantener el equilibrio acuoso de la epidermis, y cuya alteración es una de las mayores anormalidades cutáneas características de la deficiencia de ácidos grasos (Ziboh *et al.*,

2002). Una característica propia de la epidermis es que la actividad Δ^6 -desaturasa es prácticamente nula, por lo que su metabolismo genera principalmente 13-hidroxiocetadecanoico (13-HODE), que es capaz de controlar la hiperproliferación y la diferenciación de la epidermis, inhibiendo la expresión génica de la isoenzima β de la proteína-quinasa C (PKC- β). Así, una ingesta deficiente de LA reduce la cantidad de 13-HODE y de sus derivados y eleva la expresión de PKC- β , provocando la aparición de lesiones escamosas en la piel. No obstante, la recuperación con una dieta rica en LA normaliza esta situación (Ziboh *et al.*, 2000).

El AA es el segundo AGPI más abundante en las membranas de las células epidérmicas (alrededor del 9% en los seres humanos). No puede ser sintetizado en la piel a partir del LA debido a la carencia de Δ^6 - y Δ^5 -desaturasas, por lo que sus niveles se mantienen gracias a los fosfolípidos de las lipoproteínas plasmáticas. Su función depende en gran medida de su conversión en metabolitos activos, especialmente PGE₂, PGF_{2 α} y PGD₂ y 15-hidroxitetraenoico (15-HETE), que no puede ser transformado en LTB₄ (Ziboh *et al.*, 2002). Sin embargo, hay que destacar la presencia de la enzima LTA₄ hidrolasa en la epidermis, capaz de convertir el LTA₄ producido por los leucocitos polimorfonucleares en el proinflamatorio LTB₄. Este mecanismo parece ser importante durante el desarrollo de la *psoriasis*, hasta el punto de que se han propuesto inhibidores de esta hidrolasa como fármacos para tratar esta enfermedad (Iversen *et al.*, 1996).

El ácido dihomo- γ -linoleico (DGLA) (20:3 n-6) es un ácido graso minoritario formado a partir del γ -linoléico (GLA) y es precursor de PGE₁, débilmente proinflamatorio, y 15-hidroxi-eicosatrienoico (15-HETrE), capaz de inhibir la 5-lipoxigenasa (5-LPO) de los leucocitos y macrófagos e impedir la formación de eicosanoides (Ziboh *et al.*, 2002), lo que explica los efectos antiinflamatorios del aceite de borraja y onagra, ricos en este ácido graso.

El EPA y el DHA son muy escasos en la piel, ya que son oxidados y generan 15-hidroxi-eicosapentaenoico (15-HEPE) y 17-hidroxi-docosahexaenoico (17-HDHE), respectivamente. Estos metabolitos monohidroxilados inhiben la 5-LPO de las células mononucleares, y disminuye la formación de LT, lo que explica, al menos en parte, los efectos beneficiosos del aceite de pescado sobre la inflamación cutánea (Miller *et al.*, 1991).

Uno de los síntomas más característicos de la deficiencia de ácidos grasos esenciales son las alteraciones cutáneas: el aumento de la proliferación de las células epidérmicas, con pérdida de la impermeabilidad al agua, incremento de la actividad metabólica, formación de queratinocitos anormales y un aumento notable de los ésteres de es-

teroles (Horrobin, 2000). Las alteraciones cutáneas se han relacionado con el déficit de ácidos grasos esenciales, ya que se han observado en animales, en niños lactantes alimentados con fórmulas artificiales deficientes y en adultos con síndromes de mala absorción de grasa o alimentados mediante nutrición parenteral libre de ésta; además, estas lesiones revierten tras la ingesta de LA (Sheretz, 1986).

Parece ser que el efecto que los AGPI ejercen sobre la piel es a partir de sus metabolitos monohidroxilados generados por la 15-LPO, los cuales inhiben la 5-LPO y disminuyen así la producción de mediadores proinflamatorios, a la vez que incrementan la síntesis de eicosanoides menos activos (Ziboh *et al.*, 2000). La suplementación con aceite de pescado aumenta el EPA y DHA circulantes, resultando efectivo para aliviar las lesiones cutáneas de los pacientes con **psoriasis**, y proporciona una alternativa para su tratamiento sin efectos colaterales.

Los estudios más amplios en este campo se han llevado a cabo en pacientes con **dermatitis atópica o eczema**, enfermedad que han relacionado con una alteración de la actividad Δ^6 -desaturasa (Horrobin, 2000). Un amplio estudio prospectivo llevado a cabo en recién nacidos procedentes de 57 parejas, en las que al menos uno de los padres tenía antecedentes de dermatitis atópica, ha demostrado que en los niños las lesiones cutáneas podrían ser atribuidas no sólo a la alteración en el metabolismo de los ácidos grasos esenciales, sino también a problemas inmunológicos iniciados pero no mantenidos por dicha alteración (Galli *et al.*, 1994).

El tratamiento con GLA es efectivo para reducir el eczema y evitar el picor característico de esta enfermedad; además, permite disminuir el consumo de unos fármacos con importantes efectos colaterales, como los antibióticos y los esteroides orales y de uso tópico (Morse *et al.*, 1989). La ingesta de este ácido graso se traduce en un aumento significativo de DGLA en los fosfolípidos plasmáticos, hematíes, neutrófilos y en la epidermis (Schafer y Kragballe, 1991), lo que podría contribuir a limitar la inflamación y la proliferación de las células epidérmicas gracias a su conversión en PGE₁ y 15-HETrE, un inhibidor de la formación de LT (Ziboh, 1992).

Por otro lado, otras anomalías detectadas en la sangre de los pacientes con eczema son el aumento de las concentraciones del receptor soluble de la IL-2 y de las catecolaminas. Es interesante destacar que estos niveles se reducen tras el tratamiento con aceites vegetales ricos en GLA de forma paralela a la disminución del enrojecimiento de la piel (Horrobin, 2000).

En relación con el uso de los n-3 en el tratamiento del eczema, hasta la fecha sólo se han encontrado beneficios moderados, y en ningún caso similares a los proporciona-

dos por el GLA (Bjorneboe *et al.*, 1987; Soyland *et al.*, 1989). Sin embargo, el uso conjunto de ambos tipos de ácidos grasos puede abrir nuevas perspectivas en el tratamiento de esta enfermedad y de todas las patologías cutáneas que cursan con procesos inflamatorios.

Otras situaciones patológicas

Nefropatía por inmunoglobulina A

La nefropatía por inmunoglobulina A (IgA) es la enfermedad glomerular más común en todo el mundo. Es una glomerulonefritis causada por la deposición mesangial de complejos de IgA, aunque su etiopatogenia es muy poco conocida. Los síntomas más característicos son hipertensión, que a su vez constituye un importante factor de riesgo asociado, proteinuria, signos de glomerulosclerosis, fibrosis intersticial y, por último, entre el 20 y el 40% de los pacientes desarrollan un fallo renal progresivo. Sin embargo, existe una considerable variabilidad clínica que hace difícil evaluar la efectividad de cualquier tratamiento (Gil, 2004b). Un estudio realizado en Japón determinó los factores de riesgo relacionados con la dieta que podrían favorecer el desarrollo de esta enfermedad. Al parecer, el elevado consumo de sal, hidratos de carbono y huevos crudos era común en los individuos enfermos, mientras que la ingesta preferente de proteínas y algunas grasas, como los AGMI y AGPI n-3, parece que de alguna manera protege frente al desarrollo de esta nefropatía (Wakai *et al.*, 1999). Se ha observado una deficiencia de LNA en estos pacientes, junto con una menor elongación de ácidos grasos de ambas series, que son sustituidos por AGS y AGMI. Este hecho es indicativo de una falta nutricional y funcional de AGPI n-3 y, a la vez, de un déficit metabólico de AGPI n-6 (Holman *et al.*, 1994).

Entre las terapias utilizadas, el uso de corticoides y la suplementación con ácidos grasos de la serie n-3 han proporcionado los mejores resultados. Existen muchos motivos que hacen pensar que el uso de AGPI n-3 puede ser útil para el tratamiento de las enfermedades renales, incluida la posible acción vasodilatadora a nivel renal, la reducción de LT proinflamatorios, una menor filtración de albúmina junto con mecanismos que previenen la nefrotoxicidad de la ciclosporina (De Caterina *et al.*, 1994), que han sido confirmados mediante estudios experimentales inmunológicos de enfermedad renal. Concretamente, el uso de ácidos grasos en el tratamiento de la neuropatía por IgA se basa en la premisa de que los AGPI n-3 pueden limitar la producción y la acción de citocinas y eicosanoides inducidas por un daño inmunológico crónico en estos órganos.

Sin embargo, se necesitan ensayos clínicos que confirmen la idoneidad de estos tratamientos. Cuatro estudios clínicos han evaluado el efecto de la administración de AGPI n-3, y sólo dos han mostrado su eficacia como estabilizadores de la función renal. El estudio más amplio, llevado a cabo en 106 pacientes, demostró que la administración durante dos años de 12 g/d de aceite de pescado (1,8 g/d de EPA y 1,2 g/d de DHA) reduce la progresión de la enfermedad (Donadio, 2000). Además, se ha comprobado que el tratamiento conjunto con ciclosporina A y AGPI n-3 reduce la nefrotoxicidad ocasionada por el uso de este inmunosupresor (Donadio, 2001). Un estudio reciente ha descrito que la suplementación durante 6 meses con 4 g/d de una mezcla de AGPI n-3 no beneficia la excreción de proteína ni la velocidad de filtración glomerular, aunque sí mejora la función tubular, el perfil lipídico y el estrés oxidativo relacionado con esta enfermedad (Parinyasiri *et al.*, 2004). Sin embargo, otro estudio ha comprobado que el DHA es capaz de inhibir las alteraciones nefrológicas producidas por la acumulación de Ig A en el riñón, mejorando el estado de la enfermedad (Jia *et al.*, 2004). Actualmente se están realizando dos estudios multicéntricos a gran escala en EE.UU. para comparar los efectos beneficiosos de los tratamientos actuales con corticosteroides y con ácidos grasos n-3 sobre esta enfermedad renal, y para determinar la conveniencia de esta terapia nutricional (Gil, 2004b).

Enfermedad pulmonar

La estructura de los pulmones está diseñada para que puedan permitir el intercambio de gases entre el aire y la sangre. Debido a la gran exposición de los pulmones a agentes lesivos, en estos órganos se producen continuamente procesos inflamatorios (Schwartz, 2000). Ante diversos estímulos primarios, el pulmón produce mediadores químicos de inflamación para eliminarlos. Los más importantes son la histamina, que produce broncoconstricción directa e incrementa la permeabilidad de las vénulas a través de un reflejo colinérgico, y el LTB_4 , que atrae selectivamente eosinófilos y neutrófilos al área estimulada. El pulmón también produce mediadores secundarios como el LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 que inducen broncoconstricción prolongada, además de aumentar la permeabilidad vascular y la secreción de moco, el PGD_2 que da lugar a broncoconstricción y vasodilatación, el factor activador de las plaquetas (PAF) que provoca agregación de plaquetas y liberación de la histamina y serotonina alojadas en los gránulos plaquetarios, y también estimula los mastocitos para la liberación de citoquinas como la IL-1, el TNF- α y la IL-6. Los neutrófilos, eosinófilos y linfocitos reclutados en el área dañada producen, a su vez, numerosos mediadores que cronifican de esta forma el proceso inflamatorio.

Existe una pérdida normal de la capacidad pulmonar en los sujetos sanos que nunca han fumado, debido a la exposición continua de sus pulmones a agentes externos de-

sencadenantes de respuestas inflamatorias, como aeroalérgenos, partículas de combustión y agentes infecciosos. Esto, junto con la aspiración del humo del tabaco y residuos orgánicos de la combustión y algunas enfermedades como el asma y la bronquitis pueden ser, al menos en parte, las causas del descenso gradual de la función pulmonar que se produce en el adulto, además de otras reacciones propias del envejecimiento tisular.

Existen numerosas evidencias acerca del papel de los ácidos grasos de la serie n-3 sobre la función y el envejecimiento pulmonar en sujetos sanos y con enfermedades de origen inflamatorio. Ya hemos descrito anteriormente el papel antiinflamatorio de los AGPI n-3, mediante la producción de eicosanoides menos activos, lo que favorece el funcionamiento de los pulmones y los protege de la aparición de estas enfermedades y del envejecimiento (Gil, 2004b).

Dos grandes estudios epidemiológicos realizados a escala nacional (Schwartz y Weiss, 1994) han observado una asociación positiva entre el volumen espiratorio forzado y el consumo de pescado, asociación que no sólo se limita a los fumadores. Por otro lado, un estudio epidemiológico realizado en EE.UU. ha constatado que el consumo de pescado se asocia a una menor incidencia de bronquitis crónica en los adultos mayores de 30 años (Schwartz y Weiss, 1990), mientras que el efecto positivo de la ingesta de ácidos grasos n-3 en la enfermedad obstructiva crónica es dosis dependiente, particularmente en el caso de los fumadores (Shahar *et al.*, 1994). Por otra parte, los estudios llevados a cabo en pulmones aislados perfundidos con una solución que contiene aceite de pescado observan menos edema que en los perfundidos con solución salina o aceite de soja (Koch *et al.*, 1993).

El **asma** es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto respiratorio, caracterizada por la producción exagerada de eicosanoides derivados del AA, principalmente LT con actividad broncoconstrictora. Su prevalencia está aumentando de manera alarmante, por lo que su prevención resulta imprescindible para mantener una calidad de vida aceptable. Los pacientes con asma y rinitis alérgica mejoran tras la ingesta de una dieta pobre en sodio, AGPI n-6 y *trans*, y también con dietas ricas en AGPI n-3 (Jaber, 2002). El tratamiento de pacientes asmáticos con suplementos de aceites de pescado reduce las concentraciones de AA en los neutrófilos y, de forma paralela, su quimiotaxis, la síntesis de LT proinflamatorios y la respuesta de estas células ante la exposición frente a alérgenos (Schwartz, 2000). Nagakura *et al.* (2000) observaron que la ingesta de estos suplementos en niños con asma bronquial conduce a una mejora sensible de su sintomatología y de la respuesta a la acetilcolina. En otros estudios de tipo epidemiológico se ha constatado que un mayor consumo de pescado entre la población infantil se asocia a una menor prevalencia de

asma y a una menor hiperreactividad, aunque no todos los estudios llegan a las mismas conclusiones (Wong, 2005).

Por otro lado, se ha observado que la suplementación durante 12 meses con 2 g/d de GLA, precursor de DGLA y 15-HETrE, es capaz de modular los mediadores inflamatorios endógenos generados durante los procesos asmáticos, aunque sin inhibir de forma significativa la formación de LTB₄ (Ziboh *et al.*, 2004).

En el caso de la *fibrosis quística*, la suplementación con AGPI n-3 mejora algunos biomarcadores en unos pacientes que desarrollan graves anomalías pulmonares debido a las alteraciones en la producción de moco, aunque de nuevo las evidencias de mejoría clínica son menores (Schwartz, 2000). Todos estos resultados abren un campo de investigación muy amplio para intentar encontrar la manera más adecuada para prevenir un gran número de enfermedades pulmonares cuyo tratamiento farmacológico conlleva una serie de efectos secundarios que podrían ser evitados mediante una terapia nutricional a base de aceites procedentes del pescado.

Enfermedad de Alzheimer

En general, durante el envejecimiento se produce una disminución en el flujo sanguíneo cerebral y una disminución de la densidad de receptores de neurotransmisores en el hipocampo, alteraciones que son especialmente significativas en pacientes con enfermedad de Alzheimer y demencia vascular (Farkas y Luiten, 2001). Otra característica que disminuye con la edad es la capacidad cognitiva, cuyo empeoramiento representa un gran problema para estos pacientes ya que les limita la posibilidad de funcionar de forma independiente. Además, se ha comprobado que el contenido de DHA en el tejido cerebral está disminuido en los pacientes que sufren alguna alteración neuronal, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, depresión, esquizofrenia, hiperreactividad, esclerosis múltiple, isquemia y en los desórdenes peroxisómicos, alteraciones que mejoran tras la administración de DHA (Horrocks y Farooqui, 2004).

Estudios epidemiológicos han mostrado una relación entre la ingesta alimentaria de grasas y el desarrollo del Alzheimer (Kalmijn *et al.*, 1997), corroborada por estudios experimentales que han demostrado que una ingesta elevada de colesterol y grasa saturada incrementa el riesgo de sufrir esta enfermedad, mientras que el consumo de aceite de pescado lo reduce (Kalmijn *et al.*, 2004). Lo que todavía no está claro es si el EPA, que también está presente en el aceite de pescado, es capaz de contribuir a esta acción beneficiosa por algún mecanismo específico. Por lo tanto, sería útil recomendar el consumo de alimentos ricos en DHA a las personas con edad avanzada, con el

fin de mejorar sus capacidades e impedir en lo posible el deterioro de los tejidos neuronales y la aparición de estas enfermedades. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder entender los mecanismos de acción y establecer las cantidades adecuadas de suplementación.

Síndromes relacionados con alteraciones de los peroxisomas

Los peroxisomas son orgánulos celulares de tipo membranoso con funciones catabólicas y anabólicas relacionadas con el metabolismo de los lípidos. Principalmente se encargan de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga (≥ 24 átomos de carbono) activados mediante la enzima acil-Co A sintetasa ligada a su membrana, hasta que la longitud de la cadena se reduce a 22 carbonos y la oxidación puede continuar en la mitocondria. Al contrario de lo que ocurre en la β -oxidación mitocondrial, en los peroxisomas la β -oxidación no requiere carnitina para la salida de los acil-CoA y, además, la hidratación y deshidrogenación, correspondientes al segundo y tercer paso de la oxidación mitocondrial, se realizan mediante una única enzima bifuncional (Gil, 2004b).

Otros lípidos oxidados en los peroxisomas son los ácidos dicarboxílicos de cadena larga, las PG, el ácido pristánico y la cadena lateral del colesterol. Por otro lado, los dos primeros pasos de la biosíntesis de los plasmalógenos y varias reacciones implicadas en la síntesis de colesterol y los ácidos biliares también se llevan a cabo en estos orgánulos.

Las alteraciones en estos orgánulos pueden estar ocasionadas por la alteración de su biosíntesis o por la deficiencia de alguna enzima peroxisómica concreta. Cuando los peroxisomas no se forman normalmente, su contenido enzimático es deficiente y se altera el metabolismo de los lípidos. Estas enfermedades son congénitas y están determinadas por, al menos, 12 genotipos diferentes (Wanders y Waterham, 2004). Afectan al sistema nervioso central y conducen a retraso mental, retinopatía, enfermedad hepática y muerte prematura. La más característica es el **síndrome de Zellweger**, en el que se produce aumento en las concentraciones de ácidos grasos de cadena muy larga, especialmente 26:0 y 26:1 n-9, y una disminución de las concentraciones de 22:0. También se altera la biosíntesis de plasmalógenos, debido a un defecto de la enzima dihidroxiacetona fosfato acil transferasa, aumentan los niveles plasmáticos de los ácidos ramificados fitánico y pristánico, y se afecta la síntesis de ácidos biliares que ocasiona metabolitos anormales.

Concretamente, se ha observado una deficiencia de DHA y un aumento de LA en el cerebro, retina, hígado, riñones y sangre de los pacientes con alteraciones peroxisómicas.

cas, lo que se consideró la causa fundamental de las alteraciones ópticas y neurológicas que presentan; la concentración de AA permanece dentro de los límites normales. Tras la administración de DHA purificado en forma de etil-DHA (100-500 mg/d) se produce una mejora principalmente de la función hepática y de los niveles séricos de DHA. Asimismo, el tratamiento normaliza los niveles de ácidos grasos de cadena muy larga en el plasma y las concentraciones de plasmalógenos en los eritrocitos. Bajo el punto de vista clínico, la mayoría de los pacientes mejoran su visión, la función hepática, el tono muscular y el contacto social; incluso, en tres pacientes se observó una mejoría en el proceso de mielinización (Martínez, 2001). Todos estos resultados sugieren que este ácido graso desempeña un papel esencial en la patogénesis del síndrome de Zellweger y que la terapia con DHA es altamente recomendable. El problema de esta enfermedad es que se desarrolla mayoritariamente *in utero*, lo que dificulta enormemente su tratamiento. Además, debido a la importancia del DHA en el desarrollo del sistema nervioso, resulta imprescindible comenzar el tratamiento lo antes posible, para evitar que los daños que se produzcan sean irreversibles (Martínez, 2001).

V.7. Conclusiones

Los lípidos de la dieta son imprescindibles para el crecimiento y el desarrollo del ser humano, no sólo por su función energética, sino por suministrar ácidos grasos esenciales y ser vehículo de vitaminas liposolubles. La ingesta controlada de distintas fuentes lipídicas puede resultar beneficiosa para la salud, mediante la modificación del perfil lipídico de las membranas y otros mecanismos más específicos que favorecen la prevención de algunas enfermedades y facilitan en algunos casos su tratamiento.

En general, la ingesta excesiva de AGS es perjudicial para el organismo, ya que promueve la formación de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad y aumenta la rigidez de las membranas celulares, comprometiendo sus funciones biológicas.

Los AGMI ejercen un papel protector a nivel cardiovascular, ya que modulan las concentraciones de colesterol plasmático y disminuyen la susceptibilidad a la oxidación de las LDL, condiciones fundamentales para la prevención de la salud cardiovascular.

Los AGPI de la serie n-3 afectan de forma positiva no sólo el desarrollo y el crecimiento fetal, sino a la prevención de algunas condiciones patológicas como procesos inflamatorios crónicos, ECV, algunos procesos cancerígenos y otras enfermedades de-

generativas, debido a sus funciones como precursores de eicosanoides débilmente proinflamatorios, frente a los altamente proinflamatorios derivados de los AGPI de la serie n-6, o a sus efectos sobre la transcripción de algunos genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades. Por lo tanto, resulta recomendable la disminución de la ingesta dietética de AGS a favor de AGMI y AGPI n-3.

V.8. Bibliografía

Aguilera, C. M.; Mesa, M. D.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Nestares, M. T.; Ros, E., y Gil, A.

(2004) Sunflower oil does not protect against. *Clin. Nutr.* 23, 673-681.

Aguilera, C. M.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Mesa, M. D.; Ramírez-Tortosa, C. L., y Gil, A.

(2002) Sunflower, virgin olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 162, 335-334.

Alzoghaibi, M. A.; Walsh, S. W.; Willey, A.; Yager, D. R.; Fowler, A. A., 3rd, y Graham, M. F.

(2004) Linoleic acid induces interleukin-8 production by Crohn's human intestinal smooth muscle cells via arachidonic acid metabolites. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 286 (4), G528-537.

Assmann, G.; De Backer, G.; Bagnara, S.; Betteridge, J.; Crepaldi, G.; Fernández-Cruz, A.; Godtfredsen, J.; Jacotot, B.; Paoletti, R.; Renaud, S.; Ricci, G.; Rocha, E.; Trautwein, E.; Urbinati, G. C.; Varela, G., y Williams, C.

(1997) International consensus statement on olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. The Olive Oil and the Mediterranean Diet Panel. *Eur. J. Cancer Prev.* 6 (5), 418-421.

Auestad, N., e Innis, S. M.

(2000) Dietary n-3 fatty acid restriction during gestation in rats: neuronal cell body and growth-cone fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 312S-314S.

Baroni, S. S.; Amelio, M.; Sangiorfi, Z.; Gaddi, A., y Battino, M.

(1999) Solid monounsaturated diet lowers LDL unsaturation trait and oxidisability in hypercholesterolemic (type II) patients. *Free Radic. Res.* 30, 275-285.

Bartsch, H.; Nair, J., y Owen, R. W.

(1999) Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20 (12), 2209-2218.

(2002) Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol. Chem.* 383 (6), 915-921.

Belluzzi, A.

(2004) Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) and inflammatory bowel disease (IBD): pathogenesis and treatment. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 8 (5), 225-229.

Belury, M. A.

(2002) Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J. Nutr.* 132 (10), 2995-2998.

Berbert, A. A.; Kondo, C. R.; Almendra, C. L.; Matsuo, T., y Dichi, I.

(2005) Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 21 (2), 131-136.

Bjorneboe, A.; Soyland, E.; Bjorneboe, G. E.; Rajka, G., y Drevon, C. A.

(1987) Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 117 (4), 463-469.

Bruin, T. W.; Brouwer, C. B.; Van Linde-Sibenius, M.; Jansen, H., y Erkelens, D. W.

(1993) Different postprandial metabolism of olive oil and soybean oil: a possible mechanism of the high density lipoprotein conserving effect of olive oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 477-483.

Bougnoux, P.

(1999) n-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2 (2), 121-126.

Calder, P. C.; Yaqoob, P.; Thies, F.; Wallace, F. A., y Miles, E. A.

(2002) Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* 87, S31-48.

Campbell, F. M., y Dutta-Roy, A. K.

(1995) Plasma membrana fatty acid-binding protein (FABP_{pm}) is exclusively located in the maternal facing membranes of the human placenta. *FEBS Lett.* 375, 227-230.

Capita, R., y Alonso-Calleja, C.

(2003) Intake of nutrients with an increased risk of cardiovascular disease in a Spanish population. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54, 57-75.

Carroll, K. K.

(1975) Experimental evidence of dietary factors in hormone-dependent cancers. *Cancer Research* 35, 3374-3383.

Carroll, K. K., y Khor, H. T.

(1975) Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Progress in Biochemical Pharmacology* 10, 308-353.

Carty, E.; Rampton, D. S.; Schneider, H.; Rutgeerts, P., y Wright, J. P.

(2001) Lack of efficacy of ridogrel, a thromboxane synthase inhibitor, in a placebo-controlled, double-blind, multi-centre clinical trial in active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15 (9), 1323-1329.

Caughey, G. E.; Mantzioris, E.; Gibson, R. A.; Cleland, L. G., y James, M. J.

(1996) The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1), 116-122.

Chen, H.; Li, D.; Chen, J.; Roberts, G. J.; Saldeen, T., y Mehta, J. L.

(2003) EPA and DHA attenuate ox-LDL-induced expression of adhesion molecules in human coronary artery endothelial cells via protein kinase B pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 (7), 769-775.

Chen, J. R.; Hsu, S. F.; Hsu, C. D.; Hwang, L. H., y Yang, S. C.

(2004) Dietary patterns and blood fatty acid composition in children with attention-deficit hyperactivity disorder in Taiwan. *J. Nutr. Biochem.* 15 (8), 467-472.

Clandinin, M. T.; Van Aerde, J. E.; Parrot, A.; Field, C. J.; Euler, A. R., y Lien E.

(1999) Assessment of feeding different amounts of arachidonic and docosahexaenoic acids in preterm infant formulas on the fatty acid content of lipoprotein lipids. *Acta Paediat.* 88, 890-896.

Costa, I.; Moral, R.; Solanas, M., y Escrich, E.

(2004) High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res. Treat.* 86 (3), 225-235.

- Cunnane, S. C.; Francescutti, V.; Brenna, J. T., y Crawford, M. A.
(2000) Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosa-hexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosa-hexaenoate. *Lipids* 35 (1), 105-111.
- Darlington, L. G., y Stone, T. W.
(2001) Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br. J. Nutr.* 85 (3), 251-269.
- De Caterina, R.; Endres, S.; Kristensen, S. D., y Schmidt, E. B.
(1994) n-3 fatty acids and renal diseases. *Am. J. Kidney Dis.* 24 (3), 397-415.
- De Caterina, R., y Libby, P.
(1996) Control of endothelial-leukocyte adhesion molecules by n-3 fatty acids. *Lipids* 31, 557-563.
- De Groot, R. H.; Hornstra, G.; Van Houwelingen, A. C., y Roumen, F.
(2004) Effect of alpha-linolenic acid supplementation during pregnancy on maternal and neonatal polyunsaturated fatty acid status and pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2), 251-260.
- De la Puerta Vázquez, R.; Martínez-Domínguez, E.; Sánchez-Perona, J., y Ruiz-Gutiérrez, V.
(2004) Effects of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism* 53 (1), 59-65.
- Decsi, T., y Koletzko, B.
(2005) N-3 fatty acids and pregnancy outcomes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 8 (2), 161-166.
- Donadio, J. V.
(2000) Use of fish oil to treat patients with immunoglobulin A nephropathy. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (Suppl.), 373S-375S.
(2001) n-3 Fatty acids and their role in nephrologic practice. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10 (5), 639-642.
- Dunstan, J. A.; Mori, T. A.; Barden, A.; Beilin, L. J.; Taylor, A. L.; Holt, P. G., y Prescott, S. L.
(2003) Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (6), 1178-1184.

Dutta-Roy, A. K.

(2000) Fatty acid transport across the placenta. *Am. J. Clin. Nutr.* 1, 315S-322S.

Elias, S. L., e Innis, S. M.

(2001) Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 807-814.

Esteve, M.; Navarro, E.; Klaassen, J.; Abad-Lacruz, A.; González-Huix, F.; Cabré, E.; Ramos, E.; Condom, E.; Fernández-Banares, F.; Pastor, C.; Humbert, P.; Martí-Rague, J., y Gassull, M. A.

(1998) Plasma and mucosal fatty acid pattern in colectomized ulcerative colitis patients. *Dig. Dis. Sci.* 43 (5), 1071-1078.

Farkas, E., y Luiten, P. G.

(2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 64 (6), 575-611.

Food and Drug Administration

(2004) CFSAN/Office of nutritional products, labelling and dietary supplements. November 1.

Fernández, G.; Chandrasekar, B.; Luan, X., y Troyer, D. A.

(1996) Modulation of antioxidant enzymes and programmed cell death by n-3 fatty acids. *Lipids* 31, S91-S96.

Field, C. J.; Thomson, C. A.; Van Aerde, J. E.; Parrott, A.; Euler, A.; Lien, E., y Clandinin, M. T.

(2000) Lower proportion of CD45RO cells and deficient interleukin 10 production by formula-fed infants, compared with human-fed, is corrected with supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31, 291-299.

Flickinger, B. D., y Huth, P. J.

(2004) Dietary fats and oils: technologies for improving cardiovascular health. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6 (6), 468-76.

Galli, E.; Picardo, M.; Chini, L.; Passi, S.; Moschese, V.; Terminali, O.; Paone, F.; Fraioli, G., y Rossi, P.

(1994) Analysis of polyunsaturated fatty acids in newborn sera: a screening tool for atopic disease? *Br. J. Dermatol.* 130 (6), 752-756.

Ghys, A.; Bakker, E.; Hornstra, G., y Van den Hout, M.

(2002) Red blood cell and plasma phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acid levels at birth and cognitive development at 4 years of age. *Early Hum. Dev.* 69 (1-2), 83-90.

Gil, A.

(2002) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 388-396.

(2003) Is eicosapentaenoic acid useful in the treatment of ulcerative colitis in children? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 37, 536-537

(2004a) Papel de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados en los procesos inflamatorios. En: Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Ed. Médica Panamericana, pp. 65-80.

(2004b) Papel de los ácidos grasos poliinsaturados en la piel, enfermedades de la piel y otras patologías emergentes. En: Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Ed. Médica Panamericana, pp. 99-110.

Gil, A.; Ramírez, M., y Gil, M.

(2003) Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, S31-34.

Gil-Campos, M., y Gil, A.

(2004) Función de los ácidos grasos poliinsaturados y oleico durante la gestación, la lactación y la infancia. En: Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Ed. Médica Panamericana, pp. 81-98.

Gómez, L.; Carrascosa, A.; Yeste, D.; Potau, N.; Rique, S.; Ruiz-Cuevas, P., y Almar, J.

(1999) Leptin values in placental cord blood of human newborns with normal intrauterine growth after 30-42 weeks of gestation. *Horm. Res.* 51 (1), 10-14.

Granato, D.; Blum, S.; Rossle, C.; Le Boucher, J.; Malnoe, A., y Dutoto, G.

(2000) Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 24, 113-118.

Grundy, S. M.

(1997) What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated, and monounsaturated fatty acids in the diet? *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 988S-990S.

Haggarty, P.

(2002) Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth-A review. *Placenta* 23, S28-S38.

Haggarty, P.; Page, K.; Abramovich, D. R.; Ashton, J., y Brown, D.

(1997) Long chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused placenta. *Placenta* 18, 635-642.

Hardman, W. E.

(2004) (n-3) fatty acids and cancer therapy. *J. Nutr.* 134 (12 Suppl.), 3427S-3430S.

Haubner, L. Y.; Stockard, J. E.; Saste, M. D.; Benford, V. J.; Phelps, C. P.; Chen, L. T.; Barness, L.; Wiener, D., y Carver, J. D.

(2002) Maternal dietary docosahexaenoic acid content affects the rat pup auditory system. *Brain Research Bulletin* 58, 1-5.

Hawkes, J. S.; Bryan, D. L.; Makrides, M.; Neumann, M. A., y Gibson, R. A.

(2002) A randomized trial of supplementation with docosahexaenoic acid-rich tuna oil and its effects on the human milk cytokines interleukin 1b, interleukin 6, and tumor necrosis factor-a. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 754-760.

Herrera, E.

(2002) Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 19 (1), 43-55.

Högyes, E.; Nyakas, C.; Kiliaan, A.; Farkas, T.; Penke, B., y Luiten, P. G.

(2003) Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience* 119 (4), 999-1012.

Holman, R. T.; Johnson, S. B.; Bibus, D.; Spencer, D. C., y Donadio, J. V., Jr.

(1994) Essential fatty acid deficiency profiles in idiopathic immunoglobulin A nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 23 (5), 648-654.

Hornstra, G.

(2000) Essential fatty acids in mothers and their neonates. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 126S-129S.

Hornstra, G.; Al, M. D. M.; Van Houwelingen, A. C.,
y Foreman van Drongelen, M. M. H. P.

(1995) Essential fatty acids in pregnancy and early human development. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 61, 57-62.

Horrobin, D. F.

(2000) Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (Suppl.), 367S-372S.

Horrocks, L. A., y Yeo, Y. K.

(1999) Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research* 40, 211-225.

Horrocks, L. A., y Farooqui, A. A.

(2004) Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70 (4), 361-372.

Hubbard, N. E.; Chapkin, R. S., y Erickson, K. E.

(1994) Effect of dietary linseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production in murine macrophages. *Lipids* 29, 651-655.

Ikemoto, A.; Kobayashi, T.; Watanabe, S., y Okuyama, H.

(1997) Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate or docosahexaenoate affect neurite outgrowth but not norepinephrine release. *Neurochem. Res.* 22, 671-678.

Institute of Medicine

(2002) Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrates, fiber, essential fatty acids, cholesterol, protein and amino acids.

Iversen, L.; Deleuran, B.; Hoberg, A. M., y Kragballe, K.

(1996) LTA4 hydrolase in human skin: decreased activity, but normal concentration in lesional psoriatic skin. Evidence for different LTA4 hydrolase activity in human lymphocytes and human skin. *Arch. Dermatol. Res.* 288 (5-6), 2172-24.

Jaber, R.

(2002) Respiratory and allergic diseases: from upper respiratory tract infections to asthma. *Prim. Care* 29 (2), 231-261.

Jakschik, B. A.; Morrison, A. R., y Sprecher, H.

(1983) Products derived from 5,8,11-eicosatrienoic acid by the 5-lipoxygenase-leukotriene pathway. *J. Biol. Chem.* 10 (21), 12797-12800.

Jia, Q.; Zhou, H. R.; Bennink, M., y Pestka, J. J.

(2004) Docosahexaenoic acid attenuates mycotoxin-induced immunoglobulin a nephropathy, interleukin-6 transcription, and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in mice. *J. Nutr.* 134 (12), 3343-3349.

Jump, D. B.

(2004) Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 41 (1), 41-78.

Jurgens, G. H.; Hoff, H.; Chisolm, G., y Esterbauer, H.

(1987) Modification of human serum LDL by oxidation: characterization and pathophysiological implications. *Chem. and Phys. Lipids* 45, 315-336.

Kalmijn, S.; Feskens, E. J.; Launer, L. J., y Kromhout, D.

(1997) Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am. J. Epidemiol.* 1 (1), 33-41.

Kalmijn, S.; Van Boxtel, M. P.; Ocke, M.; Verschuren, W. M., Kromhout, D., y Launer, L. J.

(2004) Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 27 (2), 2752-80.

Kew, S.; Mesa, M. D.; Tricon, S.; Buckley, R.; Minihane, A. M., y Yaqoob, P.

(2004) Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (4), 674-681.

Khair-EL-Din, T.; Sicher, S. C.; Vázquez, M. A.; Chung, G. W.; Stalworth, K. A., y Kitamura, K.

(1996) Transcription of the murine INOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. *J. Exp. Med.* 183, 1241-1246.

Khan, B. V.; Parthasarathy, S.; Alexander, R. W., y Medford, R. M.

(1995) Modified LDL and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 95, 1262-1270.

Khor, G. L.

(2004) Dietary fat quality: a nutritional epidemiologist's view. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 13, S22.

Kobayashi, M.; Sasaki, S.; Hamada, G. S., y Tsugane, S.

(1999) Serum n-3 fatty acids, fish consumption and cancer mortality in six Japanese populations in Japan and Brazil. *Jpn. J. Cancer Res.* 90 (9), 914-921.

Koch, T.; Duncker, H. P.; Klein, A.; Schlotzer, E.; Peskar, B. M.;

Van Ackern, K., y Neuhof, H.

(1993) Modulation of pulmonary vascular resistance and edema formation by short-term infusion of a 10% fish oil emulsion. *Infusionsther Transfusionsmed* 20 (6), 291-300.

Kolonel, L. N.; Nomura, A. M., y Cooney, R. V.

(1999) Dietary fat and prostate cancer: current status. *J. Natl. Cancer Ins.* 91, 414-428.

Kremer, J. M.; Lawrence, D. A.; Jubiz, W.; DiGiacomo, R.; Rynes, R.;

Bartholomew, L. E., y Sherman, M.

(1990) Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum.* 33 (6), 810-820.

Kremer, J. M.

(2000) N-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (Suppl.), 349S-351S.

Larqué, E.; Zamora, S., y Gil, A.

(2001) Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Hum. Dev.* 65, S31-41.

Larqué, E.; Demmelair, H., y Koletzko, B.

(2002) Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids. Importance for the early development of the nervous system. *Ann. NY Acad. Sci.* 967, 299-310.

Lauritzen, L.; Hansen, H. S.; Jorgensen, M. H., y Michaelsen, K. F.

(2001) The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress Lipid Res.* 40, 1-94.

Lombardi, V. R. M.; Cagiao, A.; Fernández-Novoa, L.; Álvarez, X. A.;

Corzo, M. D.; Zas, R.; Sanpedro, C., y Cacaueles, R.

(2001) Short term food supplementation effects of a fish derived extract on the immunological status of pregnant rats and their suckings pups. *Nut. Res.* 21, 1425-1434.

Lusis, A. J.

(2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

**Malcolm, C. A.; McCulloch, D. L.; Montgomery, C.; Shepherd, A.,
y Weaver, L. T.**

(2003) Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal* 88, F383-F390.

Martínez, M.

(2001) Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. *J. Mol. Neurosci.* 16 (2-3), 309-321.

McCowen, K. C., y Bistrrian, B. R.

(2005) Essential fatty acids and their derivatives. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21 (2), 207-215.

McMichael, A. J.

(1991) Serum cholesterol and human cancer. In Alfin-Slater, R. B. and Kritchevsky, D. (eds.) *Human Nutrition, vol. 7. Nutrition and Cancer.* Plenum Press, New York, pp. 141-158.

**Menard, C. R.; Goodman, K. J.; Corso, T. N.; Brenna, J. T.,
y Cunnane, S. C.**

(1998) Recycling of carbon into lipids synthesized de novo is a quantitatively important pathway of alpha-[U-13C]linolenate utilization in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 71, 2151-2158.

Menéndez, J. A.; Vellon, L.; Colomer, R., y Lupu, R.

(2005) Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (HerceptinTM) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann. Oncol.* 16 (3), 359-371.

**Miles, E. A.; Banerjee, T.; Dooper, M. M.; M'Rabet, L.; Graus, Y. M.,
y Calder, P. C.**

(2004) The influence of different combinations of gamma-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br. J. Nutr.* 91 (6), 893-903.

Miller, C. C.; Tang, W.; Ziboh, V. A., y Fletcher, M. P.

(1991) Dietary supplementation with ethyl ester concentrates of fish oil (n-3) and borage oil (n-6) polyunsaturated fatty acids induces epidermal generation of local putative anti-inflammatory metabolites. *J. Invest. Dermatol.* 96 (1), 98-103.

Minda, H.; Larque, E.; Koletzko, B., y Decsi, T.

(2002) Systematic review of fatty acid composition of plasma phospholipids of venous cord blood in full-term infants. *Eur. J. Nutr.* 41 (3), 125-131.

Moreiras-Varela, O.

(1989) The mediterranean diet in Spain. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43 (2), 83-87.

Morimoto, K. C.; Van Eenennaam, A. L.; Depeters, E. J., y Medrano, J. F.

(2005) Hot Topic: Endogenous Production of n-3 and n-6 Fatty Acids in Mammalian Cells. *J. Dairy Sci.* 88 (3), 1142-1146.

Morse, P. F.; Horrobin, D. F.; Manku, M. S.; Stewart, J. C.; Allen, R.; Littlewood, S.; Wright, S.; Burton, J.; Gould, D. J.; Holt, P. J., *et al.*

(1989) Meta-analysis of placebo-controlled studies of the efficacy of Epogam in the treatment of atopic eczema. Relationship between plasma essential fatty acid changes and clinical response. *Br. J. Dermatol.* 121 (1), 75-90.

Moses, A. W.; Slater, C.; Preston, T.; Barber, M. D., y Fearon, K. C.

(2004) Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br. J. Cancer.* 8 (5), 996-1002.

Nagakura, T.; Matsuda, S.; Shichijyo, K.; Sugimoto, H., y Hata, K.

(2000) Dietary supplementation with fish oil rich in n-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* 16, 861-865.

Nakamura, M. T., y Nara, T. Y.

(2003) Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68 (2), 145-150.

National Research Council

(1982) Committee on Diet, Nutrition and Cancer. National Academy Press, Washington, D.C.

(1989) Diet and Health: Implications for reducing chronic disease risk. National Academy Press, Washington, D.C.

Navia-Lombán, y Ortega-Anta, R. M.

(2000) Ingestas recomendadas de energía y nutrientes. Manual de Nutrición clínica en atención primaria, eds. A. M. Requejo y R. M. Ortega. Madrid, Editorial Complutense, pp. 1-14.

Neuringer, M.

(2000) Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (1 Suppl.), 256S-267S.

Nicolosi, R. J., y Rogers, E. J.

(1997) Regulation of plasma lipoprotein levels by dietary triglycerides enriched with different fatty acids. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29 (11), 1422-1428.

Nieto, N.; Fernández, M. I.; Torres, M. I.; Ríos, A.; Suárez, M. D., y Gil, A.

(1998) Dietary monounsaturated n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids affect cellular antioxidant ulcerative colitis induced by trinitobenzene sulfonic acid. *Digest. Dis. Sci.* 43, 2676-2687.

Nieto, N.; Torres, M. I.; Ríos, A., y Gil, A.

(2002) Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J. Nutr.* 132 (1), 11-19.

Ochoa, J. J.; Huertas, J. R.; Quiles, J. L.; Olvera, A. B., y Mataix, J.

(1999) Relative importance of the saponified and unsaponified fractions of dietary olive oil on mitochondrial lipid peroxidation in rabbit heart. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 9 (6), 284-288.

Oh, R.

(2005) Practical applications of fish oil (Omega-3 fatty acids) in primary care. *J. Am. Board Fam. Pract.* 18 (1), 28-36.

Okuyama, H.

(1997) Recommended LNA/LA ratio for the prevention of chronic, elderly diseases. *Abstracts 88th AOCS. Annual Meeting and Expo*, pp. 75-75.

OMS/FAO

(2003) Informe de una consulta mixta FAO/OMS de expertos en régimen alimentario, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. OMS Serie de Informes Técnicos 916. Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas.

- Otto, S. J.; Van Houwelingen, A. C.; Badrat-Smook, A., y Hornstra, G.
(2001) Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 302-307.
- Owen, R. W.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Hull, E.; Spiegelhalder, B., y Bartsch, H.
(2004) Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* 13 (4), 319-326.
- Parinyasiri, U.; Ong-Ajyooth, L.; Parichatikanond, P.; Ong-Ajyooth, S.; Liammongkolkul, S., y Kanyog, S.
(2004) Effect of fish oil on oxidative stress, lipid profile and renal function in IgA nephropathy. *J. Med. Assoc. Thai.* 87 (2), 143-149.
- Pattison, D. J.; Symmons, D. P., y Young, A.
(2004) Does diet have a role in the aetiology of rheumatoid arthritis? *Proc. Nutr. Soc.* 63 (1), 137-143.
- Pearson, J. D.
(1993) The control of production and release of haemostatic factors in the endothelial cell. *Baillieres Clin. Haematol.* (3), 629-651.
- Perteagudo, L.; Matorras, R.; Sanjurjo, P.; Fernández-Llebrez, L., y Rodríguez-Alarcón, J.
(1995) Consumo lipídico por la embarazada, con especial referencia a los ácidos grasos poliinsaturados. *Prog. Obst. Gin.* 38, 451-457.
- Prescott, S. L., y Calder, P. C.
(2004) N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7 (2), 123-129.
- Qiu, X.
(2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68 (2), 181-186.
- Ramírez-Tortosa, M. C.; Aguilera, C. M.; Quiles, J. L., y Gil, A.
(1998) Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu²⁺-induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis. *BioFactors* 8, 79-85.

Ramírez-Tortosa, M. C.; López-Pedrosa, J. M.; Suárez, A.; Ros, E.; Mataix, J., y Gil, A.

(1999a) Olive oil and fish oil enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *Br. J. Nutr.* 82, 31-39.

Ramírez-Tortosa, M. C.; Suárez, A.; González, M. C.; Mir, A.; Ros, E.; Mataix, J., y Gil, A.

(1999b) Effect of extra virgin olive oil and fish-oil supplementation on plasma lipids and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative alteration in free-living Spanish male patients with peripheral vascular disease. *Clin. Nutr.* 18, 167-174.

Rao, C. V., y Reddy, B. S.

(1993) Modulating effect of amount and types of dietary fat on ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase and prostaglandins production during colon carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis* 14 (7), 1327-1333.

Robinson, D. R.; Urakazr, M.; Huang, R.; Taki, H.; Sugiyama, E., y Knoell C. T.

(1996) Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 β gene transcription. *Lipids* 31, S23-S31.

Rodríguez de Turco, E. B.; Parkins, N.; Ershov, A. V., y Bazan, N. G.

(1999) Selective retinal pigment epithelial cell lipid metabolism and remodelling conserves photoreceptor docosahexaenoic acid following phagocytosis. *J. Neurosci. Res.* 57, 479-486.

Rose, D. P.

(1997) Dietary fatty acids and prevention of hormone-responsive cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216 (2), 224-233.

Roynette, C. E.; Calder, P. C.; Dupertuis, Y. M., y Pichard, C.

(2004) n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin. Nutr.* 23 (2), 139-151.

Rump, P.; Mensik, P. R.; Kester, A. D. M., y Hornstra, G.

(2001) Essential fatty acid composition of plasma phospholipids and birth weight: a study in term neonates. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 797-806.

Sampath, H., y Ntambi, J. M.

(2004) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr. Rev.* 62 (9), 333-339.

SanGiovanni, J. P., y Chew, E. Y.

(2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24 (1), 87-138.

Schafer, L., y Kragballe, K.

(1991) Supplementation with evening primrose oil in atopic dermatitis: effect on fatty acids in neutrophils and epidermis. *Lipids* 26 (7), 557-560.

Schwartz, J.

(2000) Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 7 (Suppl.), 393S-396S.

Schwartz, J., y Weiss, S. T.

(1990) Dietary factors and their relation to respiratory symptoms. The Second National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Epidemiol.* 132 (1), 67-76.

(1994) The relationship of dietary fish intake to level of pulmonary function in the first National Health and Nutrition Survey (NHANES I). *Eur. Respir. J.* 7 (10), 1821-1824.

Schwartz, B.; Birk, Y.; Raz, A., y Madar, Z.

(2004) Nutritional-pharmacological combinations- a novel approach to reducing colon cancer incidence. *Eur. J. Nutr.* 43 (4), 221-229.

Serra Majem, L.; García-Álvarez, A., y Ngo de la Cruz, J.

(2004) [Mediterranean Diet. Characteristics and health benefits]. *Arch. Latinoam. Nutr.* 54 (Suppl.), 44-51.

Shahar, E.; Folsom, A. R.; Melnick, S. L.; Tockman, M. S.; Comstock, G. W.; Gennaro, V.; Higgins, M. W.; Sorlie, P. D.; Ko, W. J., y Szklo, M.

(1994) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and smoking-related chronic obstructive pulmonary disease. *Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. N. Engl. J. Med.* 28 (4), 228-233.

Sheretz, E. F.

(1986) The skin and essential fatty acid deficiency. In Roe, D. A., ed. *Nutrition and the skin.* New York: Alan R. Liss, pp. 117-130.

Shirai, T.; Asamoto, M.; Takahashi, S., e Imaida, K.

(2002) Diet and prostate cancer. *Toxicology* 27, 89-94.

Simopoulos, A. P.

(2002) Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (6), 495-505.

Solanas, M.; Hurtado, A.; Costa, I.; Moral, R.; Menéndez, J. A.;

Colomer, R., y Escrich, E.

(2002) Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int. J. Oncol.* 21 (4), 745-753.

Soyland, E.; Rajka, G.; Bjorneboe, A.; Bjorneboe, G. E., y Drevon, C. A.

(1989) The effect of eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. A clinical study. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* (Stockh.) 144, 139.

Takeuchi, T.; Fukumoto, Y., y Harada, E.

(2002) Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131 (1-2), 193-203.

Terpstra, A. H.; Van den Berg, P.; Jansen, H.; Beynen, A. C., y Van Tol, A.

(2000) Decreasing dietary fat saturation lowers HDL-cholesterol and increases hepatic HDL binding in hamster. *Br. J. Nutr.* 83, 151-159.

Terry, P. D.; Terry, J. B., y Rohan, T. E.

(2004) Long-chain (n-3) fatty acid intake and risk of cancers of the breast and the prostate: recent epidemiological studies, biological mechanisms, and directions for future research. *J. Nutr.* 134 (12), 3412S-3420S.

Thomsen, C.; Rasmussen, O.; Lousen, T.; Holst, J. J.; Fenselau, S.;

Schrezenmeir, J., y Hermansen, K.

(1999) Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1135-1143.

Thompson, H. J.; Zhu, Z., y Jiang, W.

(2004) Weight control and breast cancer prevention: are the effects of reduced energy intake equivalent to those of increased energy expenditure? *J. Nutr.* 134 (12), 3407S-3411S.

Trebble, T. M.; Arden, N. K.; Wootton, S. A.; Calder, P. C.; Mullee, M. A.; Fine, D. R., y Stroud, M. A.

(2004) Fish oil and antioxidants alter the composition and function of circulating mononuclear cells in Crohn disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 80 (5), 1137-1144.

US Department of Health and Human Services

(1998) The Surgeon General's Report on Nutrition and Health. D.H.H.S. (PAS) Publ. No. 88-50210. United States Printing Office, Washington, D.C., pp. 177-247.

Wainwright, P. E.

(2002) Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 61 (1), 61-69.

Wakai, K.; Kawamura, T.; Matsuo, S.; Hotta, N., y Ohno, Y.

(1999) Risk factors for IgA nephropathy: a case-control study in Japan. *Am. J. Kidney Dis.* 33 (4), 738-745.

Wallace, F. A.; Miles, E. A., y Calder, P. C.

(2003) Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 89 (5), 679-689.

Wallis, J. G.; Watts, J. L., y Browse, J.

(2002) Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27 (9), 467-473.

Wanders, R. J., y Waterham, H. R.

(2004) Peroxisomal disorders I: Biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin. Genet.* 67 (2), 107-133.

Waterman, I. J.; Emmison, N.; Sattar, N., y Dutta-Roy, A. K.

(2000) Further characterization of a novel triacylglycerol hydrolase activity (PH 6.0 optimum) from microvillous membranes from human term placenta. *Placenta* 21, 813-823.

WHO

(2002) Nutrition and lifestyle: opportunities for cancer prevention, vol. 156. Lyon: IARC Press.

WHO/FAO

(2002) Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases Geneva, 28 January-1 February.

Willett, W. C.

(1990) Epidemiologic studies of diet and cancer. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 7 (2-3), 93-97.

Wong, K. W.

(2005) Clinical efficacy of n-3 fatty acid supplementation in patients with asthma. *Am. Diet. Assoc.* 105 (1), 98-105.

Xu, L. Z.; Sánchez, R.; Sali, A., y Heintz, N.

(1996) Ligand specificity of brain lipid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271 (40), 24711-24719.

Yaqoob, P.

(1998) Lipids and immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1, 153-161.

(2003) Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to clinical applications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6 (2), 133-150.

Zhao, Y.; Joshi-Barve, S.; Barve, S, y Chen, L. H.

(2004) Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J. Am. Coll. Nutr.* 23 (1), 71-78.

Ziboh, V. A.

(1992) Prostaglandins, leukotrienes, and hydroxy fatty acids in epidermis. *Semin. Dermatol.* 11 (2), 114-120.

Ziboh, V. A.; Miller, C. C., y Cho, Y.

(2000) Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (1 Suppl.), 361S-366S.

Ziboh, V. A.; Cho, Y.; Mani, I., y Xi, S.

(2002) Biological significance of essential fatty acids/prostanoids/lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in the skin. *Arch. Pharm. Res.* 25 (6), 747-758.

Ziboh, V. A.; Naguwa, S.; Vang, K.; Wineinger, J.; Morrissey, B. M.;

Watnik, M., y Gershwin, M. E.

(2004) Suppression of leukotriene B4 generation by ex-vivo neutrophils isolated from asthma patients on dietary supplementation with gammalinolenic acid-containing borage oil: possible implication in asthma. *Clin. Dev. Immunol.* 11 (1), 13-21.

VI. Alimentos transgénicos funcionales

Daniel Ramón Vidal

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología,
Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia,
Universitat de València

Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología
de Alimentos (CSIC).

VI.1. Genética y mejora de propiedades funcionales

VI.2. Alimentos transgénicos con mejor composición proteica

VI.3. Semillas oleaginosas transgénicas con nuevas composiciones de ácidos grasos

VI.4. Modificaciones en la composición de vitaminas

VI.5. Plantas transgénicas sin deficiencias en hierro

VI.6. Producción de otros compuestos con relevancia funcional o sanitaria en organismos transgénicos

VI.7. Vacunas orales

VI.8. Producción en la leche de animales transgénicos de proteínas de interés farmacológico

VI.9. El futuro

VI.10. Bibliografía

VI.1. Genética y mejora de propiedades funcionales

Un repaso a los últimos números de las revistas científicas punteras en el área de la ciencia y la tecnología de los alimentos permite concluir que, en estas disciplinas, buena parte de las líneas de investigación y desarrollo para el futuro se basarán en el diseño de los llamados alimentos funcionales y la creación de alimentos transgénicos. Entendemos como alimento funcional aquel que, independientemente de su valor nutritivo, es rico en algún componente que aporta propiedades positivas e importantes para la salud, de forma que el efecto beneficioso debe manifestarse con las cantidades que de dicho alimento se consumen habitualmente en la dieta (Roberfroid, 2002). Por otro lado, definimos un alimento transgénico como aquel en cuyo diseño se han utilizado técnicas de ingeniería genética (Ramón, 1999). Pues bien, lejos de caminar por sendas paralelas, las investigaciones sobre estos dos tipos de alimentos tienen claras encrucijadas de contacto, de forma que desde hace varios años se han desarrollado mediante técnicas de ingeniería genética nuevos alimentos con mejores propiedades nutricionales o sanitarias, o, lo que es lo mismo, alimentos transgénicos funcionales.

Desde el punto de vista conceptual no nos enfrentamos a algo nuevo, ya que aplicar genética en la mejora de las propiedades nutricionales de los alimentos es algo que el mejorador de animales de granja o vegetales comestibles viene haciendo desde hace 12.000 años, cuando comenzó el Neolítico. Son muchos los cultivos vegetales que han sufrido modificaciones genéticas mediadas empíricamente por el hombre, generando como resultado nuevos cultivos con distintas propiedades nutricionales. Para llevar a cabo dichas mejoras se han utilizado durante milenios dos técnicas genéticas: la mutación o variabilidad natural y el cruce sexual o hibridación. En el caso de la mutación, nuestros antepasados seleccionaron muchos mutantes espontáneos con mejores propiedades nutricionales. Por ejemplo, hace miles de años los primeros agricultores escogieron mutantes espontáneos de cereales que contenían menos almidón, probablemente porque con ellos hacían tortitas con mejor consistencia (Goff y Salmeron, 2004). De la misma forma, con el cruce sexual consiguieron eliminar características indeseadas de los parentales y mantener o exacerbar las deseadas en la descendencia. Ahora bien, con ambas técnicas se dieron y se dan dos restricciones. La primera hace referencia a la falta de direccionalidad en la mejora genética introducida. Es imposible mutar selectivamente un único gen de un genoma, de la misma forma que en un cruce sexual no es factible conseguir agrupar en un descendiente tan sólo los genes deseados de un parental y del otro. La segunda se refiere a la imposibilidad de saltar la barrera de especie. Resulta imposible mutar una cebolla hasta conseguir que tenga el mismo contenido en vitamina C que una naranja, como resulta imposible llevar a cabo un cruce sexual entre ambos vegetales.

La ingeniería genética es capaz de evitar estas limitaciones. Recordemos que en esta técnica se toma un único gen del genoma de un organismo donador, se amplifica y/o se modifica en el laboratorio y, posteriormente, se reintroduce en el organismo original o en uno distinto generando un organismo transgénico, también llamado organismo modificado genéticamente. Da igual el organismo del que provenga el gen y el organismo en que se vaya a expresar. El material hereditario de cualquier ser vivo es el ácido desoxiribonucleico (abreviadamente, ADN), de forma que un gen proveniente de un genoma vegetal puede funcionar en el genoma de otro vegetal, o incluso en el de otro animal, siempre y cuando se utilicen señales de expresión adecuadas. La gran diferencia entre esta técnica y las anteriormente descritas radica en dos aspectos: cuando se emplean técnicas de ingeniería genética se manejan genes aislados, perfectamente identificados, en los que es posible introducir mutaciones en puntos concretos o dirigir su localización a zonas específicas de los cromosomas. Por el contrario, como antes se indicó, en los procesos de mutación e hibridación se manejan miles de genes que mutan o se cruzan de forma incontrolada, sin que se pueda orientar su localización en los cromosomas. Así, frente al azar de estos procesos, la ingeniería genética realiza cambios controlados en el genoma (Harlander, 2002; Ramón, 2004).

Aun admitiendo que genética en el diseño de alimentos no es nada nuevo, hay que recordar que existen diferencias entre los alimentos transgénicos y su convencional correspondiente. La más importante es la relativa al posible salto de la barrera de especie, ya que este hecho supone algo que nunca antes había sido posible, como es el introducir y expresar en un mismo organismo genes de especies, familias o, incluso, reinos distintos. Este hecho, cuando afecta a los genes llamados de reserva ética, puede tener repercusiones en ciertos sectores de consumidores. Un ejemplo de ello sería la expresión de genes provenientes del genoma de un animal en un genoma vegetal y su posible consumo por parte de vegetarianos estrictos. Otro caso sería la expresión de genes provenientes de genomas de animales que presentan limitaciones de ingesta para alguna religión o grupo étnico en cualquier otro organismo usado como alimento. Éste sería el caso de la expresión de un gen proveniente del genoma del cerdo para la comunidad musulmana. Aun teniendo presentes estas situaciones, la potencialidad de las técnicas de ingeniería genética en la mejora de la composición nutricional de los alimentos y la consiguiente generación de alimentos transgénicos funcionales es una oportunidad de futuro irrenunciable para mejorar la salud de muchos consumidores (King, 2002; Mackey, 2002). Por ello, los resultados no se han hecho esperar y se ha generado toda una gama de alimentos transgénicos funcionales de origen animal, vegetal o fermentado que comentaremos a continuación (Comai, 1993; Grusak, 2002; Mackey y Fuchs, 2002; Bouis *et al.*, 2003; Tucker, 2003).

VI.2. Alimentos transgénicos con mejor composición proteica

Muchos de los vegetales que se consumen de forma habitual en la dieta tienen un contenido reducido de uno o más de los aminoácidos esenciales. Por ejemplo, casi todas las legumbres son deficientes en aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina, mientras que los cereales tienen carencias de isoleucina y lisina. Este hecho cobra especial relevancia en algunos países en desarrollo en los que millones de personas siguen una alimentación basada en el consumo de un único cereal o legumbre, lo que acarrea la aparición de problemas nutricionales como consecuencia de la falta de algún aminoácido. Una solución a este problema pasa por la generación de cultivos transgénicos que tengan balanceado el contenido de aminoácidos en su proteína total. Para lograrlo se clona un gen proveniente de otra planta que codifica una proteína cuyo contenido en el aminoácido de interés sea elevado. Dicho gen se expresa en el cultivo deficitario con señales de regulación que permitan una expresión elevada. Siguiendo esta estrategia se ha logrado una variedad transgénica de arroz que contiene el gen que codifica la faseolina, una proteína de reserva de la semilla de la judía. El arroz es deficitario en lisina, pero en esta variedad transgénica la proteína exógena se expresa a niveles elevados en el endospermo, con lo que el contenido global de lisina pasa del 3,4 al 6% (Zheng *et al.*, 1995). También se han expresado en legumbres genes que codifican proteínas ricas en metionina provenientes de arroz, girasol, maíz o nuez brasileña (Altenbach y Simpson, 1990; De Clercq *et al.*, 1990).

Con una aproximación distinta se han construido variedades transgénicas de patata incrementadas en su contenido en lisina. Este aminoácido se sintetiza desde el aspartato mediante una ruta metabólica que conduce a la síntesis de lisina, así como también de otros aminoácidos esenciales como la isoleucina, la metionina y la treonina. La ruta está controlada en primera instancia por una inhibición *feed-back* del primer paso de la ruta catalizado por la enzima aspartato quinasa. A nivel de la síntesis de lisina se produce un segundo bloqueo por el mismo proceso, si bien en este caso la enzima inhibida es la dihidropicolinato sintasa. Este segundo mecanismo de inhibición es más fuerte que el primero. Basándose en estos conocimientos se han generado patatas transgénicas que contienen genes bacterianos que codifican las enzimas citadas, ya que en bacterias las inhibiciones son menos fuertes. Los resultados han sido satisfactorios y se han generado patatas transgénicas con un 6 y un 8% más de lisina al introducir los genes que codifican la dihidropicolinato sintasa y la aspartato quinasa, respectivamente (Sévenier, 2002). Aún más, se ha construido una versión mutada *in vitro* del gen de la dihidropicolinato sintasa de patata que codifica una enzima que no se ve afectada por la inhibición con lisina. Con este alelo mutado

se ha construido una patata transgénica que contiene un 16% más de lisina (Sévenier, 2002).

Recientemente se ha descrito una estrategia complementaria consistente en incrementar el valor global de todos los aminoácidos. Para lograrlo se trabaja con genes que codifiquen proteínas no alergénicas que posean un buen balance de aminoácidos. Éste es el caso del gen AmA1 del amaranto, que codifica la albúmina de reserva en la semilla de este vegetal. Dicho gen se ha expresado en plantas de patata generando patatas transgénicas que tienen cinco veces más proteína que las convencionales y, además, presentan niveles elevados de los veinte aminoácidos esenciales (Chakraborty *et al.*, 2000). Aunque todavía no ha sido publicado, el mismo laboratorio ha anunciado que ya ha conseguido la adición de este mismo gen a cinco variedades comerciales de arroz de uso en el sudeste asiático con similares resultados y que está trabajando en desarrollos similares en batata y mandioca. La relevancia social de estos resultados para un país como India es, sin duda, apreciable.

VI.3. Semillas oleaginosas transgénicas con nuevas composiciones de ácidos grasos

Las técnicas de ingeniería genética también se han aplicado a la mejora en la composición nutricional de aceites. La mayoría de trabajos se ha encaminado a diseñar nuevas semillas transgénicas que rindan aceites vegetales en los que el perfil de ácidos grasos sea más saludable desde el punto de vista nutricional (Hildebrand, 1992; Kinney, 1996). Para conseguirlo, se manipula la ruta de síntesis de ácidos grasos actuando sobre distintos pasos de la ruta responsables de la desaturación de estas moléculas. Para lograrlo en muchos casos se ha utilizado una estrategia de ingeniería genética denominada “antisentido”, que consiste en silenciar notablemente la expresión de un gen determinado hasta conseguir que la planta transgénica sólo exprese niveles residuales de la enzima codificada por el gen. Así se logra el bloqueo parcial de la ruta a ese nivel. De esta forma se ha silenciado en soja la expresión del gen que codifica la μ -3 o la μ -6 desaturasa, generando variedades transgénicas que producen aceites con menos ácido linolénico o menos ácido linoleico y más oleico, respectivamente (Kinney, 1994). En el caso de la colza se ha logrado, además, la construcción de una variedad transgénica por antisentido con menor expresión del gen que codifica la enzima Δ -9 desaturasa, lo que se traduce en un incremento en ácido esteárico (Knutzon *et al.*, 1992). Muy recientemente, científicos del CSIRO australiano han anunciado la construcción de variedades transgénicas de algodón en las que, por medio de la técnica del antisentido, se logran semillas transgénicas con altos contenidos de oleico y esteárico

y bajos niveles de palmitato que podrían ser útiles en la confección de margarinas (Liu *et al.*, 2002). Se están ensayando en campo desde el año 2002 y se espera tener la primera liberación comercial en el año 2005 (<http://www.pi.csiro.au/Media/MediaReleases/MR%2028-05-01.htm>).

Por técnicas convencionales de expresión de genes también se han logrado resultados significativos. Por ejemplo, la expresión en transgenia del gen FatA1 de la planta *Garcinia mangostana*, que codifica una tioesterasa portadora de acilo en plantas de colza, da lugar a una variedad transgénica que contiene un 60% de estearato más que la variedad silvestre (Facciotti *et al.*, 1999). En algunos países en vías de desarrollo el aceite de palma se usa con frecuencia, aunque su alto contenido en ácido palmítico es poco recomendable desde el punto de vista nutricional. Mediante el uso de una estrategia combinada entre cruce sexual tradicional e ingeniería genética se han conseguido variedades transgénicas de palma mejoradas en las que se ha reducido considerablemente la expresión del gen que codifica la enzima palmitoil ACP tioesterasa e incrementado la del gen β -ceto acil ACP sintasa II. En ellas el contenido de palmitato está considerablemente reducido y, por el contrario, se ha incrementado el de oleato, sin que se hayan visto afectados los niveles de carotenoides, tocoferoles o esteroides (Jalani *et al.*, 1997).

Otro tema de interés es la producción de ácidos grasos poliinsaturados, los llamados PUFA, en plantas o animales. Los PUFA de cadena larga, como el ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico, sólo son sintetizados por los mamíferos. Tienen relevancia en el desarrollo del cerebro y la retina, previenen enfermedades cardiovasculares y son precursores de la síntesis de prostaglandinas. Muy recientemente se ha descrito la expresión en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* de tres genes provenientes de algas y hongos que reconstruyen la ruta de síntesis de estos PUFA de cadena larga, dando lugar a la síntesis de estos compuestos en el vegetal transgénico (Qi *et al.*, 2004). Sin duda, como los mismos autores anuncian en el artículo, pronto habrá resultados similares en soja. También en los últimos meses se ha publicado la construcción en el Hospital General de Massachusetts de ratones transgénicos capaces de generar ácidos grasos μ -3 al expresar un gen proveniente del gusano *Caenorhabditis elegans* (Kang *et al.*, 2004). De esta forma, la fuente natural de este tipo de PUFA ya no serán sólo algunas variedades de algas o vegetales.

VI.4. Modificaciones en la composición de vitaminas

Millones de habitantes de países en desarrollo sufren deficiencias en vitaminas como consecuencia de una dieta basada en el consumo de uno o, a lo sumo, unos pocos ali-

mentos. De todas estas deficiencias vitamínicas la más importante es la falta de vitamina A, debida a la ingesta de dietas basadas en cereales como el arroz, con poco consumo de frutas, legumbres y alimentos de origen animal. Es típica de países africanos y del sudeste asiático. La falta de vitamina A provoca varios trastornos fisiológicos, entre otros problemas oculares que pueden llegar a causar ceguera, así como una mayor propensión a contraer enfermedades infecciosas como diarreas o sarampión. Se estima que hay 124 millones de niños en todo el mundo que padecen esta deficiencia vitamínica y que su suministro salvaría la vida a 1,5 millones de niños cada año. La base metabólica de la deficiencia de esta vitamina en el arroz se basa en que este vegetal sólo posee parte de la ruta metabólica que da lugar a la producción del precursor de la vitamina A, el β -caroteno o provitamina A. Le faltan tres genes que codifican las enzimas fitoeno sintasa, fitoeno desaturasa y licopeno ciclasa. Para solventar esta deficiencia metabólica se ha creado una variedad transgénica de arroz que contiene el gen que codifica la fitoeno sintasa y la licopeno ciclasa proveniente del genoma del narciso y el de la fitoeno desaturasa del genoma de la bacteria del suelo *Erwinia uredovora*. El endospermo de este arroz contiene 1,6 μg de vitamina A por gramo y tiene una tonalidad dorada, por lo que recibe el nombre de arroz dorado (Ye *et al.*, 2000). Los opositores a los transgénicos dicen que la concentración de vitamina A en sus tejidos es insuficiente, por lo que niegan la viabilidad de este desarrollo. No opinan lo mismo sus autores, que ven en este transgénico el punto de arranque para un programa de mejora que incremente la cantidad de provitamina A (Potrykus, 2001). Lo bien cierto es que en la actualidad y en la sede del International Rice Research Institute de Filipinas, un organismo internacional para la investigación en arroz, se está transfiriendo mediante cruce sexual esta nueva traza metabólica a variedades autóctonas de arroz de uso en China, India, el sudeste asiático, África o Latinoamérica (Beyer *et al.*, 2002).

Se ha seguido una estrategia similar en otros vegetales comestibles. Por ejemplo, en zanahorias se ha conseguido expresar el gen que codifica la sintasa, detectándose un incremento de 2 a 5 veces en el contenido total en carotenoides. Por el contrario, en tomates transgénicos se ha expresado el gen que codifica la desaturasa, produciéndose un descenso a la mitad del contenido total en carotenoides, si bien asociado a un aumento de tres veces en β -caroteno (Römer *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 2001). En experimentos alternativos llevados a cabo en la compañía norteamericana Calgene se ha podido comprobar que la expresión del gen que codifica la sintasa en plantas transgénicas de colza permite recuperar desde las mismas un aceite que contiene más de 2 miligramos de carotenoides por gramo. Dos cucharadas de café de dicho aceite podrían ser suficientes para paliar el problema nutricional de la falta de vitamina A.

También se ha mejorado el contenido en otras vitaminas. Tras comprobar que la biosíntesis de vitamina C en fresas se puede producir a partir de ácido D-galacturónico,

un grupo de científicos ha construido plantas transgénicas de *A. thaliana* con más de un 30% de incremento en su contenido de vitamina C (Agius *et al.*, 2003). En cuanto a la vitamina E, conviene recordar que con este término genérico hacemos referencia a ocho formas naturales distintas de tocotrienoles y tocoferoles que no son sintetizadas por los mamíferos, por lo que se consideran un componente esencial de su dieta. La fuente principal de este micronutriente son los aceites vegetales, si bien en ellos hay cuatro tipos distintos de tocoferoles que se denominan α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y Δ -tocoferol, y difieren en la posición y número de sus metilaciones. Aunque todos se absorben durante la digestión, sólo el α -tocoferol se retiene y distribuye a lo largo del cuerpo, por lo que es el más importante desde el punto de vista nutricional. En la ruta de síntesis de estos compuestos el paso limitante es el que convierte el γ -tocoferol en α -tocoferol. Esta reacción está catalizada por la enzima γ -tocoferol metil transferasa. Desde el genoma de *A. thaliana* se ha clonado el gen que codifica esta enzima y por ingeniería genética se ha cambiado el promotor que regula su expresión, lográndose una sobreproducción de la enzima. Estas plantas transgénicas tienen el mismo contenido global de tocoferoles, pero los niveles de α -tocoferol se han incrementado hasta 80 veces más (Shintani y Della Pena, 1998). Se han logrado resultados similares trabajando con maíz (Rocheford *et al.*, 2002).

Recientemente se ha seguido una estrategia alternativa para redireccionar la ruta de síntesis de la vitamina E hacia la producción de tocotrienol. Estos compuestos son la fracción mayoritaria de la vitamina E en las semillas de la mayoría de plantas monocotiledóneas y en algunas dicotiledóneas, y tienen mayor poder antioxidante que los tocoferoles, aunque se absorben peor. Desde hace años se conoce su capacidad para reducir los niveles de colesterol sérico e inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama. La síntesis de tocotrienol comienza con la condensación de ácido homogentísico y geranio-geranil difosfato. El gen que codifica la enzima responsable de esta condensación ha sido clonado desde el genoma del arroz, la cebada y el trigo. La expresión del gen de la cebada en maíz da lugar a una variedad transgénica que posee seis veces más tocotrienol (Cahoon *et al.*, 2003). Si bien los resultados son muy prometedores, aun está por demostrar el efecto *in vivo* de todos estos derivados de la vitamina E (Dörmann, 2003).

La mejora de contenidos en vitamina B₂ o ácido fólico también ha sido abordada mediante técnicas de ingeniería genética. Su déficit durante el desarrollo embrionario causa defectos en el tubo neuronal y, en adultos, su falta acarrea enfermedades cardiovasculares y cáncer. Algunas bacterias lácticas de la especie *Lactococcus lactis* son capaces de producir quesos y a la vez secretar ácido fólico a la masa del queso. Se han clonado los genes que codifican las enzimas responsables de su síntesis y se han construido cepas con combinaciones de varias copias de los mismos en sus genomas. En

algunas de ellas los niveles de ácido fólico secretado aumentan hasta 10 veces, manteniéndose la capacidad tecnológica de fermentar la leche. Estos resultados abren la puerta al uso de iniciadores microbianos en la industria láctea capaces de producir derivados lácteos con niveles elevados de vitamina B₂ (Sybesma *et al.*, 2003). Ahora bien, la principal fuente de ácido fólico en nuestra dieta son las plantas. Mediante la expresión de un gen sintético construido en el laboratorio a partir de los datos del gen que codifica la enzima GTP ciclohidrolasa en mamíferos se han construido tomates transgénicos con el doble de contenido en ácido fólico (Díaz de la Garza *et al.*, 2004). En bacterias lácticas, y siguiendo estrategias similares a las anteriormente descritas, también se han construido cepas hipersecretoras de vitamina B₁₂ y riboflavina (Hugenholz *et al.*, 2002). Aunque todos estos trabajos básicos son el comienzo de un largo camino, muchos de estos resultados ya se están transfiriendo a variedades de interés agronómico o industrial. Por ello resulta evidente que, en un futuro no lejano, veremos en nuestros mercados plantas y microorganismos transgénicos comestibles que son o producen alimentos con mejor contenido vitamínico.

VI.5. Plantas transgénicas sin deficiencias en hierro

El 30% de la población mundial padece deficiencia en hierro, sobre todo en aquellas partes del planeta donde la dieta es fundamentalmente vegetal. La falta de este micronutriente incrementa la mortalidad de las mujeres embarazadas y sus fetos, produce un retardo en el desarrollo psicomotriz y mental de los niños y da lugar a un descenso de la función inmune. La cantidad de hierro biodisponible en la dieta es un balance entre su concentración en el alimento y su absorción. En los países en vías de desarrollo el hierro de la dieta proviene de cereales que son deficitarios. Además, dicha dieta contiene cantidades elevadas de ácido fítico que inhibe su absorción. La solución a este problema pasa por la suplementación de la dieta con preparaciones minerales, la fortificación de los alimentos o la diversificación de la dieta, incluyendo frutas, algunos vegetales ricos en hierro o carne. Desgraciadamente, ninguna de ellas ha funcionado con éxito, por lo que se han diseñado algunas estrategias de ingeniería genética para intentar conseguir alimentos autóctonos en los que el déficit por hierro se solventa. Los resultados más importantes han sido obtenidos trabajando con arroz, ya que el bajo contenido en hierro de este cereal es un grave problema nutricional para centenas de millones de personas en todo el mundo.

Para incrementar los valores de hierro en arroz se han expresado genes que codifican proteínas que acomplejan y almacenan hierro (Zimmermann y Hurrell, 2002). La más

conocida de todas ellas es la ferritina. Se trata de una proteína multimérica formada por veinticuatro subunidades homólogas o heterólogas que, al disponerse en el espacio, generan una cavidad central donde se almacenan hasta 4.500 átomos de este metal. Los genes que codifican este tipo de proteínas están presentes en muchas plantas y algunos de ellos han sido clonados desde el genoma de la judía, el maíz o el guisante. Varios grupos de investigadores han expresado el gen que codifica la ferritina de judía en distintas variedades de arroz, consiguiendo triplicar los valores de hierro por gramo de endospermo del cereal (Goto *et al.*, 1999; Lucca *et al.*, 2001a y b, 2002). Además, estas variedades transgénicas se han usado para alimentar ratas anémicas y se ha podido observar una recuperación de la enfermedad tras veintiocho días de dieta (Murray-Kolb *et al.*, 2002).

Para mejorar la biodisponibilidad del hierro se han usado dos estrategias diferentes. En la primera se han expresado genes que codifican metalotioneínas que son proteínas ricas en cisteína. Durante la digestión, la formación de péptidos ricos en este aminoácido favorece la absorción de hierro. Por ello, cualquier alimento rico en cisteína favorece la biodisponibilidad del hierro presente en la dieta. Para ello se han generado plantas transgénicas de arroz que contienen copias adicionales del gen de la metalotioneína de este cereal bajo el control de señales reguladoras que dirigen su expresión y síntesis al endospermo. Dichas plantas tienen incrementado hasta siete veces el contenido en residuos de cisteína (Lucca *et al.*, 2001a y b, 2002). La segunda estrategia se basa en eliminar el ácido fítico del grano del cereal mediante la expresión de un gen proveniente del hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* que codifica la enzima fitasa, (Lucca *et al.*, 2001a y b, 2002). Esta enzima destruye el ácido fítico y es termotolerante. Los granos de este arroz transgénico presentan valores elevados de actividad fitasa pero tras cocerlos veinte minutos sólo retienen el 8% de la actividad, por lo que será necesario mejorar la termoestabilidad de esta fitasa si se pretende usar esta estrategia. Existen otras evidencias relativas a la expresión de fitasas en vegetales transgénicos que han resultado más eficaces. Por ejemplo, el gen de la fitasa proveniente del genoma del hongo *Aspergillus niger* se ha expresado en plantas transgénicas de tabaco. Se han alimentado pollos broiler con dietas suplementadas con semillas de estas plantas y se ha detectado un incremento en la tasa de crecimiento de los animales debida a una mejora nutricional en el contenido en fósforo de la dieta (Pen *et al.*, 1993b). Estos resultados indican que la enzima es capaz de romper el fitato presente en el pienso liberando fosfato, y que el uso de estas semillas como suplemento del pienso es una alternativa eficaz desde el punto de vista nutricional y también desde el punto de vista medioambiental, al eliminar la necesidad de suplementar los piensos con fósforo inorgánico.

VI.6. Producción de otros compuestos con relevancia funcional o sanitaria en organismos transgénicos

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que tienen muchas propiedades funcionales, entre las que destacan su capacidad antioxidante y su acción vasodilatadora. Se han descrito más de 4.000 flavonoles distintos en plantas, si bien casi todos ellos parten de una ruta metabólica común bien identificada. Varios de los genes que codifican enzimas de esta ruta han sido clonados y con ellos ha sido posible generar plantas transgénicas con características nutricionales mejoradas (Forkmann y Martens, 2001). Por ejemplo, se han identificado dos genes del genoma de la soja que codifican la enzima isoflavona sintasa, de forma que su expresión en la planta modelo *A. thaliana* hace que la misma produzca el flavonoide genisteína (Jung *et al.*, 2000). De forma similar se ha llevado a cabo la expresión del gen proveniente del genoma de la petunia que codifica la chalcona isomerasa en plantas transgénicas de tomate. El resultado son tomates transgénicos que contienen 78 veces más flavonoles que las variedades convencionales, destacando sobre todo la presencia de rutina. Estos tomates cuando son procesados industrialmente retienen el 65% de los flavonoles presentes en el fruto transgénico (Muir *et al.*, 2001; Sévenier, 2002). Muy recientemente se ha clonado el gen del genoma del tomate que codifica la enzima hidroxicia-nomoil-CoA quinasa. Esta enzima es clave en la síntesis de ácido clorogénico, una flavona que previene la aparición de arterioesclerosis y a la que se le supone un cierto efecto antitumoral. Dicho gen se ha expresado en múltiples copias en tomates transgénicos y los mismos muestran un incremento del 10% en sus niveles de ácido clorogénico. Este pequeño incremento aumenta notoriamente la capacidad antioxidante del fruto transgénico (Niggeweg *et al.*, 2004).

Se ha sugerido por parte de algunos autores que el consumo moderado de vino puede prevenir la aparición de enfermedades coronarias. Para ello se basan en la denominada “paradoja francesa”, un estudio epidemiológico clásico elaborado en Francia que indicaba que la tasa de enfermedades coronarias en las regiones francesas en las que tradicionalmente se consumía vino era significativamente inferior a la registrada en las regiones donde predominaba el consumo de cerveza, a pesar de que el elevado consumo de grasas animales en la dieta era similar en ambas zonas. Hay muchos compuestos en el mosto de uva que pueden ser responsables de este fenómeno. Uno de ellos es el resveratrol, que es una fitoalexina producida por la vid y otras plantas como respuesta a la infección por hongos fitopatógenos. Aparece en el vino en forma de dos isómeros, el *cis* y el *trans*-resveratrol, y tanto en forma libre como ligados a un residuo de glucosa mediante un enlace glucosídico. Numerosos estudios *in vitro* conceden al resvera-

El control de la capacidad inhibitoria tanto de la oxidación de las LDL como de la agregación de plaquetas y de la síntesis de eicosanoides. Incluso se ha sugerido tras estudios con ratones y cultivos celulares que el resveratrol podría tener efectos anticancerígenos. Durante los últimos años se han construido levaduras vínicas transgénicas que expresan genes que codifican enzimas capaces de mejorar el aroma de los vinos. Estas enzimas son glicosidasas capaces de romper los enlaces glicosídicos con los que una importante proporción de los terpenos provenientes de la uva están unidos a residuos de distintos azúcares. De esta forma, las glicosidasas liberan a los terpenos de su unión con los azúcares, estos compuestos quedan libres y, por tanto, pasan a formar parte de la fracción volátil del vino, con el consiguiente aumento del aroma floral y afrutado. De forma similar, los isómeros de resveratrol se encuentran conjugados a restos de glucosa, con lo que algunas de estas levaduras vínicas transgénicas también son capaces de aumentar los niveles de resveratrol en vino (González-Candelas *et al.*, 2000). Ahora bien, al hablar de alimentación y salud conviene ser prudente, y más cuando hablamos de una bebida alcohólica. En este sentido hay que resaltar que, a pesar de todos los estudios *in vitro* realizados con el resveratrol, todavía no han sido demostrados *in vivo* los efectos saludables que se le suponen.

Existen oligosacáridos como el fructano que parecen tener un efecto beneficioso si se ingieren asociados a un alimento, ya que mantienen la flora intestinal saludable. Tan sólo unos pocos alimentos contienen este tipo de azúcares, por lo que se hace necesario obtenerlos por vía enzimática, lo que dificulta y encarece su uso en las industrias agroalimentarias. Para solventar este problema se ha aislado un gen desde el genoma de la alcachofa de Jerusalén que codifica una fructosil transferasa que convierte la sacarosa en fructano. Dicho gen se ha expresado en plantas de remolacha rindiendo variedades transgénicas en las que el 40% de su peso seco son fructanos (Sévenier *et al.*, 1998). Por estrategias similares se ha logrado expresar en achicoria un gen proveniente del genoma de la cebolla que codifica una fructosil transferasa distinta que da lugar a la producción de inulina (Sévenier *et al.*, 2001). Estas plantas transgénicas no se han diseñado para ser consumidas en la dieta, sino como auténticas factorías celulares en las que producir estos nutracéuticos.

Muchos panaderos de nuestro país, al fabricar el pan, añaden la enzima amilasa en forma de polvo a la masa panaria. Con mucha frecuencia, dicho polvo se aspira y produce trastornos respiratorios pasajeros. En ocasiones, estos problemas van a más y dan lugar a alergias que pueden llegar a acarrear una baja laboral permanente. Para solventarlos se ha construido una levadura panadera transgénica que contiene el gen que codifica la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae*. Esta levadura transgénica es capaz de producir y secretar la enzima a la masa panaria durante la fermentación. Por lo tanto, al hacer pan con ella se puede evitar el empleo habitual de la enzima (Rán-

dez-Gil *et al.*, 1999). No es el único caso descrito de eliminación de problemas de alergenidad mediante el empleo de organismos transgénicos. Científicos japoneses han desarrollado mediante el uso de la técnica del antisentido arrocés transgénicos hipoalergénicos (Nakamura y Matsuda, 1996).

Un último apartado de este epígrafe lo merece la expresión en plantas o microorganismos transgénicos de proteínas o moléculas relacionadas con la salud. Se han construido muchos vegetales transgénicos que expresan proteínas de interés farmacológico en alguno de sus órganos (Whitelam, 1995; Herbers y Sonnewald, 1999; Larrick y Thomas, 2001). Entre todos estos desarrollos merecen ser destacados los que implican la producción de vegetales transgénicos que contienen los genes que codifican la seroalbúmina y la lactoferrina humanas, respectivamente, así como la expresión de proteínas de la leche humana en tejidos vegetales. En el primer caso se ha construido una patata transgénica que produce hasta 200 miligramos de seroalbúmina humana en cualquier parte de la planta (Sijmons *et al.*, 1990; Pen *et al.*, 1993a). En el segundo se ha generado una patata transgénica que contiene el gen que codifica la ferritina humana, de forma que el 0,1% de su proteína soluble es esta proteína humana con capacidad antimicrobiana (Chong *et al.*, 2000). Además, el gen que codifica dicha proteína en el genoma de la soja ha sido expresado en arroz y trigo para el desarrollo de fórmulas alimentarias infantiles (Drakakaki *et al.*, 2000). Con ese mismo objetivo se han expresado en variedades transgénicas de arroz los genes que codifican la lisozima y la α_1 -antitripsina humanas (Lønnerdal, 2002), y en patata la expresión de la β -caseína humana (Chong *et al.*, 1997). También se ha descrito por parte de algunos autores la construcción de plantas transgénicas de colza, patata o tabaco que expresan los genes de la eritropoyetina, la hirudina o la hormona de crecimiento humana (Larrick y Thomas, 2001). Finalmente, cabe destacar la construcción de diversas cepas transgénicas de la bacteria láctica *L. lactis* que contienen el gen que codifica la interleuquina-10 humana. Dicha bacteria se utiliza para producir un derivado lácteo, de forma que al ser ingerida actúa como probiótico y secreta la interleuquina-10 en el intestino. Dicha proteína actúa a nivel local mejorando la sintomatología de la colitis ulcerosa (Steidler *et al.*, 1998, 2000). Recientemente se ha validado un modelo de contención biológica para dicho sistema (Steidler *et al.*, 2003). Esfuerzos similares se están realizando en el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, si bien en este caso los resultados son todavía muy preliminares (Blanquet *et al.*, 2004).

VI.7. Vacunas orales

Existen otros usos de las plantas transgénicas que tienen interés sanitario. El de mayor relevancia social es la posibilidad de generar alimentos transgénicos que inmunicen

contra determinadas enfermedades al ingerirlos. Son las llamadas vacunas orales o comestibles (Swain, 1991; Moffat, 1995; Johnson, 1996; Wells *et al.*, 1996; Tacket y Mason, 1999; Langridge, 2000; Mercenier *et al.*, 2001; Korban *et al.*, 2002; Walmsley y Arntzen, 2003). Estos desarrollos se suelen dar en plantas transgénicas, aunque también existen resultados en animales de granja y en microorganismos responsables de la producción de alimentos y bebidas fermentados.

En el caso de los vegetales, lo que se persigue es introducir en el genoma de una variedad vegetal comestible un gen que codifique un determinado antígeno, de forma que, cuando se ingiere el alimento transgénico resultante, la presencia del antígeno como una proteína más de las muchas presentes en su composición debe ser capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria en la mucosa que genere anticuerpos secretores y active también una respuesta sistémica. Hasta la fecha se ha trabajado sobre todo en enfermedades que producen diarreas. Así, se han generado patatas transgénicas que contienen el gen que codifica la proteína de cubierta del virus Norwalk (Mason *et al.*, 1996) o expresan los genes que codifican la enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* (Mason *et al.*, 1998) o la subunidad B de la toxina colérica (Arakawa *et al.*, 1997, 1998). Estas vacunas orales en modelos animales son capaces de inmunizar al animal de experimentación frente a la infección por el virus Norwalk, *E. coli* o *Vibrio cholerae*, respectivamente. Algunos de estos desarrollos se han ensayado con éxito en voluntarios humanos (Tacket *et al.*, 1998, 2000) y recientemente se ha conseguido una patata transgénica que inmuniza a la vez a ratones contra la infección por *E. coli*, *V. cholerae* y rotavirus (Yu y Langridge, 2001). Existen otras vacunas orales en forma de plantas transgénicas que inmunizan contra diversas enfermedades. Por ejemplo, hay patatas transgénicas que inmunizan contra la infección por el virus de la hepatitis B (Richter *et al.*, 2000) o contra el virus de la bronquitis infecciosa (Zhou *et al.*, 2004), existen variedades transgénicas de soja que inmunizan contra el virus herpes simples 2 (Zeitlin *et al.*, 1998) o tomates transgénicos que inmunizan contra el virus sincitial respiratorio (Sandhu *et al.*, 2000).

En el caso de los microorganismos, se han construido bacterias ácido lácticas que contienen el gen que codifica el fragmento C de la toxina tetánica. Al ingerirlas como probióticos inmunizan a ratas contra el tétano (Robinson *et al.*, 1997; Maasen *et al.*, 1999). Como antes se indicó, la idea de futuro es generar derivados lácteos usando estas bacterias como iniciadores y tomar el queso o el yogur como un alimento que vacune (Pouwels *et al.*, 1998). En el caso de los animales de granja, se han generado ratones transgénicos que secretan en su leche un anticuerpo monoclonal capaz de inmunizar contra el coronavirus transmisor de la gastroenteritis (Castilla *et al.*, 1998). De esta forma, la madre al amamantar a sus crías las inmuniza contra dicha enfermedad.

Aunque recientemente se ha anunciado la creación de variedades transgénicas de arroz que vacunan contra la fiebre del heno o altramuces transgénicos que previenen contra el asma, es evidente que aún quedan muchas incógnitas por resolver en el estudio de las vacunas orales. Todavía no se sabe cuánta ingesta del alimento habrá que realizar para quedar correctamente inmunizado. Además, los desarrollos deberán llevarse a cabo en alimentos que sufran procesos culinarios suaves, para evitar la desnaturalización del antígeno, o se consuman en fresco. Por esta razón se pretende trasladar algunos de estos desarrollos a vegetales cuya ingesta es apetecible. Un buen ejemplo sería la banana, ya que se cultiva con facilidad en países tropicales y su sabor dulce resulta atractivo a los niños. Sin duda, sería un buen vehículo de inmunización en muchos países en desarrollo. Ahora bien, a pesar de todos estos problemas, poca gente duda que el desarrollo de vacunas orales presenta oportunidades de futuro con grandes dosis de trascendencia científica y social.

VI.8. Producción en la leche de animales transgénicos de proteínas de interés farmacológico

La glándula mamaria de las hembras de los mamíferos es el mejor reactor que existe en la naturaleza. La expresión de los seis genes que codifican las proteínas lácteas hace que una vaca lechera produzca 10.000 litros de leche por año y que cada litro de esa leche contenga 35 gramos de proteína. Tomando como punto de arranque estos datos de producción, desde hace varios años, diversos grupos de investigación han intentado usar las señales reguladoras de estos genes para producir altas cantidades de proteína en la leche de hembras de mamífero (Clark *et al.*, 1987; Van Brunt, 1988; Bialy, 1991; Colman, 1996; Velandar *et al.*, 1997; Whitelaw, 1999; Yang *et al.*, 2000; Sang, 2003). Para ello, los genes que codifican las proteínas exógenas que se desee expresar en leche deben introducirse en el animal bajo el control de una de estas secuencias. De esta forma se logra su expresión específica en la glándula mamaria y la proteína de interés se secreta a la leche, de donde podrá recuperarse. Con estas premisas basta con aislar un gen de interés, por ejemplo el gen que codifica el factor VIII de coagulación sanguínea humana, y colocarlo bajo el control del promotor del gen de la caseína o la lactoglobulina. A continuación, esta construcción se usará para crear un animal transgénico por cualquiera de los métodos existentes (Heanighausen, 1997). De este modo han sido creados distintos animales transgénicos que producen leches que contienen proteínas de alto valor añadido en concentraciones que oscilan desde unos pocos microgramos hasta 35 gramos de proteína por litro de leche. Por ejemplo, en modelos experimentales de ratas transgénicas se ha logrado la expresión específica

en glándula mamaria de los genes que codifican el activador del plasminógeno (Gordon *et al.*, 1987) o el fibrinógeno humano (Prunkard *et al.*, 1996) y un procolágeno recombinante (John *et al.*, 1999). También se han construido cabras transgénicas que producen en su leche el activador del plasminógeno humano (Denman *et al.*, 1991; Ebert *et al.*, 1991), cerdos transgénicos que hacen lo propio con el factor VIII antihemofílico humano (Paleyanda *et al.*, 1997), conejos transgénicos con leche enriquecida en calcitonina de salmón (McKee *et al.*, 1998) o interleuquina-2 humana (Bühler *et al.*, 1990), u ovejas transgénicas cuya leche contiene factor IX antihemofílico humano (Clark *et al.*, 1989). El uso de estas tecnologías se ha extendido de tal forma que, recientemente, una compañía argentina llamada Biosidus ha anunciado la generación de una vaca transgénica de la raza lechera Jersey que produce miligramos de hormona del crecimiento humano en su leche. Desde esa vaca transgénica, llamada Pampa Mansa, se han generado dos vacas clónicas que también producen el fármaco en su leche (<http://www.biosidus.ar>).

La glándula mamaria no es el único órgano de los animales de granja con posible utilidad biotecnológica como factoría de producción de proteínas de alto valor añadido. Existen referencias en la literatura sobre la posible expresión del gen proveniente del genoma humano que codifica el factor antihemofílico VIII en el pez modelo tilapia (MacLean, 2003). Además, el AgCenter de la Universidad de San Luis anunció hace apenas un año la construcción de gallinas transgénicas que producían proinsulina en sus huevos. Todos estos resultados son espectaculares, máxime cuando se producen proteínas cuyo coste en el mercado puede superar el millón de euros por gramo. Por ello se augura un futuro interesante para los animales de granja transgénicos que funcionan como biofactorías.

Pero, al margen de su interés comercial, estos avances tienen un enorme valor científico. Desde la nutrición pueden considerarse un paradigma, ya que indican que es posible variar la composición bioquímica de las leches de distintos mamíferos. Por eso se han generado ratones transgénicos que contienen el gen de la β -lactoglobulina de oveja y tienen una leche con composición bioquímica ligeramente distinta y más similar a la de la leche de rata (Simona *et al.*, 1987). Siguiendo una estrategia similar, científicos de PPL Therapeutics anunciaron hace unos años la construcción de vacas transgénicas con el gen de la α -lactoalbúmina humana y la posible generación de nuevas vacas transgénicas con versiones modificadas de dicho gen en las que se eliminaban los residuos de fenilalanina. Con ello se pretendía generar una vaca transgénica que produzca leche “humanizada” para fenilcetonúricos (Anónimo, 1997). También se han construido ratas transgénicas que expresan el gen de lactasa intestinal de este animal en la glándula mamaria. Estas ratas producen leche con reducciones del 50 al 85% en su contenido en lactosa sin cambios en la concentración de grasa o proteína en la le-

che producida (Jost *et al.*, 1999). Un desarrollo similar en ovejas o vacas implicaría la disponibilidad de leche para intolerantes a lactosa.

Como antes se mencionó con el caso de Pampa Mansa, la irrupción de las nuevas técnicas de clonación por transferencia de núcleos ha dado lugar a formas más eficaces de producir animales transgénicos. Con ello ha sido posible abordar cuestiones menos rentables como el enriquecimiento proteico de la leche con fines nutricionales. El 80% de la proteína de la leche es la fracción de caseínas, uno de los componentes más valiosos de la leche dado su valor nutricional. Dicha fracción está compuesta por cuatro proteínas denominadas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína, que se agregan en grandes micelas coloidales cuya estructura y estabilidad son responsables de las complejas propiedades físico-químicas de la leche. Así, cambios pequeños en las proporciones de los distintos tipos de caseínas originan cambios sustanciales en las propiedades funcionales de la leche. Una mayor concentración de caseína puede llevar asociada una mejora de las características de la leche. De entre los distintos tipos de caseína mencionados, la κ -caseína parece tener una mayor importancia en la estabilidad de las micelas debido a que es la que se encuentra en el revestimiento exterior. Por ello se supone que aumentos en la cantidad de κ -caseína se asocian a una disminución del tamaño de las micelas y una mejora de la estabilidad térmica y de las propiedades de la leche en la fabricación del queso. Por otro lado, la β -caseína se encuentra en el interior de las micelas. Su aumento se ha relacionado con mejoras en las propiedades de procesado, ya que se reduce el tiempo de formación de la cuajada y se incrementa la expulsión de suero. Todas estas hipótesis han sido confirmadas mediante la técnica de transferencia de núcleos, que ha permitido generar vacas transgénicas con niveles aumentados de β -caseína y κ -caseína (Brophy *et al.*, 2003; Karatzas, 2003).

VI.9. El futuro

Nos encontramos frente a los primeros alimentos funcionales transgénicos, aunque ninguno de ellos ha obtenido en la actualidad el permiso para su comercialización. Como en el resto de alimentos transgénicos, la legislación impone varios años de investigación para demostrar la falta de riesgos sanitarios y medioambientales y obtener el permiso de comercialización de estos productos. Además, en la Unión Europea deberán etiquetarse.

A pesar de considerar que estamos al principio de un largo camino, la gran utilidad de alguno de estos desarrollos abre la puerta a la esperanza de un futuro con alternativas transgénicas destinadas a mejorar la nutrición y la salud del consumidor. Muchas de ellas sólo son abordables por ingeniería genética. Es imposible conseguir por genética

convencional una cabra que produzca leche con el activador del plasminógeno humano, como lo es obtener una bacteria ácido láctica que inmunice contra el tetano, pero estos desarrollos ya han sido abordados por transgenia.

No obstante, conviene no crear falsas expectativas. Con más frecuencia de la necesaria, en ocasiones en la boca de algunos políticos poco prudentes, se oye decir que los alimentos transgénicos acabarán con el problema del hambre en el mundo. Nada más lejos de la realidad. Como se ha indicado en múltiples ocasiones, este drama, el principal drama de la alimentación mundial, ya tiene solución actual mediante un reparto correcto de los excedentes alimentarios, por lo que los transgénicos no son la solución. Tan sólo medidas políticas y sociales adecuadas, unidas a la generosidad de los países ricos, podrán acabar con este problema. Ahora bien, sí que es posible pensar en el diseño de alimentos transgénicos que puedan ayudar a resolver problemas importantes ligados a la solución de déficits nutricionales, sobre todo en países del Tercer Mundo. De hecho, ya existen ejemplos al respecto como el arroz dorado. De la misma forma es posible pensar que, en un futuro cercano, se desarrollarán alimentos transgénicos capaces de ayudar a enfermos fenilcetonúricos o celíacos. Pero para lograrlo será necesaria una inversión fuerte en investigación y evaluación, tanto pública como privada. Aun con todos estos problemas, la búsqueda de alimentos transgénicos funcionales será una de las parcelas más activas y atractivas del futuro en ciencia y tecnología de los alimentos.

VI.10. Bibliografía

Agius, F.; González-Lamothe, R.; Caballero, J. L.; Muñoz-Blanco, J.; Botella, M. A., y Valpuesta, V.

(2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnol.* 21, 177-181.

Altenbach, S. B., y Simpson, R. B.

(1990) Manipulation of methionine-rich protein genes in plant seeds. *Trends Biochem.* 8, 156-160.

Anónimo

(1997) Got milk? Not like PPL's new variety. *Nature Biotechnol.* 15, 204.

Arakawa, T.; Chong, D. K. X., y Langridge, W. H. R.

(1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol.* 16, 292-297.

- Arakawa, T.; Chong, D. K. X.; Merritt, J. L., y Langridge, W. H. R.
(1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res.* 6, 403-413.
- Beyer, P.; Al-Babili, S.; Ye, X.; Lucca, P.; Schaub, P.; Welsch, R., y Potrykus I.
(2002) Golden rice: introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *Abstracts del Symposium Plant Breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition*, pp. 506S-510S.
- Bialy, H.
(1991) Transgenic pharming comes of age. *Bio/technology* 9, 786-787.
- Blanquet, S.; Antonelli, R.; Laforet, L.; Denis, S.; Marol-Bonnin, S., y Alric M.
(2004) Living recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut. *J. Biotechnol.* 110, 37-49.
- Bouis, H. E.; Chassy, B. M., y Ochanda, J. O.
(2003) Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 191-209.
- Brophy, B.; Smolenski, G.; Wheeler, T.; Wells, D.; L'Huillier, P., y Laible, G.
(2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein. *Nature Biotechnol.* 21, 157-161.
- Bühler, T. A.; Bruyère, T.; Went, D. F.; Stranzinger, G., y Bürki, K.
(1990) Rabbit β -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Bio/technology* 8, 140-143.
- Cahoon, E. B.; Hall, S. E.; Ripp, K. G.; Ganzke, T. S.; Hitz, W. D., y Coughlan, S. J.
(2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnol.* 21, 1082-1087.
- Castilla, J.; Pintado, B.; Sousé, I.; Sánchez-Morgado, M., y Enjuanes, L.
Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nature Biotechnol.* 16, 349-354.

Chakraborty, S.; Chakraborty, N., y Datta, A.

(2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3724-3729.

Chong, D. K. X., y Langridge, W. H. R.

(2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Res. 9, 71-78.

Chong, D. K. X.; Roberts, W.; Arakawa, T.; Illes, K.; Bagi, G.; Slattery, C. W., y Langridge, W. H. R.

(1997) Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato. Transgenic Res. 6, 289-296.

Clark, A. J.; Bessos, H.; Bishop, J. O.; Brown, P.; Harris, S.; Lathe, R.; McClenaghan, M.; Prowse, C.; Simons, J. P.; Whitelaw, C. B. A., y Wilmut, I.

(1989) Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. Bio/technology 7, 487-492.

Clark, A. J.; Simons, P.; Wilmut, I., y Lathe, R.

(1987) Pharmaceuticals from transgenic livestock. Trends Biotechnol. 5, 20-24.

Colman, A.

(1996) Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. Am. J. Clin. Nutr. 63, 639S-645S.

Comai, L.

(1993) Impact of plant genetic engineering on foods and nutrition. Ann. Rev. Nutr. 15, 191-215.

De Clercq, A.; Vandewiele, M.; Van Damme, J.; Guerche, P.;

Van Montagu, M.; Vandekerckove, J., y Krebbers, E.

(1990) Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. Plant. Physiol. 94, 970-979.

Denman, J.; Hayes, M.; O'Day, C.; Edmunds, T.; Bartlett, C.; Hirani, S.;

Ebert, K. M.; Gordon, K., y McPherson, J. M.

(1991) Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. Bio/technology 9, 839-843.

Díaz de la Garza, R.; Quinlivan, E. P.; Klaus, S. M. J.; Basset, G. J. C.; Gregory III, J. F., y Hanson, A. D.

(2004) Folate biofortification in tomatoes by genetic engineering the pteridine branch of folate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13720-13725.

Dörmann, P.

(2003) Corn with enhanced antioxidant potential. *Nature Biotechnol.* 21, 1015-1016.

Drakakaki, G.; Christou, P., y Stoger, E.

(2000) Constitutive expression of soybean ferritin cDNA in transgenic wheat and rice results in increased iron levels in vegetative tissues but not in seeds. *Transgenic Res.* 9, 445-452.

Ebert, K. M.; Selgrath, J. P.; DiTullio, P.; Denman, J.; Smith, T. E.; Memon, M. A.; Schindler, J. E.; Monastersky, G. M.; Vitale, J. A., y Gordon, K.

(1991) Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/technology* 9, 835-838.

Facciotti, M. T.; Bertain, P. B., y Yuan, L.

(1999) Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nature Biotechnol.* 17, 593-597.

Forkmann, G., y Martens, S.

(2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 155-160.

Fraser, P. D.; Römer, S.; Kiano, J. W.; Shipt, C. A.; Mills, P. B.; Drake, R.; Schuch, W., y Bramley, P. M.

(2001) Elevation of carotenoids in tomato by genetic engineering. *J. Sci. Food Agric.* 81, 822-827.

Goff, S. A., y Salmeron, J. M.

(2004) Mejora genética de cereales. *Investigación y Ciencia* 337, 6-13.

González-Candelas, L.; Gil, J. V.; Lamuela-Raventós, R. M., y Ramón, D.

(2000) The use of transgenic yeasts expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 179-183.

Gordon, K.; Lee, E.; Vitale, J. A.; Smith, A. E.; Westphal, H.,
y Hennighausen, L.

(1987) Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/technology* 5, 1183-1187.

Goto, F.; Yoshihara, T.; Shigemoto, N.; Toki, S., y Takaiwa, F.

(1999) Iron fortification of rice by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnol.* 17, 282-286.

Grusak, M. A.

(2002) Phytochemicals in plants: genomics-assisted plant improvement for nutritional and health benefits. *Curr. Op. Biotechnol.* 13, 508-511.

Harlander, S. K.

(2002) The evolution of modern agriculture and its future with biotechnology. *J. Am. College Nutr.* 21, 161S-165S.

Heanighausen, L.

(1997) Transgenic factor VIII: the milk way and beyond. *Nature Biotechnol.* 15, 945-946.

Herbers, K., y Sonnewald, U.

(1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr. Op. Biotechnol.* 10, 163-168.

Hildebrand, D. F.

(1992) Altering fatty acid metabolism in plants. *Food Technol.* vol. 46, 71-74.

Hugenholtz, J.; Sybesma, W.; Groot, M. N.; Wisselink, W.; Ladero, V.;

Burgess, K.; Van Sinderen, D.; Piard, J. C.; Eggink, G.; Smid, E. J.;

Savoy, G.; Sesma, F.; Jansen, T.; Hols, P., y Kleerebezem, M.

(2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 217-235.

Jalani, B. S.; Cheah, S. C.; Rajanaidu, N., y Darus, A.

(1997) Improvement of palm oil through breeding and biotechnology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1451-1455.

John, D. C. A.; Watson, R.; Kind, A. J.; Scott, A. R.; Kadler, K. E.,
y Bulleid, N. J.

(1999) Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nature Biotechnol.* 17, 385-389.

Johnson, E.

(1996) Edible plant vaccines. *Nature Biotechnol.* 14, 1532-1533.

Jost, B.; Vilotte, J. L.; Duluc, I.; Rodeau, J. L., y Freund, J. N.

(1999) Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nature Biotechnol.* 17, 160-164.

Jung, W.; Yu, O.; Lau, S. M. C.; O'Keefe, D. P. O.; Odell, J.; Fader, G., y McGonigle, B.

(2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnol.* 18, 208-212.

Kang, J. X.; Wang, J.; Wu, L., y Kang, Z. B.

(2004) Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 427, 698.

Karatzas, C. N.

(2003) Designer milk from transgenic clones. *Nature Biotechnol.* 21, 138-139.

King, J. C.

(2002) Biotechnology: a solution for improving nutrient bioavailability. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72, 7-12.

Kinney, A. J.

(1994) Genetic modification of the storage lipids of plants. *Curr. Op. Biotechnol.* 5, 144-151.

(1996) Designer oils for better nutrition. *Nature Biotechnol.* 14, 946.

Korban, S. S.; Krasnyanski, S. F., y Buetow, D. E.

(2002) Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *J. Am. College Nutr.* 21, 212S-217S.

Knutzon, D. S.; Thompson, G. A.; Radke, S. E.; Johnson, W. B.;

Knauf, V. C., y Kridl, J. C.

(1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl-carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2624-2628.

Larrick, J. W., y Thomas, D. W.

(2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 411-418.

Langridge, W. H. R.

(2000) Vacunas comestibles. *Investigación y Ciencia* 290, 57-63.

Liu, Q.; Singh, S., y Green, A.

(2002) High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *J. Am. College Nutr.* 21, 205S-211S.

Lönnerdal, B.

(2002) Expression of human milk proteins in plants. *J. Am. College Nutr.* 21, 218S-221S.

Lucca, P.; Hurrell, R., y Potrykus, I.

(2001a) Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *J. Sci. Food Agric.* 81, 828-834.

(2001b) Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.* 102, 392-397.

(2002) Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J. Am. College Nutr.* 21, 184S-190S.

Maasen, C. B. M.; Laman, J. D.; Den Bak-Glashouwer, M. J. H.; Tielen, F. J.; Van Holten-Neelen, J. C. P. A.; Hoogteijling, L.; Antonissen, C.; Leer, R. J.; Pouwels, P. H.; Boersma, W. J. A., y Shaw, D. M.

(1999) Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 17, 2117-2128.

Mackey, M. A.

(2002) The application of biotechnology to nutrition: an overview. *J. Am. College Nutr.* 21, 157S-160S.

Mackey, M. A., y Fuchs, R. L.

(2002) Plant biotechnology products with direct consumer benefits. En: Thomas, J. A., y Fuchs, R. L., editores. *Biotechnology and safety assessment*. Orlando: Academic Press, pp. 117-142.

MacLean, N.

(2003) Genetically modified fish and their effects on food quality and human health and nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 242-252.

Mason, H. S.; Ball, J. M.; Shi, J. J.; Estes, M. K., y Arntzen, C. J.

(1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5335-5340.

Mason, H. S.; Haq, T. A.; Clements, J. D., y Arntzen, C. J.

(1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16, 1336-1343.

McKee, C.; Gibson, A.; Dalrymple, M.; Emslie, L.; Garner, I., y Cottingham, I.

(1998) Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. *Nature Biotechnol.* 16, 647-651.

Mercenier, A.; Wiederman, U., y Breiteneder, H.

(2001) Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health. *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 510-515.

Moffat, A. S.

(1995) Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science* 268, 658-660.

Muir, S. R.; Collins, G. F.; Robinson, S.; Hughes, S.; Bovy, A.; De Vos, C. H. R.; Van Tunen, A. J., y Verhoeye, M. E.

(2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnol.* 19, 470-474.

Murray-Kolb, L. E.; Takaiwa, F.; Goto, F.; Yoshihara, T.; Theil, E. C., y Berad, J. L.

(2002) Transgenic rice is a source of iron for iron-depleted rats. *J. Nutr.* 132, 957-960.

Nakamura, R., y Matsuda, T.

(1996) Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1215-1221.

Niggeweg, R.; Michael, A. J., y Martin, C.

(2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnol.* 22, 746-754.

Paleyanda, R. K.; Velandar, W. H.; Lee, T. K.; Scandella, D. H.; Gwazdauskas, F. C.; Knight, J. W.; Hoyer, L. W.; Drohan, W. N., y Lubon, H.

(1997) Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nature Biotechnol.* 15, 971-975.

Pen, J.; Sijmons, P. C.; Van Ooijen, A. J. J., y Hoekema, A.

(1993a) Protein production in transgenic crops: analysis of plant molecular farming. En: Hiatt, A., editor. *Transgenic plants: fundamentals and applications*. Nueva York: Marcel Dekker Inc., pp. 239-251.

Pen, J.; Verwoerd, T. C.; Van Paridon, P. A.; Beudeker, R. F.;

Van den Elzen, P. J. M.; Geerse, K.; Van der Klis, J. D.; Versteegh, H. A. J.;

Van Ooyen, A. J. J., y Hoekema, A.

(1993b) Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Nature Biotechnol.* 11, 811-814.

Potrykus, I.

(2001) Golden rice and beyond. *Plant. Physiol.* 125, 1157-1161.

Pouwels, P. H.; Leer, R. J.; Shaw, M.; Den Bak-Glashouwer, M. J. H.;

Tielen, F. D.; Smit, E.; Martínez, B.; Jore, J., y Conway, P. L.

(1998) Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 155-167.

Prunkard, D.; Cottingham, I.; Garner, I.; Bruce, S.; Dalrymple, M.;

Lasser, G.; Bishop, P., y Foster, D.

(1996) High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. *Nature Biotechnol.* 14, 867-871.

Qi, B.; Fraser, T.; Mugdorf, S.; Dobson, G.; Sayanova, O.; Butler, J.;

Napier, J. A.; Stobart, A. K., y Lazarus, C. M.

(2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnol.* 22, 739-745.

Ramón, D.

(1999) *Los genes que comemos*. Ed. Algar, Alzira.

(2004) Presente y futuro de los alimentos transgénicos. *Sistema* 179-180, 31-40.

Rández-Gil, F.; Sanz, P., y Prieto, J. A.

(1999) Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.* 17, 237-244.

Richter, L. J.; Thanavala, Y.; Arntzen, C. J., y Mason, H. S.

(2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnol.* 18, 1167-1171.

Roberfroid, M. B.

(2002) Aliments fonctionelles: définitions, concepts et stratégies. En Aliments fonctionelles. Paris: Ed. Tec & Doc, pp. 1-17.

Robinson, K.; Chamberlain, L. M.; Schofield, K. M.; Wells, J. M.,
y LePage, R. W. F.

(1997) Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. Nature Biotechnol. 15, 653-657.

Rocheford, T. R.; Wong, J. C. W.; Egesel, C. O., y Lambert, R. J.

(2002) Enhancement of vitamin E levels in corn. J. Am. College Nutr. 21, 191S-198S.

Römer, S.; Fraser, P. D.; Kiano, J. W.; Shipton, C. A.; Misawa, N.;
Schuch, W., y Bramley, P. M.

(2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. Nature Biotechnol. 18, 666-669.

Sandhu, J. S.; Krasnyanski, S. F.; Domier, L. L.; Korban, S. S.;
Osadjan, M. D., y Buetow, D. E.

(2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. Transgenic Res. 9, 127-135.

Sang, H.

(2003) Genetically modified livestock and poultry and their potential effects on human health and nutrition. Trends Food Sci. Technol. 14, 253-263.

Sévenier, R.; Hall, R. D.; Van der Meer, I. M.; Hakkert, H. J. C.;
Van Tunen, A. J., y Koops, A. J.

(1998) High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. Nature Biotechnol. 16, 843-846.

Sévenier, R.; Van der Meer, I. M.; Bino, R., y Koops, A. J.

(2002). Increased production of nutriment by genetically engineered crops. J. Am. College Nutr. 21, 199S-204S.

Sijmons, P. C.; Dekker, B. M. M.; Schrammeijer, B.; Verwoerd, T.;
Van den Elzen, P. J. M., y Hoekema, A.

(1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Bio/technology 8, 217-221.

Simons, J. P.; McClenaghan, M., y Clarkm, A. J.

(1987) Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 328, 530-532.

Shintani, D., y Della Penna, D.

(1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* 282, 2098-2100.

Steidler, L.; Neiryck, S.; Huyghebaert, N.; Snoeck, V.; Vermeire, A.; Godderis, B.; Cox, E.; Remon, J. P., y Remaut, E.

(2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nature Biotechnol.* 21, 785-789.

Steidler, L.; Robinson, K.; Chamberlain, L.; Schofield, K. M.; Remalt, E.; LePage, R. W., y Wells, J. M.

(1998) Mucosal delivery of murine interleukin 2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.* 66, 3183-3189.

Steidler, L.; Schotte, H. W.; Neiryck, S.; Obermeier, F.; Falk, W.; Fiers, W., y Remaut, E.

(2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 1352-1355.

Swain, W. F.

(1991) Antibodies in plants. *Trends Biotechnol.* 9, 107-109.

Sybesma, W.; Starrenburg, M.; Kleerebezem, M.; Mierau, I.; De Vos, W. M., y Hügenholtz J.

(2003) Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3069-3076.

Tacket, C. O.; Mason, H. S.; Losonsky, G.; Clements, J. D.; Levine, M. M., y Arntzen, C. J.

(1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Med.* 4, 607-609.

Tacket, C. O., y Mason, H. S.

(1999) A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microb. Infect.* 1, 777-783.

Tacket, C. O.; Mason, H. S.; Losonsky, G.; Estes, M. K.; Levine, M. M.,
y Arntzen, C. J.

(2000) Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* 182, 302-305.

Tucker, G.

(2003) Nutritional enhancement of plants. *Curr. Op. Biotechnol.* 14, 221-225.

Van Brunt, J.

(1988) Molecular farming: transgenic animals as bioreactors. *Bio/technology* 6, 1149-1154.

Velander, W. H.; Lubon, H., y Drohan, W. N.

(1997) Producción de fármacos a través de animales transgénicos. *Investigación y Ciencia* 246, 46-51.

Walmsley, A. M., y Arntzen, C. J.

(2003) Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr. Op. Biotechnol.* 14, 145-150.

Wells, J. M.; Robinson, K.; Chamberlain, L. M.; Schofield, K. M.,
y Le Page, R. W. F.

(1996) Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 317-330.

Whitelaw, B.

(1999) Toward designer milk. *Nature Biotechnol.* 17, 135-136.

Whitelam, G. C.

(1995) The production of recombinant proteins in plants. *J. Sci. Food Agric.* 68, 1-9.

Yang, X.; Tian, X. C.; Dai, Y., y Wang, B.

(2000) Transgenic farm animals: applications in agriculture and biomedicine. *Biotechnol. Ann. Rev.* 5, 269-292.

Ye, X.; Al-Babili, S.; Klöti, A.; Zhang, J.; Lucca, P.; Beyer, P.,
y Potrykus, I.

(2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287, 303-305.

Yu, J., y Langridge, H. R.

(2001) A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnol.* 19, 548-552.

Zeitlin, L.; Olmsted, S. S.; Moench, T. R.; Co, M. S.; Martinell, B.; Paradkar, V. M.; Russell, D. R.; Queen, C.; Cone, R. A., y Whaley, K. J.

(1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnol.* 16, 1361-1364.

Zhou, J. Y.; Cheng, L. Q.; Zheng, X. J.; Wu, J. X.; Shang, S. B.; Wang, J. Y., y Chen, J. G.

(2004) Generation of the transgenic potato expressing full-length spike protein of infectious bronchitis virus. *J. Biotechnol.* 111, 121-130.

Zheng, Z.; Sumi, K.; Tanaka, K., y Murai, N.

(1995) The bean seed storage β -phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type-II protein bodies of transgenic rice endosperm. *Plan. Physiol.* 109, 777-786.

Zimmermann, M. B., y Hurrell, R. F.

(2002) Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. *Curr. Op. Biotechnol.* 13, 142-145.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



FECYT

www.fecyt.es