



El CSIC investiga las semillas de uva y las hojas de olivo por sus propiedades bioactivas frente a la bacteria *H. pylori*

Los subproductos obtenidos del proceso de elaboración del vino y del aceite de oliva, dos de los principales productos de la industria alimentaria española, son ricos en diversos compuestos bioactivos que han demostrado ser eficaces frente a diferentes patógenos humanos. Entre esos patógenos, se encuentra la *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), una bacteria identificada como un factor de riesgo potencial para gastritis, úlceras y cáncer gástricos. La resistencia a los antibióticos de algunas cepas de *H. pylori* hace necesario el uso de alternativas terapéuticas. El grupo MICROBIO del CSIC lo investiga desde hace años y nos adelanta sus principales conclusiones.

La bacteria *H. pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población mundial, se adquiere durante la infancia y puede permanecer de por vida. En la mayoría de las personas se origina de forma asintomática, si bien a largo plazo puede causar una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde la gastritis crónica activa a la úlcera péptica y al cáncer gástrico. Además de la patología gástrica, esta bacteria está asociada con varias patologías extragástricas, como enfermedades cardiovasculares, dermatológicas, autoinmunes y hematológicas. Concretamente en el sistema digestivo, la infección por *H. pylori* puede conducir al desarrollo de otras afecciones, como el tejido linfoide asociado a las mucosas, cálculos biliares, enfermedad del hígado graso no alcohólico, carcinoma hepatocelular y pancreatitis aguda.

En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó a la *H. pylori* como carcinógeno tipo I, que es el mismo grupo en el que se encuentra el tabaco, constituyendo la causa infecciosa oncológica más importante en todo el mundo, con 810.000 casos de cáncer atribuibles en 2018.

La terapia de erradicación basada en dos antibióticos contra *H. pylori* se ha utilizado principalmente en pacientes sintomáticos, ya que está asociada con efectos adversos, como un mayor riesgo de reflujo gastroesofágico. El tratamiento antibiótico se está topando con la aparición de cepas resistentes al mismo, lo cual se ha convertido en un serio desafío en todo el mundo, por lo que existe un interés creciente en el uso de alternativas terapéuticas.

Fuentes potenciales de antioxidantes

Entre ellas, se sitúan en primera línea los compuestos bioactivos de componentes alimentarios, con el objetivo de disminuir la elevada carga antibiótica de la mayor parte de los tratamientos actuales y constituir una alternativa para el 20% de personas infectadas con síntomas (140 millones de personas en todo el mundo), para las cuales los antibióticos resultan ineficaces, contribuyendo, por tanto, a la mejora de la salud humana.

Las semillas de uva y las hojas de olivo son ricas en diferentes compuestos fenólicos a los que se asocia una serie de propiedades bioactivas científicamente probadas, principalmente anti-inflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas. Además, constituyen dos de los principales productos de la industria alimentaria española, con la consiguiente generación de

La bacteria *H. pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población mundial, se adquiere durante la infancia y puede permanecer de por vida

grandes cantidades de residuos y subproductos. En el caso del cultivo del olivo y la elaboración del aceite de oliva, las aguas residuales de almazara, orujos de aceituna y hojas representan un importante problema ambiental cuando no son procesadas correctamente, debido principalmente a su alto contenido orgánico y fitotoxicidad.

Estos subproductos todavía contienen altas cantidades de compuestos bioactivos que deben ser considerados como fuentes potenciales de bajo costo de antioxidantes y carbohidratos. Las semillas de uvas y las hojas de olivo son ricas en diferentes compuestos fenólicos que están involucrados en las respuestas bioactivas frente a *H. pylori* y son un excelente punto de partida para la obtención de extractos enriquecidos en estos compuestos bioactivos. Estas características confieren a estos extractos una enorme potencialidad como herramientas para modular la respuesta inflamatoria frente a la infección por *H. pylori* y, por tanto, dificultar la progresión de la infección a estadios más avanzados y lesivos.

Por ello, el Grupo de Microbiología y Biocatálisis (MICROBIO) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha creado, gracias a la concesión del Proyecto HELIFOOD en el año 2018 por parte del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, un equipo multidisciplinar para investigar la eficacia potencial de estos extractos en el tratamiento de la infección por *H. pylori*. El equipo lo forman investigadores del CSIC y de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), todos pertenecientes al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), que es un Centro Mixto CSIC-UAM, y también participan investigadores del Hospital Universitario de La Princesa (Madrid).

Restaurando el equilibrio en la microbiota

El doctor **Adolfo Martínez**, director del Grupo MICROBIO, explica que *“el empleo de extractos bioactivos obtenidos a partir de ingredientes y subproductos alimentarios frente a *H. pylori*, aunque no dispongan del poder erradicador de los antibióticos, podría contribuir a restaurar el equilibrio patógeno-huésped-microbiota, evitando la progresión de síntomas a patologías más graves como el cáncer gástrico”*. Además, el científico cree que *“esto constituye una alternativa de gran interés potencial, ya sea directamente para su uso como complemento a la terapia con antibióticos o como alternativa en aquellos casos en los que estas resulten ineficaces, o incluso en personas diagnosticadas asintomáticas, en las que muchas veces una terapia antibiótica no parece el enfoque más adecuado”*.

Algunos de los compuestos fenólicos presentes en la semilla de uva han mostrado una relevante actividad anti-inflamatoria y antioxidante frente a la infección por *H. pylori*. El Dr. Martínez y su equipo han utilizado en sus modelos experimentales células humanas de estómago, infectándolas con distintas cepas de *H. pylori*, con diferentes atributos de virulencia. Como consecuencia de esta infección, se produce una respuesta oxidativa e inflamatoria en las células de estómago, que depende de las características y virulencia de la cepa de *H. pylori*. Martínez explica que *“al tratar estas células infectadas con los extractos en estudio, hemos observado que son capaces de disminuir en*

El Grupo MICROBIO, al servicio de la investigación alimentaria

El Grupo de Microbiología y Biocatálisis de Alimentos desarrolla sus investigaciones en el Departamento de Biotecnología y Microbiología del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) del CSIC. Es un grupo multidisciplinar que reúne a ocho investigadores con una amplia experiencia en el área de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Dirigidos por el doctor Adolfo J. Martínez Rodríguez, llevan a cabo investigaciones dentro del área de la Microbiología y la Biotecnología de Alimentos.

El Grupo MICROBIO desarrolla sus investigaciones en el campo de la Microbiología de Alimentos y de la Biotecnología Enzimática, siguiendo un enfoque multidisciplinar que explora diferentes formas de abordar la mejora en la calidad y seguridad de los alimentos como elemento esencial en la salud humana. En concreto, el departamento al que pertenece mantiene líneas de investigación en seguridad alimentaria, biotecnología microbiana y biotecnología enzimática. Las líneas de investigación actualmente en marcha son:

Revalorización de subproductos de la industria alimentaria como fuente de compuestos bioactivos útiles para la mitigación de la infección humana por *Helicobacter pylori*

Nuevas estrategias para el control de *Campylobacter* spp., principal patógeno bacteriano asociado a los alimentos

Ingeniería de procesos enzimáticos en solvent-free systems. Síntesis de fosfolípidos estructurados de ácido docosahexaenoico para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Detección y eliminación de aminas biógenas en alimentos: diseño de nuevos biosensores y nuevos catalizadores de amino oxidasas

Cuenta con 170 publicaciones y 8 patentes.

un rango entre 17-84% y 22-95% la respuesta oxidativa y la respuesta inflamatoria asociada a la infección. Este es un resultado muy interesante, tomando en cuenta que la respuesta oxidativa contribuye a la respuesta inflamatoria, y cuando esta respuesta inflamatoria se hace crónica y descontrolada, es una de las causas fundamentales del daño tisular y del progreso de las patologías asociadas a la infección por H. pylori”.

Esta respuesta está también muy relacionada con la composición de los extractos. Por eso, una parte importante del trabajo ha consistido en establecer una relación estructura-función de los extractos más activos, con el objetivo de identificar los compuestos que se encuentran más relacionados con la respuesta anti-inflamatoria y antioxidante y, de este modo, poder enriquecer los extractos en estos compuestos más activos. Según las conclusiones de esta investigación, ambos extractos han presentado también actividad antibacteriana frente a *H. pylori*, actividad también relacionada con la composición en compuestos fenólicos de los extractos y con la cepa bacteriana analizada.

Eficacia en cualquier grado de virulencia

El estudio Pre-Treatment with Grape Seed Extract Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress Induced by Helicobacter pylori Infection in Human Gastric Epithelial Cells, liderado por el doctor José Manuel Silván, concluyó que el extracto de semilla de uva y sus fracciones demuestran actividad

antibacteriana contra todas las cepas de *H. pylori* utilizadas en el trabajo, lo cual demuestra la eficacia de este extracto enriquecido en procianidinas frente a los principales eventos asociados a la infección por *H. pylori*. El extracto de semilla de uva pudo reducir significativamente la inflamación y el daño oxidativo en el estómago infectado con *H. pylori*, siendo también eficaz como antimicrobiano. Esta eficacia se observó independientemente del grado de virulencia y el perfil de resistencia a los antibióticos de las cepas examinadas.

El extracto de semilla de uva provocó una reducción de más del 50% en la producción de interleucina-8 (IL-8), la principal citocina liberada por las células epiteliales gástricas durante la inflamación gástrica, independientemente de la cepa infecciosa. Según este estudio, fenoles como el galato de epicatequina han

mostrado una fuerte actividad inhibitoria contra la producción de IL-8. La secreción de IL-8 suele estar regulada por el factor de transcripción NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), y se sabe que *H. pylori* induce la expresión de IL-8 mediante la activación de la vía NF-κB en las células epiteliales gástricas. Dado que el galato de epicatequina y algunas procianidinas presentes en el extracto de semilla de uva son inhibidores de NF-κB, su efecto supresor sobre la secreción de IL-8 puede correlacionarse con su actividad inhibitoria de NF-κB.

La regulación positiva de IL-8 por *H. pylori* puede conducir a la generación de radicales libres y la liberación de enzimas proteolíticas de los neutrófilos activados, afectando así la integridad de la mucosa. Esto es consecuencia de la inducción de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en células epiteliales gástricas después de la exposición a cepas de *H. pylori*. La producción de ROS proinflamatorias como mecanismo de defensa esencial contra la invasión bacteriana puede eventualmente volverse dañina para el huésped debido al daño tisular y la inflamación mediada. En este estudio, el extracto de semilla de uva redujo la producción intracelular de ROS en las células epiteliales del estómago, lo que contribuyó a la modulación del daño epitelial. Además, el extracto de semilla de uva actuó como un potente agente antimicrobiano contra todas las cepas de *H. pylori* testa-

das, si bien la fracción enriquecida en procianidinas de alto peso molecular mostró la mayor actividad antimicrobiana.

Gran diversidad de metabolitos secundarios

Las hojas de los olivos se han utilizado ampliamente como medicina popular durante muchos siglos. La presencia de una gran diversidad de metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos y secoiridoides, ha provocado gran interés en sectores industriales y científicos. La composición del metabolito secundario varía según la especie del olivo, el cultivo, el clima, las condiciones de almacenamiento, etc. Entre ellos, los compuestos fenólicos más abundantes son la oleuropeína e hidroxitirosol. Otros compuestos relevantes presentes en las hojas de olivo son algunos secoiridoides (ácidos elenólico y demetilelenólico y sus formas glucosídicas); flavonas (luteolina, luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, diosmetina y diosmetina-7-glucósido); flavonoles (rutina y kaempferol); flavan-3-oles (catequina) y ácidos fenólicos (tirosoles, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cinámico y ácido vainílico).

El Grupo MICROBIO ha publicado el estudio Olive-leaf extracts modulate inflammation and oxidative stress associated with human *H. pylori* infection, donde se describe el efecto beneficioso de dos extractos de la hoja de olivo frente a la inflamación y estrés oxidativo producidos durante la infección por *H. pylori*. Los resultados obtenidos mostraron que ambos extractos redujeron significativamente la secreción de IL-8 y la producción de ROS en células epiteliales gástricas humanas. Ambos extractos también mostraron actividad antibacteriana contra diferentes cepas de *H. pylori*. El extracto E1 estaba compuesto principalmente por compuestos altamente hidrofílicos, como el hidroxitirosol y sus glucósidos, y fue el más eficaz como agente antibacteriano. Por su parte, el E2 estaba constituido principalmente de compuestos moderadamente hidrofílicos, como la oleuropeína, siendo más eficiente que el E1 como agente antiinflamatorio.

El hidroxitirosol se ha asociado con una fuerte actividad antioxidante por su capacidad para actuar como un eliminador de radicales libres y quelante de metales, aumentando también los sistemas de defensa endógenos frente al estrés oxidativo.

“Hemos definido la fase de investigación actual y el estado de madurez tecnológica de este trabajo con un TLR de 4, correspondiente con una tecnología comprobada y validada en el laboratorio”

La oleuropeína también ha exhibido efectos antiinflamatorios y antioxidantes, tanto in vitro como in vivo, a bajas concentraciones. Estos interesantes efectos farmacológicos se atribuyen principalmente a su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno y para inhibir las funciones proinflamatorias de los neutrófilos. Además, la actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ha sido reportada para hojas de olivo, y estos resultados se han correlacionado con la presencia de compuestos fenólicos, como la oleuropeína y el hidroxitirosol. Ambos extractos exhibieron similar potencial para disminuir la producción de ROS. Estos resultados muestran la importancia de estandarizar la composición del extracto de acuerdo con las propiedades bioactivas que se debe potenciar. De esta forma, los extractos de hoja de olivo puede ser una herramienta de gran potencial en la modulación de los efectos patogénicos producidos por *H. pylori*. Esta posible aplicación también puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de valorización de los subproductos del olivo para conseguir un aprovechamiento sostenible de estos residuos.

Expectativas en la investigación

El doctor Martínez señala que *“todos los estudios realizados hasta el momento de caracterización de las diferentes propiedades bioactivas de extractos de semillas de uva y hojas de olivo con células humanas de estómago los hemos realizado a nivel de laboratorio. Esto incluye también análisis básicos de citotoxicidad y un estudio sobre el impacto que tiene la digestión gástrica en las propiedades bioactivas y en la composición estructural de los extractos, que publicaremos próximamente”*.

Actualmente, el equipo está colaborando con una empresa de la Comunidad de Madrid que se ha interesado en algunos de estos resultados mediante un proyecto para la realización de un doctorado industrial de la convocatoria del año 2019. Martínez sostiene que *“hemos definido la fase de investigación actual y el estado de madurez tecnológica de este trabajo con un TLR (nivel de madurez de la tecnología) de 4, correspondiente con una tecnología comprobada y validada en el laboratorio”*. Entre los próximos pasos a seguir se encuentra valorar el efecto de estos extractos en pacientes infectados con *H. pylori*, y a nivel tecnológico sería la elaboración de un extracto específico para *H. pylori*, *“para lo que buscaremos financiación a través de alguna convocatoria competitiva o de una empresa interesada para desarrollar un proyecto de prueba de concepto que nos permita llevar esta propuesta, al menos, a un nivel TLR 7 (demostración de prototipo en entorno operacional)”*.

De cara al futuro, el equipo tiene la metodología necesaria para estudiar la presencia y eficacia de compuestos bioactivos frente a *H. pylori* en diferentes subproductos e ingredientes alimentarios, siendo esta una de las líneas de trabajo que se sigue en el grupo de investigación. Martínez añade que *“ya hemos probado varios extractos más, pero hasta el momento los resultados más relevantes los hemos obtenido utilizando semillas de uva y hojas de olivo como fuente de compuestos bioactivos”*. +

Autora: **Elena Ayuso**