

AVANCES EN LÁCTEOS FUNCIONALES

Andrés Bustamante P., Francisca Echeverría G., Paula Jiménez P., Paula García C.

Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Resumen

Durante las últimas tres décadas los productos lácteos han estado en el centro de los alimentos funcionales. En su composición nutricional, la leche tiene péptidos bioactivos, calcio y algunos ácidos grasos como el ácido linoleico conjugado, que podrían contribuir a la prevención de enfermedades como obesidad, hipertensión, cáncer y diabetes. Además, los lácteos permiten la adición y/o enriquecimiento con nutrientes y no nutrientes de interés funcional, destacando los probióticos, prebióticos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3, fitoesteroles, proteínas básicas de la leche (MBP), entre otros. De estos alimentos, los lácteos fermentados o con adición de probióticos corresponden a la categoría con mayor desarrollo, debido a sus efectos positivos para la salud intestinal y el sistema inmune. Dado el elevado consumo y versatilidad que tienen los productos lácteos, estos resultan ser una en la matriz ideal para la formulación de productos funcionales. En este sentido, los beneficios para la salud obtenidos al consumir lácteos funcionales han potenciado el desarrollo de una amplia gama de nuevos productos, transformándose en una prioridad para la academia y la industria, proyectándose a corto plazo un crecimiento importante enfocado a consumidores con necesidades especiales. El objetivo del presente capítulo es revisar y discutir los avances en cuanto al desarrollo de productos lácteos, sus principales componentes funcionales y las últimas tendencias en el desarrollo de este tipo de productos.

Palabras claves:

Lácteos funcionales, lácteos fermentados, probióticos, osteoporosis.

1. Introducción

Los alimentos funcionales forman parte de una dieta saludable, ya que contribuyen a la

prevención, mantención, o tratamiento de enfermedades crónicas [1]. En los últimos años, la población ha mostrado interés creciente por dichos productos, demandando un desarrollo constante de estos, los cuales además de pro-

ver beneficios para la salud, deben poseer una buena calidad sensorial [2]. Dentro de la gran gama de productos existentes, los lácteos han destacado como alimentos funcionales, ya que son de consumo habitual por diferentes segmentos de la población, ofrecen distintos formatos y son alimentos de elevada densidad nutricional, que además permiten la adición de nutrientes y no nutrientes de interés [3]. En relación con ello, son diversas las estrategias que permiten el desarrollo de lácteos funcionales, entre ellas, destacan la fortificación o enriquecimiento; la suplementación o los cambios dietarios del ganado lechero; y la fermentación de la leche [3–5]. Estas estrategias permiten obtener productos lácteos: leche, bebidas lácteas, yogurt, mantequilla, queso, entre otros, con un mayor contenido y/o con incorporación de compuestos bioactivos, así como también con una disminución de algún compuesto no deseado [3]. Estos productos se han enfocado principalmente en la salud cardiovascular y metabólica, control de peso corporal, funcionamiento del sistema gastrointestinal, y en potenciar el sistema inmune, entre otros beneficios [2,3]. Sin embargo, para que estos productos puedan tener realmente un efecto, su consumo debe ser frecuente y en cantidades habituales. Para ello, el alimento tiene que ser estable al almacenamiento, presentar buena calidad sensorial y permitir que los componentes funcionales se mantengan íntegros en cantidad y función en el producto desde su procesamiento hasta el consumo [2,6,7]. Una de las técnicas que contribuye a aumentar la estabilidad de los compuestos bioactivos es la encapsulación, la cual permite su protección del medio externo, además de enmascarar posibles aromas, sabores o colores no deseados y favorecer que lleguen al sitio anatómico de interés, lo que posibilita la formulación de un lácteo funcional sin alterar su calidad y/o estabilidad [3,7,8]. Por lo tanto, el presente capítulo tiene por objetivo revisar y discutir los avan-

ces en cuanto al desarrollo de productos lácteos, sus principales componentes funcionales y las últimas tendencias en el desarrollo de este tipo de productos.

2. ¿Qué son los lácteos funcionales?

Actualmente, existen diversas definiciones de alimentos funcionales, por lo que en 2015 el *Functional Food Center* propuso la siguiente definición: “alimentos naturales o procesados que contienen compuestos conocidos o desconocidos que tienen actividad biológica, los cuales, en cantidades definidas y no-tóxicas, proveen un beneficio a la salud documentado y probado clínicamente, para la prevención, mantención o tratamiento de alguna enfermedad crónica” [1]. Existe gran diversidad de alimentos funcionales en el mercado, destacando los productos lácteos funcionales [9], entendidos en este capítulo como aquellos productos obtenidos del procesamiento de la leche [10] que proveen un beneficio para la salud según la definición anteriormente expuesta (**Figura 1**) [1]. Una característica fundamental de un alimento funcional es que sus compuestos bioactivos conserven sus propiedades durante el procesamiento y almacenamiento comercial. Bajo esta perspectiva, los productos lácteos, debido a su matriz alimentaria, su contenido de calcio y a su amplio consumo, se convierten en una matriz ideal para su funcionalización. Dentro de estos productos se encuentran lácteos con proteínas básicas de la leche (MBP), probióticos y/o prebióticos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPCL n-3), ácido linoleico conjugado (CLA), fitoesteroles, entre otros productos [9], los cuales se detallan a continuación.

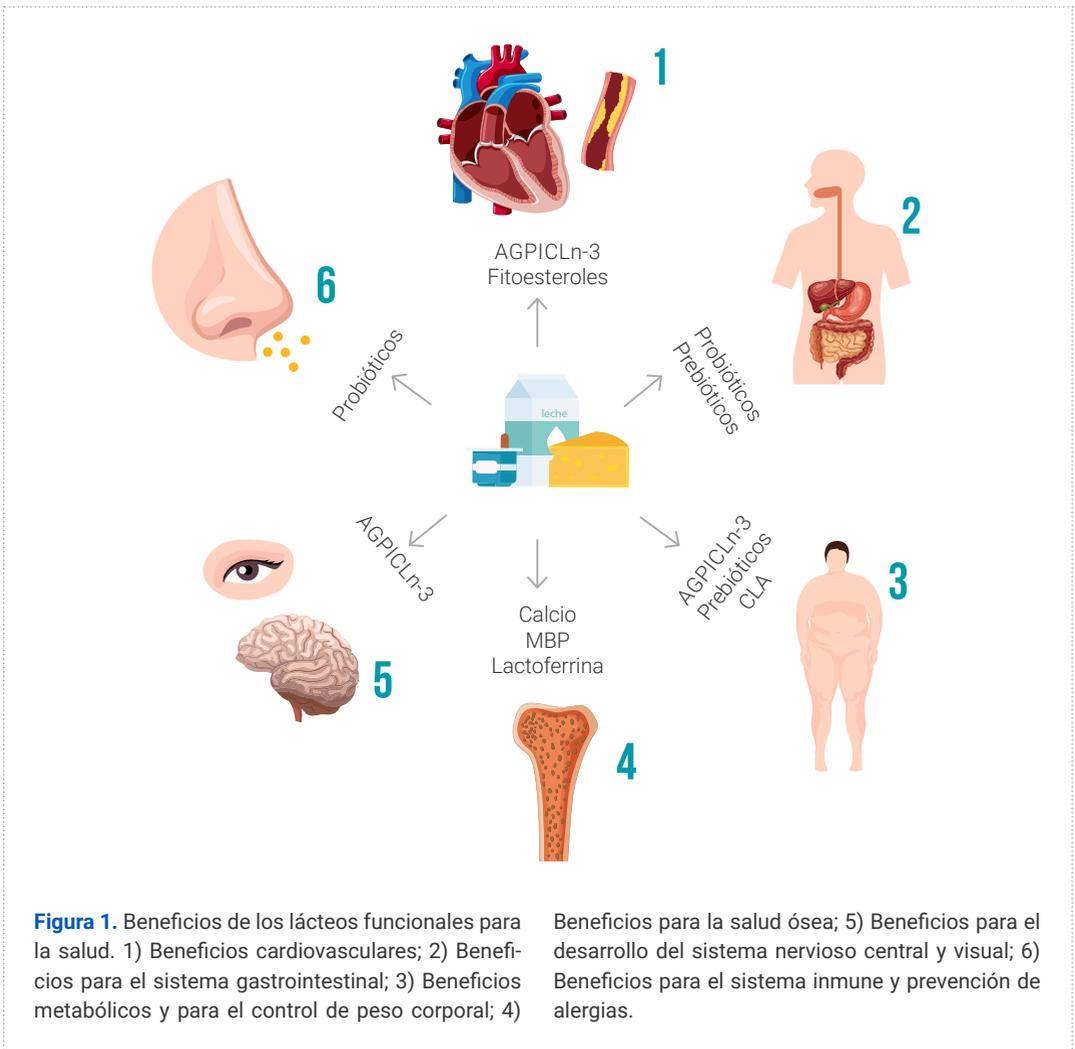


Figura 1. Beneficios de los lácteos funcionales para la salud. 1) Beneficios cardiovasculares; 2) Beneficios para el sistema gastrointestinal; 3) Beneficios metabólicos y para el control de peso corporal; 4)

Beneficios para la salud ósea; 5) Beneficios para el desarrollo del sistema nervioso central y visual; 6) Beneficios para el sistema inmune y prevención de alergias.

3. Lácteos y osteoporosis: calcio, proteínas básicas de la leche y lactoferrina

La osteoporosis es una enfermedad ósea muy frecuente en la población de adultos mayores y mayormente en mujeres post menopáusicas. Esta condición resulta de un desbalance en el proceso de formación y resorción ósea o de remodelación natural de los huesos. Esta enfermedad cursa con una reducción en la densidad ósea y degeneración de la estructura de los huesos que resulta en debilidad de estos y en un aumento en riesgo de fractura [11]. La leche

y sus productos derivados son ricos en calcio y podrían ser útiles en la prevención de osteoporosis. Dentro de los minerales, el calcio es probablemente el más empleado en el desarrollo de lácteos funcionales. Su uso se sustenta en una gran cantidad de información científica que lo vincula a la reducción del riesgo de osteoporosis [12], siendo sus propiedades biológicas descritas extensamente en la literatura [13].

Además del calcio, los lácteos son abundantes en proteínas, lípidos, potasio, sodio, zinc, fosfatos, vitamina A y B2, junto a compuestos funcionales como fosfopéptido de caseína, proteínas básicas de la leche (MBP) (su punto

isoeléctrico se encuentra a pH básico) y lactoferrina. Dentro de MBP, se encuentran los factores de crecimiento transformante β -1 y β -2 (TGF- β 1 y TGF- β 2) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de osteoblastos y previenen la generación de osteoclastos y resorción ósea. Las MBP además contienen cistatina C, que inhibe la cisteína proteasa asociada a la liberación de calcio y digestión del colágeno óseo en presencia de trombina, interleuquina1 y prostaglandinas [11]. Las MBP se obtienen a partir de la fragmentación del suero de la leche y podrían ser una interesante alternativa para la formulación de productos lácteos funcionales. Por ejemplo, en modelos animales se ha observado que la suplementación con MBP aumenta la resistencia de los huesos y suprime la resorción ósea en ratas ovariectomizadas [14]. Asimismo, en ratones con fracturas de tibia suplementados con MBP durante 56 días, se observó que mejoró la reparación de sus fracturas y resistencia ósea comparados con ratones no suplementados [15]. La evidencia más reciente muestra el potencial que tendría este tipo de proteínas para el desarrollo de alimentos funcionales, reportándose que TGF- β 1 y TGF- β 2 de origen bovino podrían inducir la producción de colágeno en líneas de células mesenquimales humanas como fibroblastos y osteoblastos [16]. La evidencia a nivel de estudios en humanos es reducida. Sin embargo, se observan promisorios resultados producto de la suplementación con MBP. En este sentido, se ha reportado que mujeres jóvenes (19-30 años) y postmenopáusicas con ingesta normal de calcio suplementadas con MBP (suero de leche) por 6-8 meses, aumentaron su densidad mineral ósea principalmente a nivel de espina dorsal y radio [17-20]. La información disponible indica la necesidad de profundizar en el efecto de MBP en humanos. Sin embargo, abre una amplia gama de oportunidades para el desarrollo de lácteos funcionales.

Por otra parte, la lactoferrina es una glicoproteína presente en la leche que tiene potentes

efectos anabólicos en el hueso, asociándose a un aumento en el número de osteoblastos y a una supresión en la formación de osteoclastos. Se ha observado que un yogurt funcional adicionado de lactoferrina bovina retiene la estructura y funcionalidad de esta glicoproteína hasta por 21 días a 4°C [21]. La acción anabólica de esta proteína en el hueso se vincula al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) que estimula a proteínas quinasas activadas por mitógenos para así causar una rápida mitogénesis celular [11]. Estudios en modelos animales de postmenopausia demuestran que es posible prevenir la pérdida de masa ósea a través de la suplementación con lactoferrina de origen bovino. Por ejemplo, en una intervención de 27 semanas se suplementó a ratonas ovariectomizadas con 1-20 g de lactoferrina/kg de dieta. Los resultados de esta investigación mostraron la presencia de lactoferrina en la circulación sanguínea periférica, que a la vez moduló la respuesta en la formación y resorción del hueso, encontrándose un aumento de la densidad mineral ósea y mayor resistencia a nivel de fémur [22]. Resultados similares se reportan en mujeres postmenopáusicas sanas (45-60 años) que recibieron una leche enriquecida con lactoferrina durante aproximadamente 25 semanas. En este grupo se describe una disminución en biomarcadores de resorción ósea (fosfatasa alcalina específica del hueso, osteocalcina, N-telopéptidos y deoxipiridinolina urinaria), es decir, ocurrió un aumento de la formación ósea, demostrando el potencial uso de este compuesto para la prevención de osteoporosis y para su inclusión en alimentos funcionales [23].

4. Probióticos

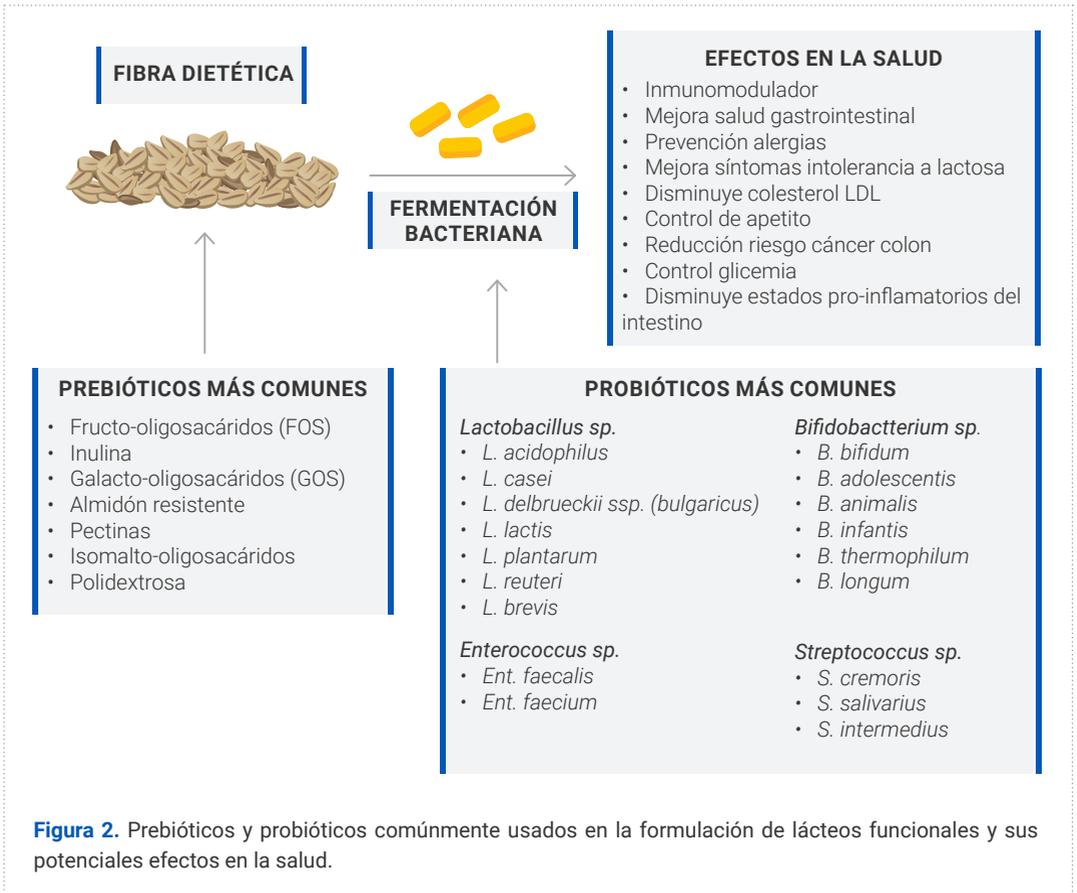
Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped [24]. Estos se encuentran disponibles en el mercado como suplementos dietarios o

como parte de alimentos funcionales, principalmente en productos lácteos fermentados como kéfir y yogurt [25]. Los lácteos fermentados requieren bacterias ácido lácticas para comenzar la fermentación, permitiendo la metabolización de lactosa a ácido láctico, lo que aumenta la acidez del producto y favorece la proliferación de otros microorganismos [26]. En el caso del yogurt, generalmente se utilizan las cepas *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para comenzar la fermentación láctica, pudiendo adicionar, además, cepas con efecto probiótico [27]. El efecto beneficioso de estas bacterias (**Figura 2**) principalmente ocurre a nivel intestinal y del sistema inmune, para lo cual el producto debe contener una concentración adecuada de al menos 10^6 UFC/ml de bacterias viables al momento del consumo [28]. En un estudio transversal, aleatorizado, doble ciego, hombres jóvenes aparentemente sanos (n=14) recibieron 400 g/d de yogurt con probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG) o leche acidificada (con d-(+)-glucono- δ -lactona; 2%) durante dos semanas. Luego de dicho período, se evaluó la respuesta postprandial a una comida alta en grasas, que se espera genere un estado proinflamatorio transitorio. Al final de la intervención, los sujetos presentaron menores niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (interleuquina-6; IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa; TNF- α) comparado con la línea de base. A su vez, hubo diferencia en la abundancia de distintas cepas bacterianas en la microbiota fecal, siendo más abundantes las cepas *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* luego del consumo de yogurt con probióticos, en comparación con la leche acidificada [29]. También se ha descrito en distintos modelos que los lácteos fermentados y las cepas probióticas provenientes de estos, podrían tener un efecto favorable en la prevención del desarrollo de algunas alergias [30,31]. Shoda T. y cols. 2017, realizaron un estudio de cohorte (n=1166) en el que encontraron que el consumo de yogurt en la infancia se asocia inversamente con dermatitis

atópica y alergia alimentaria hasta los 5 años [30]. En el caso de las alergias alimentarias, se ha descrito que estas son precedidas por disbiosis intestinal, por lo que la administración de probióticos podría ser especialmente beneficiosa [32]. Fu L. y cols. 2019, estudiaron en un modelo de ratón BALB/c (n=6 por grupo) el efecto de dos cepas probióticas provenientes de yogurt (*Bifidobacterium longum* y *Bacillus coagulans* 2×10^{10} CFU, 300 μ l por ratón) sobre la alergia a la tropomiosina (proteína presente en los camarones). El tratamiento con ambas cepas disminuyó las alteraciones intestinales producidas por la alergia alimentaria, redujo la apoptosis de las células epiteliales intestinales y la acumulación de células inmunes (CD4+, células T y eosinófilos) en el intestino y revirtió la disbiosis de la microbiota intestinal [31]. Por otro lado, los microorganismos probióticos promueven la digestión de la lactosa, lo que resulta en una disminución de su concentración en productos fermentados, además de promover el incremento de la actividad de la enzima lactasa en el intestino delgado [33]. En consecuencia, estos productos serían aptos para personas con intolerancia a la lactosa, aliviando síntomas gastrointestinales luego del consumo de lácteos [34]. Sin embargo, una dificultad de los lácteos con probióticos es la mantención de la viabilidad de los microorganismos, los cuales deben resistir el procesamiento del alimento, almacenamiento y consumo del producto, hasta llegar al sitio anatómico de acción [7,35]. La encapsulación es un proceso que permite recubrir un activo con un agente encapsulante para producir partículas de tamaño nano o micro que pueden ser agregadas a productos alimentarios [7]. Esta tecnología ha sido utilizada para mejorar la viabilidad de los probióticos en productos lácteos, además de permitir su incorporación a distintas matrices alimentarias y favorecer la liberación controlada del activo [7,36]. Afzaal M. y cols. 2019, evaluaron la viabilidad y estabilidad de bacterias incorporadas a un yogurt en forma libre y microencapsulada. Los autores encontraron que los probióticos microencapsulados tuvieron ma-

yor viabilidad durante el almacenamiento (28 días, -20°C), mayor estabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas y una mayor acep-

tabilidad sensorial del producto, en comparación con el yogurt con probióticos sin encapsular [36].



5. Prebióticos

Los prebióticos se definen como “sustratos que son selectivamente utilizados por los microorganismos del huésped otorgando beneficios para la salud”, destacando algunas fibras solubles fermentables, oligosacáridos, almidón resistente, inulina, entre otros [37]. Los prebióticos también se encuentran presentes en una gran variedad de lácteos funcionales, favoreciendo el control del apetito y otorgando beneficios cardiometabólicos, de salud mental y ósea, y a nivel del tracto gastrointestinal (Figura 2) [37,38]. En un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado,

se evaluó la sensación de saciedad en mujeres adultas jóvenes aparentemente sanas (n=19) luego de 8 días de consumir un yogurt con 6 g de inulina al desayuno. Después de un día de consumo, no hubo diferencias en la sensación de saciedad. Sin embargo, al cabo de 8 días las participantes reportaron un menor deseo de comer y presentaron un menor consumo prospectivo de alimentos, aunque sin diferencias en cuanto a la ingesta energética [39]. La fermentación colónica de los prebióticos favorece la actividad de la microbiota intestinal, además de generar ácidos grasos de cadena corta con actividad biológica [38], los cuales han mostrado efecto en la dis-

minución de peso corporal, control de glicemia, disminución de inflamación a nivel intestinal, entre otros [40]. Aryana K. y cols. 2015, analizaron la aceptabilidad y fermentabilidad de un yogurt enriquecido con almidón resistente en un grupo de niños y adolescentes. El yogurt presentó buena aceptabilidad, además de disminuir el pH de las deposiciones de los sujetos y aumentar el contenido fecal de ácidos grasos de cadena corta, incluyendo acetato [41]. No obstante, se debe considerar al momento de adicionar prebióticos a algún producto lácteo, que su adición no altere las propiedades sensoriales del alimento ni la estabilidad de estos compuestos durante el procesamiento y almacenamiento, con el fin de asegurar un beneficio para el consumidor [38]. Crispín-Isidro G. y cols. 2015 evaluaron las propiedades microestructurales, reológicas y sensoriales de un yogurt batido reducido en grasas al agregar inulina (RIN) o fructanos de agave (RFR) en distintas concentraciones (20, 40 y 60 g L⁻¹). Los autores encontraron que RIN y RFR presentaron diferencias en la estructura de red de proteínas, en comparación con el control. A su vez, RIN en (40 g L⁻¹) y RFR (60 g L⁻¹) presentaron características sensoriales superiores al control [42]. Una tecnología que podría utilizarse en la producción de lácteos con adición de probióticos y prebióticos es el ultrasonido de alta intensidad (HIUS), el cual permitiría mejorar la supervivencia bacteriana, además de cambiar la estructura de los prebióticos, facilitando el acceso de los microorganismos [43]. La aplicación de HIUS en una leche fermentada redujo el tiempo de fermentación requerido para alcanzar pH 4,7 y provocó una ruptura de las paredes celulares de los microorganismos, liberando β -galactosidasa, la cual promovió la hidrólisis de lactosa y aumentó los niveles de oligosacáridos, favoreciendo la fermentación [44].

6. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPCL n-3), principalmente el ácido eicosapentaenoico (C20:5; EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6; DHA), son ácidos grasos -de al menos 20 carbonos- que tienen su primer doble enlace en tercera posición y son sintetizados a partir de reacciones de elongación y desaturación del ácido α -linolénico (C18:3) [45]. Dentro de los productos lácteos con adición de AGPCL n-3 se encuentran: yogurt, leches, bebidas lácteas, mantequillas, entre otros [46], los cuales, mayoritariamente, están dirigidos a mejorar la salud cardiovascular de quienes los consumen [47,48]. En relación con ello, sujetos con hipertrigliceridemia (n=53) participaron en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, en el cual consumieron un yogurt control, un yogurt enriquecido con 0,8 g de AGPCL n-3, o un yogurt con 3 g de estos ácidos grasos, durante 10 semanas. Los sujetos que consumieron el producto con 3 g de AGPCL n-3, presentaron mayores niveles de estos ácidos grasos en plasma y eritrocitos, junto con mayores niveles plasmáticos de mediadores derivados del EPA, además de una mejoría de los parámetros de riesgo cardiovascular como de los niveles plasmáticos de colesterol HDL y de triglicéridos [47]. Por otro lado, los AGPCL n-3, además de tener beneficios cardiometabólicos, son fundamentales para el desarrollo del sistema nervioso central y de la retina durante la gestación y desarrollo en la infancia [49]. De hecho, se ha descrito que la ingesta de productos fuente de AGPCL n-3 durante el embarazo y lactancia, aumenta el contenido de DHA en la leche materna [50] y se asocia positivamente con el desarrollo neurológico de su descendencia [51]. Mujeres que consumieron una bebida láctea enriquecida con 60 mg/porción de DHA y 14 mg/porción de EPA durante el embarazo y lactancia, presentaron un au-

mento la concentración de EPA y DHA en los fosfolípidos de membrana de los eritrocitos y en la leche materna, lo que sugiere que los productos lácteos serían un buen vehículo para aumentar la ingesta de AGPCL n-3 en esta etapa [52]. No obstante, una dificultad que tiene la formulación de alimentos que contengan estos ácidos grasos es su aroma y sabor, además de su baja estabilidad oxidativa [53]. En consecuencia, se deben utilizar estrategias que permitan agregar estos compuestos bioactivos sin alterar las características sensoriales del producto y que no disminuyan la vida útil de este [48]. En este sentido, la encapsulación nuevamente cobra importancia, ya que este proceso permite incorporar AGPCL n-3 en una matriz alimentaria, enmascarando su sabor y aroma y favoreciendo su estabilidad oxidativa [48,53]. Ghorbanzade T y cols. 2017 estudiaron las propiedades sensoriales y estabilidad de un yogurt fortificado con aceite de pescado nano-encapsulado (Y+NFO) *versus* un yogurt con aceite de pescado sin encapsular (Y+FO). Los autores reportaron que no hubo diferencias en la aceptabilidad de Y+NFO y del yogurt control (sin adición de aceite de pescado), teniendo una menor aceptabilidad el Y+FO. A su vez, el Y+NFO mantuvo su nivel de peróxidos durante 21 días de almacenamiento, mientras que Y+FO aumentó los niveles de peróxidos en un 75% ($p < 0,05$) [48]. Otra estrategia es la suplementación del ganado lechero con aceite de pescado, lo cual se ha descrito como un enfoque efectivo para aumentar el contenido de AGPCL n-3 en la leche, sin afectar la producción de leche, ni las propiedades sensoriales de esta [54].

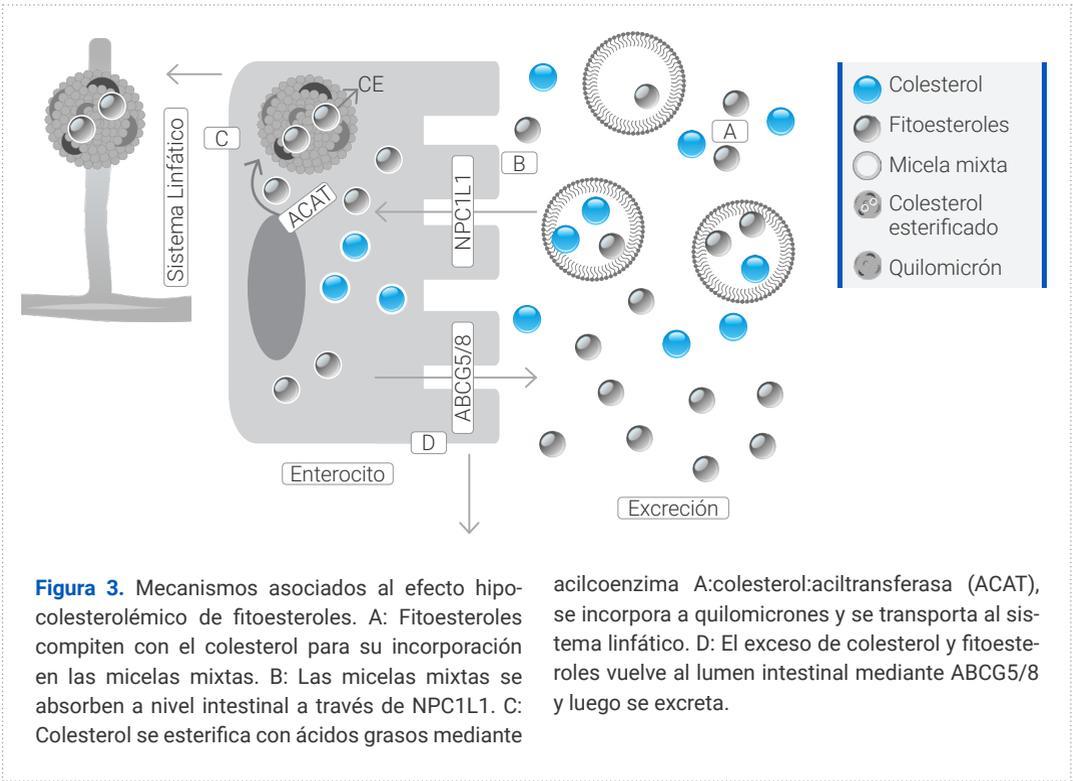
7. Ácido linoleico conjugado

El ácido linoleico conjugado (CLA) corresponde a una mezcla de isómeros del ácido linoleico (c9, c12 C18:2; AL), principalmente 9c, 11t y 10t, 12c, resultantes de la isomerización y

biohidrogenación del AL en el rumen por bacterias ruminales, por lo que su principal fuente son la carne de rumiantes y los productos lácteos [55]. Distintos beneficios se le han atribuido al CLA, destacando un efecto anti-carcinogénico, reducción de grasa corporal, prevención de aterosclerosis y disminución de la glicemia [56]. En un estudio realizado en sujetos aparentemente sanos (n=10) el consumo de 200 g a la semana de queso rico en CLA (1,56 g/100 g de ácidos grasos) durante 10 semanas, resultó en menores niveles de citoquinas proinflamatorias y menor agregación plaquetaria [57]. También se ha descrito en humanos aparentemente sanos (n=36) que la ingesta de 90 g/d durante 2 y 4 semanas de un queso enriquecido en CLA, aumentaría los niveles plasmáticos de AGPCL n-3, pudiendo ser uno de los mecanismos mediante los cuales ejerce efectos positivos para la salud [58]. Sin embargo, la concentración de CLA en productos lácteos es muy variable (3,4 a 9,4 mg/g de grasa) [59], por lo que se han estudiado distintas técnicas que permitan aumentar el contenido de este ácido graso en estos productos, tales como fermentación y modificaciones de la dieta del ganado lechero [5,59]. Se ha descrito que, además de las bacterias ruminales, otras cepas bacterianas con actividad linoleato isomerasa son capaces de convertir el AL en CLA [59]. Por lo tanto, los lácteos fermentados podrían tener un mayor contenido de CLA según la cepa bacteriana utilizada, sumado a un efecto probiótico [60]. Por otro lado, Gagliostro G. y cols. 2018, analizaron la composición nutricional de la leche de vacas alimentadas con una ración control (C-TMR) *versus* la leche de vacas alimentadas con la misma ración con adición de 0,144 kg/d de microalgas y 0,72 kg/d de aceite de soya (L-TMR). Luego de 6 semanas, la leche aumentó sus niveles de CLA de 0,14 g/100 g de ácidos grasos a 1,41 g/100 g de ácidos grasos en el grupo L-TMR en comparación con el grupo control [5]. No obstante, si bien los efectos del CLA son promisorios en modelos animales [61,62], sus efectos en la salud humana

no son concluyentes, por lo que actualmente no existen mensajes saludables permitidos en el eti-

quetado nutricional, de acuerdo con la opinión de expertos de la EFSA [63].



8. Fitoesteroles

Los fitoesteroles corresponden a un grupo de compuestos esteroideos, lipofílicos, de origen vegetal, conformado por esteroles y estanoles. Los más representativos son β -sitosterol, sitostanol, campesterol y stigmasterol [12]. En el último tiempo, este grupo de compuestos ha sido incorporado a lácteos funcionales con el fin de contribuir a prevenir la hipercolesterolemia. Esta condición se caracteriza por un elevado nivel de colesterol total y de colesterol LDL, que son uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de cardiopatía coronaria. Se ha reportado que los fitoesteroles son una alternativa viable para el tratamiento de hipercolesterolemia, sobre todo en personas con niveles de 200-240 mg/dL de colesterol total [64]. Se han propuesto varios

mecanismos que explican este efecto, dentro de ellos, la competencia entre fitoesteroles y colesterol por su incorporación a micelas mixtas en el tracto digestivo; la competencia entre ésteres de fitoesteroles y colesterol esterificado por las enzimas digestivas hidrolíticas; la competencia entre fitoesteroles y colesterol por su absorción intestinal a través de transportadores (NPC1-L1 y SR-BI); el aumento de eflujo apical de colesterol desde el enterocito hacia el lumen intestinal vía ABCG5/G8; y, la inhibición de colesterol acil-CoA transferasa (ACAT), que es responsable de la esterificación de colesterol antes de su incorporación a los quilomicrones (**Figura 3**) [65]. Gran parte de los estudios muestran que la dosis más efectiva para lograr una disminución del 5-15% del colesterol LDL es de 2-3 g/día. Sin embargo, la ingesta estimada de fitoesteroles en adultos es de 150-400 mg/día (10-20% de la dosis suge-

rida) [12]. Por lo tanto, una alternativa para aumentar su ingesta es adicionarlo a bebidas lácteas. En este sentido, se observó que el consumo de una leche descremada fortificada con fitoesteroles (1,5 g/día) causó una disminución del colesterol LDL, colesterol total y presión diastólica en sujetos sin tratamiento farmacológico para reducción del colesterol [66]. En un reciente meta-análisis que analizó 31 estudios donde hubo fortificación de productos lácteos con fitoesteroles, se encontró que el consumo de estos alimentos se asoció a una disminución de hasta 6-12% en el colesterol LDL. Las conclusiones de este estudio confirman que el uso de fitoesteroles es una alternativa viable para su indicación en sujetos moderadamente hiperlipidémicos, ya que mejora los biomarcadores de riesgo cardiovascular con una respuesta dosis dependiente [67]. Más aún, se ha observado que la composición de los fitoesteroles adicionados a los lácteos funcionales tiene un efecto sobre la acción hipocolesterolemica, que aumenta en aquellos productos con mayor contenido de sitosterol [68]. En el desarrollo de lácteos funcionales con la adición de fitoesteroles, es importante elegir una matriz alimentaria y seleccionar adecuadamente el tipo de fitoesteroles a emplear, debido a que afectan la biodisponibilidad y funcionalidad de estos compuestos. Los fitoesteroles existen en forma libre y esterificada y pueden ser incorporados a matrices con o sin materias grasas, líquidas o sólidas [69]. De los mecanismos hipocolesterolemicos, la competencia entre colesterol y fitoesteroles por la formación de la micela es de los más aceptados (micelización). Esta capacidad depende de la eficiencia con que se transfieren los fitoesteroles desde el alimento a la micela, de la hidrofobicidad de los fitoesteroles y del tipo de matriz alimentaria [65]. Por ejemplo, en un yogurt bajo en grasa se observó que los fitoesteroles esterificados con ácidos grasos de cadena larga tienen mayor capacidad micelizante que fitoesteroles esterificados con ácidos grasos de cadena media y que aquellos no esterificados o libres. Sin embargo, este orden cambia al incorporar los

fitoesteroles en aceite de oliva, donde aquellos con mayor capacidad micelizante son los fitoesteroles esterificados con ácidos grasos de cadena media [65]. Por otra parte, se ha observado que la formulación del producto tiene un impacto sobre el efecto hipocolesterolemico de los fitoesteroles. En un estudio simple ciego, aleatorizado, se suplementó a 12 sujetos sanos con fitoesteroles en forma de una pasta untada durante las comidas o de una bebida, 30 minutos después de comer. Los resultados indican que se logró disminuir la presencia de colesterol en los quilomicrones en un 43 y 59%, respectivamente. A pesar de estas diferencias, ambos sistemas logran un importante efecto micelizante que depende en gran medida de la distribución de los fitoesteroles en la fase oleosa, lo que sugiere una redistribución de estos compuestos en el estómago y duodeno [70]. Los antecedentes muestran que el vehículo que se utilice para la fortificación o enriquecimiento con fitoesteroles puede tener un efecto significativo sobre el efecto biológico de estos compuestos. En este sentido, se ha encontrado que las mayores reducciones en el colesterol LDL en humanos se obtienen al adicionar los fitoesteroles en productos lácteos, yogurt, pastas untadas y mayonesas, comparado con otros alimentos como jugo de naranja, croissants, muffins, barras de cereal o chocolates [71]. De igual forma, se observa una mayor reducción de colesterol LDL al adicionar fitoesteroles a lácteos bajos en grasa respecto a pan o cereales [72]. Existe una serie de dificultades para la adición de fitoesteroles en productos lácteos funcionales. Dentro de ellas, su baja solubilidad en medio acuoso y su punto de fusión de 120-140 °C. Por lo tanto, usualmente se elaboran emulsiones o se microencapsulan por secado por atomización para facilitar su incorporación en distintos alimentos [73]. En el caso de las emulsiones, corresponden a sistemas con una fase oleosa, una fase acuosa y una fase anfífilica que permiten contener a estos compuestos en una forma dispersable en agua. El tipo de producto lácteo y sus ingredientes tienen efectos considerables en la

estabilidad de estas emulsiones y en la viabilidad del producto. La cristalización de los fitoesteroles en la interfase de las emulsiones disminuye su biodisponibilidad, describiéndose que el uso de proteína de suero láctea contribuye a evitar este proceso [74]. Por lo tanto, en la elaboración de lácteos funcionales es posible combinar el efecto positivo de sus ingredientes para aumentar la biodisponibilidad de sus componentes activos. La estabilidad de los fitoesteroles además puede estar afectada por su susceptibilidad a la oxidación. En este sentido, se ha descrito que un vehículo adecuado para adicionar estos compuestos es una bebida láctea con frutas, donde después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente no se observó un aumento significativo de fitoesteroles oxidados (oxiesteroles) ni una disminución de su biodisponibilidad [75]. En el caso de la microencapsulación, uno de los métodos más usados es el secado por atomización, debido a que da origen a micropartículas estables y es un proceso rápido y de bajo costo. Esta técnica consiste en la atomización de una solución o líquido en suspensión en forma de pequeñas gotas en una cámara de secado, donde se enfrentan a una corriente de aire caliente que evapora el solvente, dando origen a un polvo [76]. Dada la hidrofobicidad de los fitoesteroles, esta técnica se utiliza para elaborar productos que puedan ser añadidos a formulaciones de naturaleza acuosa como lácteos, sopas y bebidas de fantasía [73]. En este sentido, se han usado distintos materiales encapsulantes o polímeros en la encapsulación de fitoesteroles. En un reciente estudio se evaluó el uso de aislado proteico de suero, inulina y quitosano en el escalamiento productivo de fitoesteroles microencapsulados. Este estudio mostró la factibilidad técnica de producir micropartículas con hasta un 25% de fitoesteroles, manteniendo su estabilidad [77]. Usualmente, este tipo de estudios busca mejorar el rendimiento de encapsulación y la estabilidad del producto. Por ejemplo, en la encapsulación de fitoesteroles con goma arábiga y maltodextrina se evaluó el efecto de las variables de proceso

(temperatura de ingreso del aire, flujo de aire, flujo de alimentación, contenido de fitoesteroles en solución, y contenido de sólidos de la solución a atomizar) sobre el rendimiento productivo, retención de fitoesteroles y eficiencia de encapsulación. Los resultados indicaron que bajo las condiciones óptimas de secado (160°C) se obtiene un rendimiento del 84%, una retención del 72% y una eficiencia de encapsulación del 76%. [73]. En general, los antecedentes planteados resaltan el rol de la investigación aplicada en el desarrollo de lácteos funcionales y la necesidad del estudio sistemático de los múltiples factores que podrían afectar la calidad del producto.

9. Conclusión

Los lácteos son alimentos naturalmente ricos en nutrientes, que además permiten la adición de otros compuestos de interés funcional. Además de su composición química, son consumidos habitualmente en la dieta, y son muy variados en presentación y características sensoriales. Por lo tanto, los lácteos funcionales se han transformado en productos de interés tanto para quienes los consumen como para la industria y la academia. Múltiples nutrientes y no nutrientes se han utilizado en el desarrollo de estos productos: probióticos y prebióticos, AGPCL n-3, CLA, fitoesteroles, entre otros. Las estrategias de funcionalización son diversas: enriquecimiento, adición, fermentación, encapsulación o modificación de la dieta del ganado lechero; utilizando diferentes tecnologías que aseguren su funcionalización efectiva. El consumo de estos productos ha mostrado un efecto biológico promisorio, favoreciendo el funcionamiento del sistema inmune y gastrointestinal y contribuyendo a la salud ósea y cardiovascular, entre otros. Para lograr un impacto real en la salud de los consumidores, se debe tener en cuenta la calidad sensorial y aceptabilidad de los distintos productos por parte del grupo objetivo. Finalmente, el desarrollo de lácteos fun-

cionales se proyecta como un nicho de mercado en continua expansión que requiere demostrar la funcionalidad de sus productos mediante una aproximación científica sistemática que articule industria con academia.

Referencias

- Martirosyan D.M. y Singh J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Funct. Foods Heal Dis.* 2015;5:209–23.
- Vicentini A. y cols. Functional foods : Trends and development of the global market. *Ital. J. Food Sci.* 2016;28:338–52.
- Martins N. y cols. Development of Functional Dairy Foods. In 2018. p. 1–19.
- Hati S. y cols. Technological advancement of functional fermented dairy beverages. In: *Engineering Tools in the Beverage Industry.* Elsevier; 2019. p. 101–36.
- Gagliostro G.A. y cols. Improving the quality of milk fatty acid in dairy cows supplemented with soybean oil and dha-micro algae in a confined production system. *Agric. Sci.* 2018;09:1115–30.
- Granato D. y cols. Probiotic dairy products as functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010;9:455–70.
- Burgain J. y cols. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Vol. 104, *Journal of Food Engineering.* 2011. p. 467–83.
- Mourtzinis I. y Goula A.M. Polyphenols in agricultural byproducts and food waste. In: Ronald Ross Watson, editor. *Polyphenols in plants : isolation, purification and extract preparation.* Second. London, U.K.: Andre Gerhad Wolff; 2019. p. 23–38.
- Varzakas T. y cols. Functional dairy foods and flora modulation. Yildiz F, editor. *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products.* p. 339–64.
- Food and Agriculture Organization. *Codex General Standard for the Use of Dairy Terms. CODEX STAN 206-1999.* 1999.
- Rajput R. y cols. Nutraceuticals for better management of osteoporosis: An overview. *J. Funct. Foods.* 2018;47:480–90.
- Rodríguez-Pérez C. y cols. *New Trends and Perspectives in Functional Dairy-Based Beverages. Milk-Based Beverages.* Elsevier Inc.; 2019. p. 95–138.
- Włodarek D. y cols. Calcium intake and osteoporosis: The influence of calcium intake from dairy products on hip bone mineral density and fracture incidence - A population-based study in women over 55 years of age. *Public Health Nutr.* 2014;17:383–9.
- Toba Y. y cols. Milk basic protein: A novel protective function of milk against osteoporosis. *Bone.* 2000;27:403–408.
- Yoneme H. y cols. Milk basic protein supplementation enhances fracture healing in mice. *Nutrition.* 2015;31:399–405.
- Ono-Ohmachi A. y cols. Collagen production ability of milk basic protein is dependent on stimulatory effect of transforming growth factor- β 1 and β 2. *Int. Dairy J.* 2019;97:71–5.
- Zou Z.Y. y cols. Evaluation of milk basic protein supplementation on bone density and bone metabolism in Chinese young women. *Eur J Nutr.* 2009;48:301–6.
- Aoe S. y cols. Controlled trial of the effects of Milk Basic Protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65:913–8.
- Aoe S. y cols. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. *Osteoporos. Int.* 2005;16:2123–8.
- Yamamura J.I. y cols. Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002;66:702–4.
- Naot D. y cols. Lactoferrin – A Potential Anabolic Intervention in Osteoporosis. In: Dionyssiotis Y. *Osteoporosis.* 2012. p. 803–821.
- Blais A. y cols. Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am. J. Physiol. – Endocrinol. Metab.* 2009;296:1281–8.
- Bharadwaj S. y cols. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 2009;20:1603–11.
- Hill C. y cols. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014;11:506–14.
- Roy D. Fecal microbiota and probiotic yogurt intake. In: *Yogurt in Health and Disease Prevention.* Elsevier Inc.; 2017. p. 237–58.
- Overview P.A. y cols. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Role of Microorganisms Present in Dairy Fermented Products in. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:2–4.
- Fazilah N.F. y cols. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *J. Funct. Foods.* 2018;48:387–99.
- Yildiz F. Overview of yogurt and other fermented dairy products. In: Yildiz F, editor. *Development and Manufacture of Yogurt and Other Function-*

- al Dairy Products. 2010 by Taylor and Francis Group, LLC; 2016. p. 1–45.
29. Burton K.J. y cols. Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men. *Br. J. Nutr.* 2017;117:1312–22.
 30. Shoda T. y cols. Yogurt consumption in infancy is inversely associated with atopic dermatitis and food sensitization at 5 years of age: A hospital-based birth cohort study. *J. Dermatol. Sci.* 2017;86:90–6.
 31. Fu L. y cols. Yogurt-sourced probiotic bacteria alleviate shrimp tropomyosin-induced allergic mucosal disorders, potentially through microbiota and metabolism modifications. *Allergol. Int.* 2019;68:506–14.
 32. Zhao W, Ho H en, Bunyavanich S. The gut microbiome in food allergy. Vol. 122, *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. American College of Allergy, Asthma and Immunology; 2019. p. 276–82.
 33. Oak S.J. y Jha R. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019;59:1675–83.
 34. He T. y cols. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104:595-604
 35. Đorđević V. y cols. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng. Rev.* 2015;7:452–90.
 36. Afzaal M. y cols. Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food Sci. Nutr.* 2019;7(12):3931–40.
 37. Gibson G.R. y cols. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Vol. 14, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 491–502.
 38. Prasanna P.H.P. y Rastall R.A. Potential applications of prebiotics to yogurt and impact on health. In: *Yogurt in Health and Disease Prevention*. Elsevier; 2017. p. 171–82.
 39. Heap S.y cols. Eight-day consumption of inulin added to a yogurt breakfast lowers postprandial appetite ratings but not energy intakes in young healthy females: A randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2016 Jan 28;115:262–70.
 40. Koh A. y cols. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Vol. 165, *Cell*. Cell Press; 2016. p. 1332–45.
 41. Aryana K. y cols. A resistant-starch enriched yogurt: fermentability, sensory characteristics, and a pilot study in children. *F1000Research*. 2015;4(139).
 42. Crispín-Isidro G. y cols. Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT - Food Sci Technol.* 2015 Jun 1;62:438–44.
 43. Guimarães J.T. y cols. High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. Vol. 57, *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier B.V.; 2019. p. 12–21.
 44. Nguyen T.M.P. y cols. Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by highintensity ultrasound. *Int. Dairy J.* 2009;19(6–7):410–6.
 45. De Roos B. y cols. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: New insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. Vol. 158, *British Journal of Pharmacology*. 2009. p. 413–28.
 46. Packaged Facts. Global Market for EPA/DHA Omega-3 Products. Internet. 2012 cconsultado el 20 Ene 2020.. Disponibe en: www.packaged-facts.com
 47. Dawczynski C. y cols. Randomized placebo-controlled intervention with n-3 LC-PUFA-supplemented yoghurt: Effects on circulating eicosanoids and cardiovascular risk factors. *Clin Nutr.* 2013;32:686–96.
 48. Ghorbanzade T. y cols. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chem.* 2017;216:146–52.
 49. Echeverría F. y cols. Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 2017;124:1-10.
 50. Cimatti A.G. y cols. Maternal Supplementation With Krill Oil During Breastfeeding and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFAs) Composition of Human Milk: A Feasibility Study. *Front Pediatr.* 2018;20;6:407.
 51. Ogaz-González R. y cols. Maternal dietary intake of polyunsaturated fatty acids modifies association between prenatal DDT exposure and child neurodevelopment: A cohort study. *Environ. Pollut.* 2018;238:698–705.
 52. Atalah S.E. y cols. Consumption of a DHA-enriched milk drink by pregnant and lactating women, on the fatty acid composition of red blood cells, breast milk, and in the newborn. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2009;59:271–7.
 53. Beindorff C.M. y Zuidam N.J. Microencapsulation of fish oil. In: Zuidam NJ, Nedović VA, editors. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer New York; 2010. p. 161–85.
 54. Kitessa S.M. y cols. Supplementation of grazing dairy cows with rumen-protected tuna oil enriches milk fat with n -3 fatty acids without affecting milk production or sensory characteristics . *Br. J. Nutr.* 2004;91:271–7.
 55. Shokryazdan P. y cols. Conjugated linoleic acid: A potent fatty acid linked to animal and human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57:2737–48.

56. Fuke G. y Nornberg J.L. Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57:1–7.
57. Sofi F. y cols. Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorheological variables: A dietary intervention study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2010;20:117–24.
58. Murru E. y cols. Dietary Conjugated Linoleic Acid-Enriched Cheeses Influence the Levels of Circulating n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in Humans. *Int. J. Mol. Sci. Artic. Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:1730.
59. Gorissen L. y cols. Bacterial Production of Conjugated Linoleic and Linolenic Acid in Foods: A Technological Challenge. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015;55:1561–74.
60. Ribeiro S.C. y cols. Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. Vol. 90, *LWT - Food Science and Technology.* 2018. p. 403–11.
61. Kanter J.E. y cols. 10,12 conjugated linoleic acid-driven weight loss is protective against atherosclerosis in mice and is associated with alternative macrophage enrichment in perivascular adipose tissue. *Nutrients.* 2018;10.
62. Chen Y. y cols. Orally Administered CLA Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice via Intestinal Barrier Improvement, Oxidative Stress Reduction, and Inflammatory Cytokine and Gut Microbiota Modulation. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67:13282–98.
63. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to conjugated linoleic acid (CLA) isomers and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight (ID 686, 726, 1516, 1518, 2892, 3165), increase in lean body mass (ID 49. EFSA J. 2010;8:1794.
64. Zhu H. y cols. Plasma cholesterol-lowering activity of soybean germ phytosterols. *Nutrients.* 2019;11:1–18.
65. Gleize B. y cols. Form of phytosterols and food matrix in which they are incorporated modulate their incorporation into mixed micelles and impact cholesterol micellarization. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016;60:749–59.
66. Cheung C.L. y cols. Randomized controlled trial of the effect of phytosterols-enriched low-fat milk on lipid profile in Chinese. *Sci. Rep.* 2017;7:1–6.
67. Soto-Méndez M.J. y cols. Role of Functional Fortified Dairy Products in Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-analyses of Randomized Clinical Trials. *Adv. Nutr.* 2018;10:S251–71.
68. Ying J. y cols. Phytosterol compositions of enriched products influence their cholesterol-lowering efficacy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2019;1579–93.
69. Cusack L.K. y cols. The Food Matrix and Sterol Characteristics Affect the Plasma Cholesterol Lowering of Phytosterol/Phytostanol. *Adv. Nutr.* 2013;4(6):633–43.
70. Amiot M.J. y cols. Comparable reduction in cholesterol absorption after two different ways of phytosterol administration in humans. *Eur. J. Nutr.* 2013;52:1215–22.
71. AbuMweis S.S. y cols. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* 2008;52:1–17.
72. Clifton P.M. y cols. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004;58:503–9.
73. Di Battista C.A. y cols. Process analysis and global optimization for the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technol.* 2017;321:55–65.
74. Zychowski L.M. y cols. Physical and interfacial characterization of phytosterols in oil-in-water triacylglycerol-based emulsions. *Food Struct.* 2019;19:100101.
75. Alvarez-Sala A. y cols. Safe intake of a plant sterol-enriched beverage with milk fat globule membrane: Bioaccessibility of sterol oxides during storage. *J. Food Compos. Anal.* 2018;68:111–7.
76. Kuang S.S. y cols. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010;50:951–68.
77. Tolve R. y cols. Preparation and characterization of microencapsulated phytosterols for the formulation of functional foods: Scale up from laboratory to semi-technical production. *Food Res. Int.* 2019;116:1274–81.